

ANA PAULA MORAES

**Utilização de marcadores cito-moleculares
na identificação de cromossomos mitóticos
em *Citrus* e *Poncirus***

Recife, PE

Agosto de 2007

ANA PAULA MORAES

Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus*

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação
em Biologia Vegetal na Universidade Federal
de Pernambuco, para a obtenção do grau de
Doutor em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Guerra

Recife, PE

Agosto de 2007

Moraes, Ana Paula

Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus*/ Ana Paula Moraes. – Recife: O Autor, 2007.

143 folhas : il., fig.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB.
Biologia Vegetal, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Biologia Vegetal 2. Cromossomos mitóticos – Citrus e Poncirus 3.
Análise citogenética 4. Cromossomos - mapeamento I. Título.

582.751.9 CDU (2.ed.)

UFPE

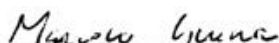
583.77 CDD (22.ed.)

CCB – 2007-128

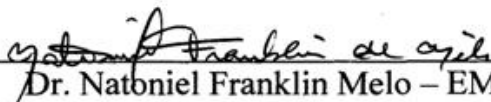
ANA PAULA DE MORAES

“Utilização de Marcadores Cito-Moleculares na
Identificação de Cromossomos Mitóticos em Citrus e
Poncirus”

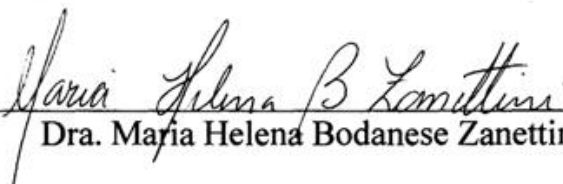
BANCA EXAMINADORA:



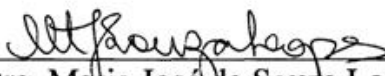
Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho (Orientador)-UFPE



Dr. Nataniel Franklin Melo – EMBRAPA-PE.



Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini - UFRGS



Dra. Maria José de Souza Lopes - UFPE



Dra. Ana Maria Benko Iseppon - UFPE

Recife-PE.
2007

*Ao meu pai e meu irmão, que mesmo estando
longe, estiveram sempre presentes...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos três anos e meio de doutorado, muitas foram as pessoas que colaboraram com a execução deste trabalho, seja direta ou indiretamente, e a todos vocês deixo meu muito obrigada!

Ao CNPq, pelo suporte financeiro, e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da UFPE;

Ao Dr. Marcelo Guerra pela inigualável orientação;

Ao Dr. Walter S. Soares Filho, da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura;

Ao Dr. Erik Mirkov, da Texas A&M University;

À Dra. Ana Christina Brasileiro-Vidal pelo auxílio na minha chegada

À Dra. Andrea Pedrosa-Harand pelo auxílio nos momentos de dúvida no laboratório;

Mas, fugindo um pouco da formalidade....

No meio da correria do dia-a-dia, muitas vezes acabamos esquecendo a importância de se dizer claramente o quão importante os amigos são para nós. Por isso, quero aproveitar a oportunidade para “falar” aos meus amigos: *Muito obrigada! Vocês são realmente muito importantes para mim!*

Inicialmente, quero fazer um agradecimento especial ao **Marcelo**, mas não só pela ótima orientação, pela oportunidade de poder trabalhar em um laboratório de alto nível e pelo conhecimento compartilhado, mas sim pela companhia nas viagens de congresso, pelas conversas, pela convivência no dia a dia do laboratório, enfim pela amizade!

Aos amigos que fiz ‘nú Récife’: com vocês entendi que um o doutorado (em citogenética) não é feito apenas de lâminas, BACs, DNAr, CMA&DAPI, metáfases e FISH (MUITA FISH!), é feito também das amizades que dão suporte e apoio a todo volume de

trabalho. Aos meus “cito-amigos” **Ivan, Roberta, Ana Emília, Adriana, Ana Chris, Juliano, Cícero, Felipe, Andrew, Silvana, Sandra, Fernando, Fagna, Aretuza, Adriana, Liliane, Gabriela, Joana, Gustavo, Artur e LIA** (ou **Maria José**, como preferirem – Obrigada pelo suporte *on-line* e pelos longos “fóruns científicos” noite a fora!)...*ufa*...e a nova “leva” de cito-amigos **André, Thiago Thel, Rogério, Tiago, Eliene**.
Muito obrigada!

Aos meus amigos, amigas e familiares de ‘Porto’, que apesar dos 3379 Km, facilitaram em muito a minha estadia longe de casa!

*“E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas”
Caminhos do coração - Gonzaguinha*

SUMÁRIO

1	Apresentação.....	09
2	Fundamentação teórica.....	13
2.1	Origem do <i>Citrus</i> e gêneros relacionados.....	14
2.2	Importância econômica.....	15
2.3	Taxonomia e sistemática do <i>Citrus</i> e gêneros relacionados.....	16
2.3.1	Taxonomia do gênero <i>Citrus</i>	17
2.3.2	Taxonomia dos gêneros relacionados.....	20
2.4	Poliembrionia e apomixia.....	21
2.5	Citogenética.....	23
2.5.1	Bandeamentos cromossômicos.....	23
2.5.2	Hibridização <i>in situ</i>	25
2.5.3	Bibliotecas genômicas e mapeamento físico de cromossomos.....	27
2.6	Citogenética de <i>Citrus</i>	29
2.6.1	Bandeamento cromossômico.....	31
2.6.2	Análise conjunta CMA/DAPI & FISH.....	33
2.7	Citogenética dos gêneros relacionados – Bandeamento cromossômico e FISH.....	35
3	Referências bibliográficas.....	38
4	Manuscritos.....	51
4.1	Manuscrito 1 Diversidade cariotípica e origem dos pomelos.....	52
4.2	Manuscrito 2 Marcador cromossômico distingue acessos de tangerinas híbridas e não-híbridas.....	73
4.3	Manuscrito 3 Construção de um mapa citogenético molecular em <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	95

5	Conclusões.....	118
6	Resumo.....	121
7	Abstract.....	122
8	Anexos.....	123
8.1	Normas de envio de manuscrito à revista <i>Chromosome Research</i>	124
8.2	Normas de envio de manuscrito à revista <i>Cytogenetics and Genome Research</i>	130
8.3	Normas de envio de manuscrito à revista <i>Genetics</i>	137

1. APRESENTAÇÃO

O gênero *Citrus* L. (Rutaceae) é um exemplo da dificuldade encontrada alguns taxons em definir o número de espécies. Os dois sistemas taxonômicos comumente utilizados (revisado por Swingle e Reece, 1967), são muito divergentes: o primeiro, proposto por Swingle reconhece 16 espécies divididas em dois subgêneros, *Papeda*, com seis espécies e *Citrus*, com dez, enquanto o segundo proposto por Tanaka separou o gênero em outros dois subgêneros, *Archicitrus* (com 109 espécies, incluindo aquelas do subgênero *Papeda* de Swingle) e *Metacitrus*, com 48 espécies. Essas classificações foram baseadas fundamentalmente em caracteres morfológicos. Contudo, duas características reprodutivas dos *Citrus*, a apomixia e o baixo isolamento reprodutivo entre as espécies de *Citrus* e entre essas e alguns gêneros próximos, geraram diversos biótipos com características intermediárias, o que dificulta a delimitação das espécies. Para contornar esses problemas foram utilizados outros tipos de caracteres, tais como marcadores bioquímicos, moleculares e citogenéticos, em adição aos marcadores morfológicos. Embora as tentativas de elucidar a taxonomia deste grupo baseadas em marcadores bioquímicos e moleculares, não tenham chegado a um consenso sobre a filogenia do grupo, a maioria desses estudos propõe apenas três espécies puras [*C. grandis* (L.) Osbeck (toranja), *C. reticulata* Blanco (tangerina) e *C. medica* L. (cidra)] no gênero *Citrus*, sendo as demais oriundas de cruzamentos entre essas espécies ou com espécies próximas (revisado por Moore, 2001).

Os marcadores citogenéticos, como os marcadores de DNA, têm sua expressão independente das variações ambientais ou da ativação gênica, o que os torna caracteres muito confiáveis. As análises citogenéticas foram inicialmente desestimulantes em *Citrus*, devido à conservação do número e da morfologia cromossômicas constantes (revisado por Guerra *et al.* 2000), mas tornaram-se atraentes a partir da demonstração de que os cromossomos dessas espécies apresentavam padrões de bandas heterocromáticas muito variáveis (Guerra, 1993). Isso foi demonstrado com a utilização dos fluorocromos CMA e DAPI, que apresentam afinidades preferenciais a regiões ricas em GC e AT, respectivamente (ver, por exemplo, Carvalho *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.* 2007). A distribuição dos blocos heterocromáticos é uma característica variável e de fácil visualização, sendo sempre CMA⁺/DAPI⁻ em *Citrus* e gêneros próximos. A localização e o número destes blocos heterocromáticos permitiram classificar os cromossomos em oito tipos, sendo dois destes amplamente distribuídos (tipos D e F) e seis, menos abundantes, chamados de cromossomos marcadores (A-C, E, G e H).

A introdução da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) nas espécies de *Citrus* e gêneros relacionados aumentou o número de marcas cromossômicas disponíveis para a comparação entre as espécies. O início da citogenética molecular em *Citrus* se deu com Matsuyama *et al.* (1996) e desde então, aproximadamente 100 acessos foram analisadas por bandeamento CMA/DAPI, sendo metade destes por FISH de DNAr 5S e 45S. Porém, alguns grupos de *Citrus* ainda não foram avaliados e a análise completa dos principais grupos de espécies é fundamental para que se compreendam as relações entre as espécies e a evolução cromossômica dentro de *Citrus* e gêneros relacionados.

A análise conjunta do padrão de bandas CMA⁺ e da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S permitiu o reconhecimento de 15 tipos cromossômicos entre espécies de *Citrus* e gêneros relacionados, porém somente com a utilização dessas duas técnicas, ainda não foi possível identificar todos os pares cromossômicos. Isto ocorreu devido à predominância de dois tipos cromossômicos (D e F) e a freqüente ocorrência de cromossomos marcadores em heterozigose.

Atualmente, as sondas de cópia única, selecionadas a partir de bibliotecas genômicas construídas em BACs (do inglês, *Bacterial Artificial Chromosomes*), têm sido amplamente empregadas no ancoramento de mapas de ligação e cromossômicos. Essa metodologia permite identificar cada um dos pares cromossômicos, a partir da hibridização de seqüências de cópia única, gênicas ou não, diretamente nos cromossomos. A utilização desta abordagem no grupo em estudo aumenta o número de marcas cromossômicas e, a partir da passagem dessas marcas para espécies ou gêneros próximos, deverá auxiliar no entendimento da evolução cariotípica.

Em *Citrus* e nos gêneros relacionados, os mapas de ligação disponíveis são pouco informativos, revelando um número de grupos de ligação diferente do número haplóide. A ausência de um mapa genético saturado impossibilita a ancoragem do mapa genético e cromossômico. Contudo, a utilização de clones selecionados, mesmo que aleatoriamente, da biblioteca genômica pode gerar marcadores cromossômicos adicionais, permitindo assim o reconhecimento dos pares cromossômicos em metáfases mitóticas.

Dentre os gêneros relacionados a *Citrus*, o gênero *Poncirus* se destaca pela resistência ao principal patógeno dos *Citrus*, o vírus da tristeza dos citros (VTC). O gene que confere a resistência foi mapeado em um mapa de *contig* de BACs (Yang *et al.*, 2001), porém não foi relacionado a nenhum cromossomo. Alguns trabalhos realizaram o mapeamento genético desta característica (Gmitter *et al.*, 1996; Ruiz e Asíns, 2003), mas os mapas apresentados utilizaram

marcadores diferentes e não foi possível relacionar os grupos de ligação encontrados em cada trabalho. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., é considerada uma espécie pura, com pares cromossômicos supostamente homomórficos (Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007) e com baixa variabilidade genética (Pang *et al.*, 2007). A biblioteca genômica disponível para esta espécie constitui uma fonte de seqüências de cópia única para a hibridização *in situ* em *P. trifoliata* e, futuramente, em espécies de *Citrus*.

O presente trabalho visou auxiliar no entendimento da evolução cromossômica das espécies de *Citrus*, a partir da caracterização citogenética de dois grupos de espécies, os pomelos e as tangerinas – esta última incluindo uma das três espécies puras do gênero. Adicionalmente, o trabalho objetiva elaborar um mapa cromossômico para *Poncirus trifoliata*, espécie relacionada ao *Citrus*, permitindo reconhecer cada par cromossômico desta espécie, além de localizar a região do gene de resistência ao VTC. O mapa cromossômico obtido, baseado no padrão de bandamento CMA/DAPI, FISH de DNAr 45S e de seqüências de cópia única, é apresentado como um primeiro passo para uma caracterização cito-molecular fina entre *Poncirus* e as espécies de *Citrus*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Origem do gênero *Citrus* e gêneros relacionados

A subfamília Aurantioideae, da família Rutaceae, à qual pertence o gênero *Citrus* L., tem como centro de origem o sudeste da Ásia, desde o nordeste da Índia até o arquipélago da Malásia, de onde se dispersaram para outras regiões do mundo (Webber, 1967; Moore, 2001). Os gêneros relacionados ao *Citrus* (*Poncirus*, *Clymenia*, *Fortunella*, *Microcitrus* e *Eremocitrus*) são encontrados na Ásia, Austrália e África (Roose *et al.*, 1995). O início da história evolutiva do *Citrus* se deu antes da Austrália perder a sua conexão com Nova Guiné e Ásia, há 20 milhões de anos (Webber, 1967).

Os primeiros relatos de utilização de espécies de *Citrus* datam de mais de 3 mil anos atrás, apresentando descrição de uso e técnicas de cultivo. A cidra (*C. medica* L.) foi a primeira espécie introduzida na Europa, sendo a única espécie conhecida por um longo período de tempo (Webber, 1967). Relatos desta espécie datam da passagem de Alexandre Magno pelo povoado grego da Pérsia, onde seus botânicos já encontraram a cidra sendo largamente cultivada. O povo grego registrou que a cidra tinha sido cultivada naquela região desde a época de Medes, por volta do século nove até a metade do século seis AC, e por isso era conhecida como “a maçã das Ilhas Medes” pelos macedônios. As cidras foram as precursoras dos citros no ocidente devido ao seu aroma agradável, boa aparência e resistência aos patógenos do período pós colheita – ideal para viagens prolongadas (Scora, 1975; Koller, 1994; Moore, 2001).

As tangerinas (*C. reticulata* Blanco) são nativas da China e do leste da Ásia, sendo extensamente plantadas na China e no Japão e somente foram introduzidas na Europa no século XIX (Webber, 1967; Koller, 1994). Sugere-se que, quanto a sua origem, as tangerinas tenham se desenvolvido a partir da tangerina silvestre da Índia, *C. indica* Tan. (Hodgson, 1967).

A história das laranjas-doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck] tem um início obscuro, desconhecendo-se o seu ancestral chinês, porém acredita-se que devam estar relacionadas com a tangerina. No século XVI, com o aumento do seu cultivo, chegou ao Mediterrâneo e foi considerada uma espécie sem origem conhecida. Todavia, hoje se sabe que é uma espécie originária do nordeste da Índia e de parte da China e Burma, como os outros *Citrus* (Webber, 1967). Em relação aos limões [*C. limon* (L.) Burm. F.], o local e modo de origem são desconhecidos, mas acredita-se que devam ser oriundos dos países do sudeste da Ásia (Webber, 1967). Os limões seguiram, aparentemente, a mesma rota da laranja, sendo introduzidos na Europa pelas Cruzadas junto das limas e laranjas-doces (Webber, 1967).

Entre as espécies de *Citrus*, o pomelo (*grapefruit* – *C. paradisi* Macf.) é a única espécie que parece não ser originária da região Paleotropical, mas sim da Neotropical, nas ilhas do Caribe há pouco mais de 200 anos (Barrett e Rhodes 1976; Scora *et al.* 1982). Esta espécie apresenta uma origem híbrida, entre toranja [*C. grandis* (L.) Osb.] e laranja-doce [*C. sinensis* (L.) Osb.], sendo pela primeira vez descrita em 1750 nas Ilhas Barbadas (Kumamoto *et al.*, 1986) e referido como *forbidden fruit* (fruta proibida). Os pomelos atuais são aparentemente derivados de um estoque de plantas silvestres introduzidas na Flórida em 1823 por Count Odette Philippi (Bowman e Gmitter, 1990). Algumas variedades – ‘Duncan’, ‘Marsh’ e ‘Walters’ – foram selecionadas deste estoque inicial e, posteriormente, deram origem a todas as demais cultivares (Gmitter, 1993).

No Brasil, os citros foram introduzidos pelas primeiras expedições colonizadoras e em meados do século XVI já existiam muitos laranjais espalhados pelo litoral brasileiro (Moreira e Moreira, 1991).

2.2 Importância Econômica

O gênero *Citrus* está representado por diversas espécies de importância econômica, sendo as laranjas, as tangerinas, os limões e os pomelos os mais conhecidos. Estas espécies configuram a principal cultura frutífera do mundo, com plantações através das regiões tropicais e subtropicais. Os frutos podem ser consumidos *in natura* ou industrializados.

A citricultura brasileira se destaca como a maior do mundo, tendo produzido mais de 20 milhões de toneladas de frutos em 2005 em pomares que compreendem uma área de um milhão de hectares (FAOSTAT, 2005; Tabela 1). A laranja, seguida das tangerinas, são as principais espécies produzidas, enquanto os pomelos e as toranjas não apresentam ampla produção no território brasileiro, embora sejam muito apreciados nos Estados Unidos (mais de 923 mil toneladas em 2005; FAOSTAT, 2005). O Brasil detém 90% da venda internacional do suco concentrado de laranja, sendo o maior exportador, com cerca de 50% da produção mundial, gerando para o país cerca de US\$ 1,5 milhão anuais (Soares Filho, 2000).

Tabela 1: Produção das principais frutas cítricas no ano base 2005

Cultura	Produção brasileira em 2005 (toneladas)	Produção mundial em 2005 (toneladas)
Laranjas	17.804.600,00	60.188.121,20
Tangerinas	1.270.000,00	23.593.194,00
Limas e limões	1.000.000,00	12.749.167,00
Pomelos e toranjas	68.000,00	4.000.388,00

Fonte FAOSTAT (2005)

2.3 Taxonomia e Sistemática do gênero *Citrus* e gêneros relacionados

A subfamília Aurantioideae (=Citroideae) está dividida em duas tribos, Clauseneae e Citreae, cada uma com três subtribos. A subfamília Aurantioideae tem sido a mais estudada dentro da família Rutaceae devido à grande importância econômica do gênero *Citrus*, que compreende espécies cultivadas no mundo inteiro como laranjas, limões, tangerinas, limas e pomelos. Os outros gêneros relacionados representam uma fonte de genes para a citricultura, merecendo também atenção especial. Swingle e Reece (1967) dividiram o gênero *Citrus* em 16 espécies (Tabela 2) distribuídas em dois subgêneros, *Eucitrus*, com espécies de interesse econômico, e *Papeda*, que possui espécies exclusivamente silvestres.

Contudo, esse sistema proposto por Swingle e Reece (1967) foi considerado falho, por não cobrir suficientemente todo o material conhecido e por tratar espécies importantes de maneira complicada, creditando, freqüentemente, uma origem híbrida para espécies autênticas. Além de Swingle, o taxonomista Tyazôburô Tanaka também se dedicou ao estudo da taxonomia da subfamília Aurantioideae, publicando uma série de trabalhos no período de 1924 e 1941 (Araújo e Roque, 2005). Em dois trabalhos subsequentes (1961 e 1977) Tanaka dividiu o gênero *Citrus* em dois subgêneros, *Archicitrus* e *Metacitrus*, e ampliou o número de espécies para 162. A maior diferença entre os dois sistemas se refere à classificação das tangerinas. Enquanto Swingle dividiu este grupo em três espécies (*C. reticulata*, *C. tachibana* e *C. indica*), Tanaka considerou 36 espécies diferentes.

Tabela 2: Espécies do gênero *Citrus* descritas por Swingle e Reece (1967)

Subgênero	Espécie	Nome comum
Eucitros	<i>Citrus aurantifolia</i> (Cristm.) Swingle	Lima
	<i>C. aurantium</i> L.	Laranja azeda
	<i>C. grandis</i> Osbeck	Toranja
	<i>C. indica</i> Tanaka	Tangerina selvagem
	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	Limão
	<i>C. paradisi</i> Macfad.	Pomelo
	<i>C. reticulata</i> Osbeck	Tangerina
	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Laranja doce
	<i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka	Laranja tachibana
	<i>C. medica</i> L.	Cidra
Papeda	<i>C. celebica</i> Koord.	Papeda celebes
	<i>C. hystrix</i> DC.	Papeda Mauritius
	<i>C. ichangensis</i> Swingle	Papeda ichang
	<i>C. latipes</i> (Swingle) Tanaka	Papeda khasi
	<i>C. macroptera</i> Montrouz.	Papeda Melanesia
	<i>C. micrantha</i> Wester	Papeda de flor pequena

Adaptado de Machado *et al.* (2005)

2.3.1 Taxonomia do gênero *Citrus*

Parte da complexidade filogenética e taxonômica observada em *Citrus* deveu-se às particularidades da sua biologia reprodutiva e da sua ampla história de cultivo (Araújo e Roque, 2005). A fraca barreira reprodutiva permite a livre hibridação entre as espécies e alguns gêneros próximos, gerando híbridos viáveis e com características intermediárias. O fenômeno de poliembrionia nucelar – formação de embriões a partir do tecido nucelar materno – permitiu que os híbridos se perpetuem como clones apomíticos e mantenham a estabilidade genética. A somatória desses dois processos associada à longa história de cultivo dos *Citrus* resultou na complexa taxonomia deste gênero. Desta forma, muitas espécies de *Citrus* podem ser, na verdade, híbridos propagados por apomixia (Barrett e Rhodes, 1976; Herrero *et al.*, 1996a).

Diversos estudos procuraram solucionar o problema taxonômico de *Citrus*. Barrett e Rhodes (1976) realizaram um extensivo trabalho baseado em marcadores morfológicos, indicando a existência de dois grupos principais de *Citrus*: 1) *C. aurantium*, *C. grandis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* e *C. sinensis* e 2) *C. medica*, *C. limon* e *C. aurantifolia*. Os gêneros relacionados *Eremocitrus* e *Microcitrus* formaram um terceiro grupo. Os autores também sugeriram que em *Citrus* existam apenas três espécies puras: *C. grandis*, *C. reticulata* e *C. medica*, sendo as demais espécies consideradas biótipos únicos, perpetuados apomiticamente e, provavelmente, de origem híbrida.

A utilidade de um traço particular na sistemática é inversamente proporcional a probabilidade de que fenótipos similares tenham surgido de diferentes genótipos. Para traços morfológicos, essa probabilidade é alta devido ao fato da maioria dos traços serem influenciados por vários genes, alguns desconhecidos, bem como pelo ambiente. Entretanto, com a utilização de marcadores moleculares os alelos são conhecidos e a probabilidade é baixa (Roose *et al.*, 1988).

Posteriormente, outros relatos baseados em marcadores bioquímicos (Potvin *et al.*, 1983; Handa *et al.*, 1986; Herrero *et al.*, 1996b) também sugeriram a separação do gênero *Citrus* em outros dois grupos. O mesmo foi observado por Asíns *et al.* (1998) que propôs os grupos laranja–tangerina e lima–limão–cidra–toranja.

Herrero *et al.* (1996b) analisaram a espécie *C. halimii* B. C. Stone, sugerida como a possível quarta espécie pura do gênero. Os dados baseados em dez sistemas enzimáticos concordaram com a suposição de espécie pura, uma vez que esta espécie ficou unida ao *Citrus*, porém sem se inserir em nenhum dos dois grandes grupos. Federici *et al.* (1998), utilizando RFLPs (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), observaram quatro fragmentos únicos para esta espécie, um número relativamente alto, enfatizando a sua diferenciação das outras espécies de *Citrus*. Possivelmente a separação geográfica entre *C. hamilii*, natural da região de Tailândia e Malásia, das demais espécies do gênero tenha reforçado a separação desta espécie.

O grupo das tangerinas foi analisado por diversos pesquisadores, porém, até o momento, ainda não se obteve uma clara definição da sistemática deste grupo tão diverso. Federici *et al.* (1998) analisaram os dados de duas formas: retirando ou deixando as outras espécies cítricas supostamente híbridas. Quando os possíveis híbridos foram removidos, os 15 acessos de

tangerina formaram um único agrupamento, porém quando os híbridos foram incluídos tangerinas formaram três grupos. A quebra do grupo em três ocorreu devido ao agrupamento de algumas tangerinas com outras espécies híbridas. Fang e Roose (1997) observaram nas tangerinas uma maior variabilidade interna, em comparação com os outros grupos analisados (laranjas, limões, *Poncirus*). Nicolosi *et al.* (2000) realizaram duas abordagens, RAPD (do inglês, **R**andom **A**mplified **P**olymorphism **D**N $\mathbf{A}$) e SCAR (do inglês, **S**equ $\mathbf{e}$ nce **C**haracterized **A**mplified **R**egions), bem como DNA de cloroplasto. As tangerinas foram consideradas espécies puras também por esses autores, tendo participado na formação de outras espécies de *Citrus*, como lima ‘Rangpur’, limão rugoso, laranja-doce (*C. grandis* $\times$ *C. reticulata*, compartilhando 35 dos 71 marcadores com a primeira espécie e 36 com a segunda) e laranja-azeda (*C. grandis* $\times$ *C. reticulata*, compartilhando 42 dos 84 marcadores com a primeira espécie e 36 com a segunda). As toranjas (*C. grandis*) foram consideradas o parental materno nessas duas hibridações e em outras, enquanto a tangerina (*C. reticulata*) foi o parental doador de pólen (Nicolosi *et al.*, 2000).

Os pomelos (*Citrus paradisi*), supostos híbridos entre toranja $\times$ laranja-doce, foram analisados em alguns trabalhos que demonstraram a sua origem híbrida. Curiosamente, embora esta espécie seja considerada um híbrido natural surgido no Caribe, não há relatos da sua ocorrência natural na Ásia, onde seus supostos ancestrais seriam nativos (Bowman e Gmitter, 1990) e outros híbridos de toranja seriam conhecidos (Hodgson, 1967). Handa *et al.* (1986) analisaram a filogenia com base na variabilidade eletroforética das subunidades maior e menor da rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) e posicionaram os pomelos junto das laranjas-doces em um grupo com padrão heterozigoto, sugerindo que sejam híbridos. A toranja foi posicionada, sozinha, em outro grupo com padrão homozigoto. As diferentes cultivares de pomelos são originárias de um pequeno estoque introduzido na Flórida em 1893 (Bowman e Gmitter, 1990). Desse material ‘Duncan’, ‘Marsh’ e ‘Walters’ foram selecionadas e posteriormente deram origem a todas as demais cultivares via mutação somática (Gmitter, 1993). Contudo, análises de sistemas enzimáticos dividiram os pomelos em dois grupos (Herrero *et al.*, 1996a). Alguns autores reportaram que a cultivar ‘Marsh’ parece não ter sido originada via mutação somática de um ramo e, sim, de semente, podendo ser de origem zigótica (Robinson, 1933), o que poderia explicar essa diferenciação genética em dois grupos.

Apesar de ter sido empregado um grande esforço na busca de um melhor entendimento da sistemática do *Citrus* e gêneros relacionados, pouco se elucidou. Provavelmente o problema está

no fato da maioria das taxa, em especial os silvestres, estarem pouco representados deixando a diversidade genética natural do grupo pouco representada (Roose *et al.*, 1988).

Tomando-se o exemplo das tangerinas, é possível observar que as espécies apresentam relações filogenéticas muito variáveis entre diferentes estudos. Cada artigo avaliou uma sub-amostra diferente e os agrupamentos formados são os mais diversos. Por exemplo, *C. tachibana*, uma das três espécies de tangerina proposta por Swingle e Reece (1967), frequentemente posicionou-se próximo ao clado das tangerinas (Yamamoto *et al.*, 1993; Federici *et al.*, 1998; de Araújo *et al.*, 2003). Nicolosi *et al.* (2000) sugeriram um agrupamento entre *C. tachibana* e *C. sunki*, uma das representantes de *C. reticulata* Blanco. Este agrupamento não é esperado, uma vez que as tangerinas foram formadas a partir de três estoques originais: chinês, japonês e indiano. *Citrus sunki* é oriunda do primeiro estoque, o qual não se diferencia do segundo, enquanto o terceiro, de onde se originou a *C. tachibana*, é claramente distinto. Portanto, este agrupamento entre *C. tachibana* e *C. sunki* não deve ser real.

2.3.2 Taxonomia dos gêneros relacionados

A subtribo Citrinae (tribo Citreae, subfamília Aurantioideae – Tabela 3) compreende 13 gêneros organizados em três grupos: 1) gêneros mais primitivos *Severina*, *Pleiospermium*, *Burkillanthus*, *Limnocitrus* e *Hesperethusa*; 2) gêneros próximos aos citros – *Citropsis* e *Atalantia*; 3) citros verdadeiros *Microcitrus*, *Eremocitrus*, *Clymenia*, *Poncirus*, *Citrus* e *Fortunella* (Swingle e Reece, 1967). A morfologia das vesículas de suco, que se originam da parede do lóculo, caracteriza a subtribo Citrinae e variações nestas vesículas podem diferenciar os três grupos. Os representantes dos citros verdadeiros, que inclui o gênero *Citrus* e outros cinco gêneros próximos (*Fortunella*, *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Clymenia* e *Microcitrus*) apresentam hesperídio mais desenvolvido, em comparação com os outros dois grupos, com vesículas que ocupam todo o espaço não ocupado por sementes (Machado *et al.*, 2005).

Uma forte associação entre os gêneros *Fortunella* e *Citrus* foi observada com frequência nas análises moleculares, algumas vezes não sendo possível separar os dois gêneros (Handa *et al.*, 1986; Yamamoto *et al.*, 1993; Herrero *et al.*, 1996b; Samuel *et al.*, 2001; de Araújo *et al.*, 2003). Nas análises realizadas por Federici *et al.* (1998) as espécies de *Fortunella* formaram um grupo dentro do clado de *Citrus*. Com base em dados morfológicos esses dois gêneros parecem bem diferenciados (de Araújo *et al.*, 2003), embora nas análises moleculares não apresentem o

mesmo nível de diferenciação. Herrero *et al.* (1996a) comentam que tais diferenças podem ser facilmente explicadas, uma vez que as análises morfológicas e moleculares são independentes e respondem a pressões seletivas diferentes.

Por outro lado, o gênero *Poncirus* ficou claramente separado do gênero *Citrus* em diferentes análises realizadas. Handa *et al.* (1986) sugerem que *Poncirus* tenha se separado antes na evolução do grupo. O mesmo foi sugerido por Barrett e Rhodes (1976) analisando marcadores morfológicos, Yamamoto *et al.* (1993) utilizando marcadores do tipo RFLP e Herrero *et al.* (1996b) estudando sistemas enzimáticos. As características de *Poncirus*, como perda sazonal das folhas (característica ausente em *Citrinae*), folhas trifoliadas, distribuição original na região do norte e centro da China (isolamento geográfico) e diferença na época de floração devem ter reforçado a separação entre os gêneros (Swingle e Reece, 1967; Herrero *et al.*, 1996b; de Araújo *et al.*, 2003).

2.4 Poliembrionia e apomixia no gênero *Citrus*

A poliembrionia caracteriza-se pela formação de mais de um embrião em uma única semente, sem a obrigatoriedade da fecundação. Este fenômeno tem sido observado em espécies de diversas famílias como Rutaceae, Mirtaceae e Anacardiaceae, além das gimnospermas (Raven *et al.*, 1999; Cavalli, 2003).

Em *Citrus* a poliembrionia pode ser causada por alguns processos: A) embriões provenientes de sacos embrionários diferentes, B) embriões provenientes de clivagem do embrião sexual ou C) embriões provenientes do crescimento e diferenciação de células da nucela (tecido materno presente no óvulo). Este último exemplo é a principal fonte de poliembrionia em *Citrus*, sendo chamada de poliembrionia nucelar.

A poliembrionia nucelar envolve o processo de apomixia – método de reprodução assexual com formação de sementes. O tecido nucelar é materno, fazendo com que o embrião oriundo deste tecido apresente composição genética idêntica à da planta-mãe. Isso explica por que muitas plantas de *Citrus* são de origem assexuada (Frost e Soost, 1968).

Tabela 3: Distribuição de tribos, subtribos e gêneros da subfamília Aurantioideae

Tribo	Subtribo	Gênero	Número de espécies
Clauseneae	Micromelinae	<i>Micromelum</i>	09
	Clauseninae	<i>Clausena</i>	23
		<i>Glycosmis</i>	35
		<i>Murraya</i>	11
	Merrillinae	<i>Merrillia</i>	01
Citreae	Triphasiinae	<i>Luvunga</i>	12
		<i>Merope</i>	01
		<i>Monanthocitrus</i>	01
		<i>Oxanthera</i>	04
		<i>Pamburus</i>	01
		<i>Paramignya</i>	15
		<i>Triphasia</i>	03
		<i>Wenzelia</i>	15
	Citrinae	<i>Burkillanthus</i>	01
		<i>Hesperethusa</i>	01
		<i>Limnocitrus</i>	01
		<i>Pleiospermium</i>	05
		<i>Severinia</i>	06
	Grupo de árvores próximas ao <i>Citrus</i>	<i>Atalantia</i>	11
		<i>Citropsis</i>	11
	Grupo dos verdadeiros <i>Citrus</i>	<i>Citrus</i>	16
		<i>Clymenia</i>	01
		<i>Eremocitrus</i>	01
		<i>Fortunella</i>	04
		<i>Microcitrus</i>	06
		<i>Poncirus</i>	01
	Balsamocitrinae	<i>Aegle</i>	01
		<i>Aeglopsis</i>	02
		<i>Afraegle</i>	04

<i>Balsamocitrus</i>	01
<i>Feronia</i>	01
<i>Feroniella</i>	03
<i>Swinglea</i>	01

Adaptado de Machado *et al.*, 2005

2.5 Citogenética

Os estudos baseados apenas no número e morfologia dos cromossomos restringiam as análises citogenéticas a espécies de cromossomos grandes e grupos que apresentassem variação no número cromossômico. Contudo, as técnicas de bandejamento em cromossomos mitóticos, introduzidos no início da década de 1970, adicionaram novos parâmetros na caracterização cromossômica. Essas técnicas se fundamentam na coloração diferencial de determinados segmentos cromossômicos com propriedades distintas, gerando variações entre os cromossomos. Os padrões observados para cada espécie – ou variedade – permitem relacionar diversos grupos, ampliando os estudos de evolução cariotípica em diversas espécies vegetais.

2.5.1 Bandeamentos cromossômicos

A primeira técnica de bandejamento aplicada foi o bandejamento Q (Quinacrina), em 1968 por Caspersson *et al.* em cromossomos humanos, sendo possível reconhecer os 23 pares cromossômicos (revisado por Darlington e La Cour, 1976). Esta técnica revelou bandas nas regiões cromoméricas – regiões com padrão de condensação diferencial – provavelmente devido a interações DNA-proteínas. O padrão observado é semelhante ao do bandejamento G (Giemsa) e oposto ao apresentado pelo bandejamento R (Reversa).

Outra técnica é o bandejamento C que revela blocos de heterocromatina constitutiva (fração cromossômica rica em DNA satélite e de replicação tardia). Esta fração da cromatina é mais resistente à extração de DNA causada pelo processo de bandejamento, permanecendo como blocos ao final do processo (Appels *et al.*, 1998). Desta forma, diferentes padrões de bandas são visualizados para diferentes espécies. As mudanças observadas no padrão de bandejamento-C podem refletir mudanças na estratégia evolutiva das espécies, mantendo a taxa de recombinação

em situações que favoreçam a manutenção de um determinado genótipo ou aumentando a recombinação em condições de grande instabilidade ambiental (Guerra, 1985).

As regiões heterocromáticas podem eventualmente ser detectadas pelo uso de corantes fluorescentes, uma vez que essas regiões de DNA repetitivo freqüentemente apresentam uma proporção de bases púricas (adenina e guanina – A e G) ou pirimidínicas (citosina e timina – C e T) diferente do resto do genoma. Os fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA) e Mitramicina apresentam maior afinidade por seqüências ricas em GC, enquanto 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Quinacrina e Hoechst 33258 apresentam preferência por seqüências ricas em AT (Appels *et al.*, 1998). Entre esses, os fluorocromos CMA e DAPI são largamente utilizados no bandejamento cromossômico, revelando um número variável de regiões brilhantes, ou positivas, com CMA (banda CMA⁺) ou com DAPI (banda DAPI⁺). Freqüentemente bandas negativas, mais escuras que o restante do cromossomo, ocorrem na mesma posição das bandas positivas do fluorocromo complementar (Jacobs *et al.*, 2000). As bandas também podem ser neutras (CMA⁰ ou DAPI⁰). O padrão revelado pela banda C freqüentemente se correlaciona com as bandas observadas no bandejamento CMA/DAPI (Guerra 1985; 1993), porém não são necessariamente idênticos (Carvalho e Guerra, 2002; Moraes e Guerra, 2006). O bandejamento CMA/DAPI apresenta algumas vantagens sobre o bandejamento C, por ser mais prático, reprodutível e informativo, indicando se o bloco heterocromático é rico em GC ou AT, além de conservar mais a morfologia cromossômica.

Com a utilização das diversas técnicas de bandejamento é possível analisar a evolução cariotípica de alguns grupos de espécies a partir dos rearranjos cromossômicos. Um exemplo dessa aplicação foi descrito por Guerra (1988) em *Eleutherine bulbosa* (Mih.) Urban, uma planta com cariótipo bimodal (cariótipo com cromossomos divididos em dois grupos, os maiores e os menores, sem que haja uma variação gradativa entre eles). O heteromorfismo observado no par grande presente em *E. bulbosa* sugere uma inversão pericentromérica que foi confirmada com a utilização das técnicas de bandejamento C, CMA e DAPI. A região invertida correspondeu a 70% do cromossomo, mudando a posição do centrômero (inversão pericêntrica) e das bandas CMA e DAPI. A origem deste par cromossômico maior foi analisada através da comparação com *E. latifolia*, uma espécie próxima. Os dados mostraram que o cariótipo original do gênero teria um par de acrocêntricos grandes e que o cromossomo metacêntrico surgiu de uma espécie

cariotipicamente muito semelhante a *E. latifolia*, por uma inversão de um dos acrocêntricos grandes (M. Guerra, comunicação pessoal).

Jacobs *et al.* (2000), analisaram duas espécies de *Pinus* através de bandeamento sequencial com banda C e CMA/DAPI, permitindo diferenciar *P. taeda* de *P. radiata*. Nas duas espécies analisadas as bandas CMA⁺ estavam presentes na constrição secundária dos seis cromossomos, em ambas as espécies, e nas regiões proximais de *P. taeda*. As bandas DAPI⁺ foram observadas nas regiões proximais de *P. radiata*, apresentando diferentes posições e números de bandas.

2.5.2 Hibridização *in situ*

O desenvolvimento da HIS (**H**ibridização **I**n **S**itu) marcou a transição da era da citogenética clássica para a era da citogenética molecular (Jiang e Gill, 2006). A técnica de HIS surgiu da interação entre os conhecimentos de biologia molecular e citogenética, baseando-se no fato do DNA ser formado por duas fitas complementares, as quais podem ser facilmente desnaturadas e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Se no momento da renaturação das fitas de DNA houver fragmentos de DNA marcados (sonda) disponíveis, os mesmos hibridizarão na região de homologia dentro da célula, permitindo a sua localização precisa, tanto em cromossomos, como em núcleos interfásicos (Guerra, 2004).

A HIS foi utilizada pela primeira vez por Gall e Pardue (1969). Inicialmente, as sondas eram marcadas radiotivamente, porém, atualmente têm-se utilizado a marcação não-isotópica. Esta técnica vêm sendo muito utilizada na citogenética animal, humana, clínica – onde análises realizadas rapidamente em núcleos interfásicos permitem diagnosticar translocações, duplicações e trissomias (Vianna-Morgante, 2004; Rogatto e Rainha, 2004), assim como em vegetais. As sondas não-isotópicas utilizam principalmente as moléculas digoxigenina e a biotina que são hibridizadas nos cromossomos espalhados na lâmina e detectadas com a utilização de anticorpos, ou outros reagentes com afinidade aos haptenos, conjugados com fluorocromos (Trask, 1991). Com a utilização dos fluorocromos a técnica de HIS começou a ser chamada também por FISH (do inglês, **F**luorescent **I**n **S**itu **H**ybridization). Outra opção para a visualização da sonda é marcá-la diretamente com fluorocromo, como, por exemplo, o corante Cy3.

As seqüências repetitivas em tandem como, por exemplo, os genes para RNA ribossomais e as seqüências centroméricas e teloméricas, são mais facilmente visualizadas nos cromossomos,

uma vez que o sítio alvo é bastante grande (Koorneef *et al.*, 2003), representando os principais tipos de sonda. Um exemplo da utilização de seqüências de DNA repetitivo no reconhecimento individual dos pares cromossômicos foi relatado por Kato *et al.* (2004), em milho, utilizando nove sondas repetitivas detectadas simultaneamente. Entre as seqüências de DNA repetitivo, os fragmentos de DNA ribossomal (DNAr) 18S e 25S (ou a unidade inteira, o DNAr 18S - 5,8S - 25S, chamada de DNAr 45S) e 5S são as mais utilizadas, gerando marcadores úteis para a identificação cromossômica, proporcionando informações valiosas sobre as relações evolutivas e filogenéticas entre gêneros e espécies.

Os sítios de DNAr 5S e 45S foram localizados, por FISH, em diversos grupos vegetais, tais como as pteridófitas *Acrostichum* e *Selaginella* (Marcon *et al.*, 2003; 2005); as gimnospermas *Pinus* (Jacobs *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003) e inúmeras angiospermas (como, por exemplo, Ran *et al.*, 2001; Guerra e García, 2004; Carvalho *et al.*, 2005; Ruas *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2006; Pedrosa-Harand *et al.*, 2006; Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007). Em *Selaginella*, Marcon *et al.* (2005) observaram uma grande variação no número de sítios de DNAr 45S, inclusive entre espécies com o mesmo número cromossômico, permitindo diferenciá-las com este marcador. Vaio *et al.* (2005) analisaram espécies diplóides e tetraplóides de *Paspalum*, visando entender a origem do citótipo tetraplóide *P. quadrifolium* 4x. Os dados de DNAr concordaram com os dados de filogenia baseada em DNA de cloroplasto, apesar de observar uma incongruência quanto ao número de sítios de DNAr 45S, provavelmente oriunda dos rearranjos pós-poliploidização, causando a perda de genes ribossomais 45S. Resultado semelhante foi observado por Li e Arumuganathan (2001) em milho, onde apenas um par de sítios de DNAr 5S e 45S foi observado neste poliplóide, provavelmente devido à re-organização genômica ocorrida no processo de diploidização.

Com o aprimoramento da técnica de FISH, tornou-se possível visualizar sondas de seqüências de cópia única de DNA, permitindo verificar a posição de genes e marcadores moleculares, sendo muito útil na união e alinhamento dos mapas genéticos e cromossômicos (Pedrosa *et al.*, 2002). Contudo, a baixa sensibilidade da FISH é o fator limitante na hibridização das seqüências de cópia única, devido ao diminuto tamanho das mesmas. Visando superar o obstáculo imposto pelo limitado nível de sensibilidade da técnica, o emprego de seqüências de DNA maiores apresentou-se como uma das soluções. Pedrosa *et al.* (2003), realizando a integração do mapa genético consenso aos cromossomos do feijão, optaram por utilizar conjuntos

de RFLPs como sonda, uma vez que cada RFLP isolado variava de tamanho entre 0,5 – 2,5 Kb, abaixo do nível de sensibilidade da FISH.

Contudo, a utilização de vetores que suportem grandes insertos de DNA genômico, como os YAC (*Yeast Artificial Chromosome*, suporta até 1.400 kb), BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*, suporta até 300 kb) e PAC (*P1 derivated Artificial Chromosome*, suporta até 300 kb), é a opção mais utilizada para que se contornem os problemas associados com a sensibilidade da hibridização (de Jong *et al.*, 1999). Apesar do YAC permitir a clonagem de insertos maiores, o BAC é o sistema mais utilizado para clonagem de grandes fragmentos genômicos, devido ao alto índice de quimerismo nos insertos clonados em YACs (Jackson *et al.*, 1999).

2.5.3 Bibliotecas genômicas e mapeamento físico de cromossomos

As bibliotecas de DNA genômico representam uma importante fonte de seqüências para o mapeamento físico, análise estrutural do genoma, genômica comparativa e seqüenciamento do genoma, além de ser uma fonte de seqüências únicas para o mapeamento cromossômico (Hasterok *et al.*, 2006).

O vetor derivado do BAC é amplamente utilizado para clonagem de grandes insertos, sendo o vetor mais utilizado na construção de bibliotecas genômicas. Este vetor é baseado no fator F da bactéria *Escherichia coli*, um plasmídeo mantido em baixo número na célula (de uma a duas cópias), que controla a própria replicação e o seu número de cópias (Shyzuya *et al.*, 1992). Desta forma, o nível de quimerismo é reduzido, o que representa uma grande vantagem dos BACs sobre os YACs. Os BACs apresentam mais duas vantagens em relação aos YACs: são de fácil manipulação; uma vez que os BACs apresentam-se super enrolados (*super-coiled*), é mais difícil quebrá-los durante a manipulação, enquanto os YACs, por serem lineares, costumam quebrar mais facilmente (Shyzuya *et al.*, 1992).

O mapeamento físico vem sendo realizado principalmente por três metodologias (Jackson *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001; Primose, 2003; Jiang e Gill, 2006): 1) *contigs* de DNA – os *contigs* de DNA podem ser unidos por *fingerprinting* de clones com grandes insertos de DNA; 2) estoques citogenéticos – marcadores de DNA mapeados geneticamente são localizados fisicamente pela análise de indivíduos com translocações, ou deleções, variadas. Contudo essa metodologia não oferece alta resolução e enfrenta problemas no mapeamento de espécies diplóides; 3) FISH de seqüências de DNA – permite localizar a seqüência de DNA diretamente no cromossomo.

Freqüentemente esta sequência apresenta uma única cópia no genoma e está localizada no mapa genético, permitindo relacionar os grupos de ligação, do mapa genético, e os cromossomos, do mapa físico. Os mapas gerados a partir destas duas últimas metodologias também são chamados mapa citogenéticos.

Freqüentemente, a geração de sondas a partir das bibliotecas de BACs consiste em (i) selecionar clones de DNA genômico que possuam sequências já mapeadas geneticamente (*screening*), (ii) confirmar a correlação entre o marcador e o clone (*Southern-blot*) e, então, (iii) marcar o clone de BAC selecionado e utilizá-lo como sonda na FISH (Pedrosa *et al.*, 2003). Esta metodologia já permitiu realizar o mapeamento cromossômico em diversas espécies vegetais, como *Brachypodium distachyon* L. (Hasterok *et al.*, 2006), *Brassica oleracea* L. (Howell *et al.*, 2002), *Oryza sativa* L. (Cheng *et al.*, 2001), permitindo tanto posicionar genes de interesse agrônomo, como integrar mapas genéticos, físicos e cromossômicos.

As hibridizações *in situ* com BACs também foram utilizadas para gerar pinturas cromossômicas em *Arabidopsis thaliana* (Lysak *et al.*, 2001; 2003), auxiliando em estudos comparativos entre *A. thaliana* e *Brassica* (Jackson *et al.*, 2000; Lysak *et al.*, 2005; 2006; Lysak e Lexer, 2006; Ziolkowski *et al.*, 2006), proporcionando uma visualização direta da colinearidade entre os dois gêneros, identificando-se as duplicações genômicas em *Brassica* (Jiang e Gill, 2006). A partir de hibridizações *in situ* utilizando pinturas de segmentos cromossômicos de *A. thaliana* em espécies de *Brassica*, observa-se que o genoma de *A. thaliana* está triplicado no genoma de *Brassica* (Lysak *et al.*, 2005), indicando a ocorrência de uma duplicação anterior à separação *A. thaliana/Brassica* e um novo evento de poliploidização no ramo que deu origem às *Brassicaceae* (Ziolkowski *et al.*, 2006). Rearranjos cromossômicos foram observados por Pedrosa *et al.* (2002) em *Lotus* a partir de hibridizações *in situ* com BACs, verificando a presença de inversões entre duas espécies relacionadas, *L. japonicus* Gifu e *L. filicaulis* Durieu, permitindo avaliações quanto à evolução cariotípica do grupo.

A análise a partir da FISH em cromossomos mitóticos gera mapas citogenéticos com resolução limitada, uma vez que as sondas de DNA separadas por várias megabases de DNA não podem ser resolvidas com o padrão de condensação destes cromossomos. Portanto, FISH em cromossomos meióticos, em especial na fase de paquíteno, junto com a técnica de fibras estendidas, adicionam novas ferramentas ao arsenal disponível para mapeamento físico de alta resolução (Cheng *et al.*, 2001). Enquanto os cromossomos metafásicos são altamente condensados,

os cromossomos paquitênicos são 10-40 vezes menos condensados, apresentando um padrão heterocromático diferenciado e permitindo que a orientação centrômero-telômero seja visualizada, mesmo nos casos de BACs muito próximos (Franz *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001; Kulikova *et al.*, 2001). Cheng *et al.* (2001) observaram que sondas separadas por apenas 40 kb puderam ser resolvidas utilizando cromossomos paquitênicos de arroz. Todavia, a elaboração de lâminas de cromossomos paquitênicos, em comparação com as de cromossomos metafásicos, é bem mais laboriosa e os resultados podem apresentar alguma variação entre espécies relacionadas e genótipos da mesma espécie, provavelmente devido a artefatos da técnica (Kulikova *et al.*, 2001).

No caso de FISH em fibras estendidas de DNA, as fibras de DNA são liberadas dos núcleos e espalhadas sobre a lâmina (Guerra, 2004). Cheng *et al.* (2001) mapearam o BAC 56G17 adjacente à sequência repetitiva Os48 no cromossomo 10 de arroz, sendo que essas duas sequências podem ser resolvidas apenas em cromossomos paquitênicos. A hibridização em fibras distendidas dessas duas sequências geraram sinais independentes, separados por 40 ± 2 kb, demonstrando a alta capacidade de resolução da técnica.

2.6 Citogenética do gênero *Citrus*

Os estudos citogenéticos em *Citrus* foram iniciados por Strasburger em 1907 e Osawa em 1912 descrevendo, erroneamente, o número haplóide $n=8$ para o gênero e número mitótico “acima de 14, provavelmente 16” (citado por Krug, 1943). Contudo, a primeira contagem correta foi realizada por Frost (1925) em meiócitos de laranjas-doces e pomelos. O pequeno tamanho dos cromossomos e algumas limitações técnicas da época, provavelmente, foram os responsáveis pelas contagens equivocadas dos primeiros autores. Os trabalhos em citogenética de *Citrus* inicialmente foram desencorajados também devido à morfologia similar dos cromossomos (Krug, 1943).

Considerando a grande diversidade da subfamília Aurantioideae e o grande número de espécies do gênero *Citrus*, presentes em diferentes condições ecológicas, poderia-se esperar variações quanto ao número cromossômico, porém o valor de $2n=18$ é constante, considerando os membros da tribo Citreae analisados até o momento (ver Guerra, 1984; Guerra *et al.*, 1997). Naithani e Raghuvanshi (1958) especularam que o número diplóide $2n=18$ parece ser a condição fisiológica ótima no gênero *Citrus*, afirmação que certamente poderia ser expandida para toda subfamília. Contudo, os gêneros *Clausena* e *Glycosmis*, da tribo Clausena, configuram exceções

ao número cromossômico $2n=18$, apresentando $2n=36$ e $2n=54$, respectivamente (Guerra *et al.*, 2000).

Indivíduos poliplóides, raros em *Citrus*, configuram outra exceção ao número $2n=18$. Esses indivíduos poliplóides, frequentemente, apresentam-se menos adaptados em relação aos indivíduos diplóides. As plantas poliplóides tendem a possuir folhas mais largas, espessas e escuras; a árvore é menor, menos ereta, com menor floração e frutificação. Os frutos apresentam casca mais grossa e estrutura interna mais fibrosa (Krug e Bacchi, 1943; Raghuvanshi, 1962; Machado *et al.*, 2005). Os poucos poliplóides espontâneos no gênero podem ser oriundos de três processos: A) duplicação do complemento cromossômico nas células nucleares, resultando na formação de embriões nucleares poliplóides, B) formação de gametas não-reduzidos, C) duplicação do complemento cromossômico de células meristemáticas (Raghuvanshi, 1962).

Os poliplóides induzidos são obtidos a partir da fecundação de plantas tetraplóides (óvulo diplóide) com plantas diplóides (grãos de pólen haplóides), embora o inverso também seja realizado, gerando embriões triplóides (Soost e Cameron, 1980; 1985). Entre os poliplóides de *Citrus*, nenhum alcançou grande importância econômica, à exceção do limão 'Tahiti' (*C. latifolia* Tan; Krug, 1943). Esta espécie triplóide, pertencente ao grupo das limas ácidas, se destaca como uma das principais frutas cítricas por ter frutos suculentos, casca fina, apresentar boa produtividade e não possuir sementes, uma característica importante em frutos destinados ao consumo (Krug e Bacchi, 1943). Outra forma adicional na obtenção de poliplóides em *Citrus* é a partir da cultura de tecidos, em especial a fusão de protoplastos (Miranda *et al.*, 1997c; Guo *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2005).

A análise meiótica do gênero *Citrus* mostrou-se regular, com a formação de nove cromossomos bivalentes, podendo ocorrer algumas alterações como pontes anafásicas, cromossomos univalentes e fragmentos, devido à freqüente ocorrência de inversões em heterozigose (Raghuvanshi, 1962). A meiose em híbridos intergenéricos e interespecíficos diplóides apresentou comportamento regular, sugerindo alta homeologia cromossômica entre os gêneros *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* (Agarwal, 1987a; b). Iwamasa e Nito (1988), observaram um completo pareamento na meiose de híbridos intergenéricos de *Citrus* com *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus* e *Eremocitrus*, sugerindo que os mesmos seriam derivados de um mesmo ancestral.

Alguns autores observaram associações secundárias de três bivalentes na metáfase I, em diferentes híbridos, sugerindo uma remota afinidade entre estes cromossomos (Sharma e Bal, 1957; Naithani e Raghuvanshi, 1958; Agarwal, 1987a; b). Agarwal (1987b) sugeriu, com base nestes dados, que o verdadeiro número básico do *Citrus* seja $x=3$. Entretanto, $x=9$ foi considerado o número básico do *Citrus* por grande parte dos autores. Supondo-se $x=3$ seria esperada a formação de indivíduos com variados números cromossômicos, o que não é observado no gênero.

2.6.1 Bandeamento cromossômico

Os cromossomos de *Citrus* são pequenos (1 a 3,5 μm) e similares morfológicamente (sub-metacêntricos), fazendo com que as análises realizadas apenas com coloração convencional sejam muito difíceis e pouco informativas. A primeira tentativa de diferenciar os cromossomos foi realizada por Sharma e Bal (1957), a partir da análise do cariótipo de dez acessos distribuídos em quatro espécies de *Citrus*. Os cromossomos foram classificados em dez tipos diferentes com base no tamanho, posição do centrômero e posição do satélite, permitindo, segundo os autores, separar todos os acessos analisados. Contudo, essa análise não foi repetida por nenhum autor por não ser confiável para cromossomos pequenos e similares, como os de *Citrus*, pois pequenos desvios na interpretação dos parâmetros puderam levar facilmente a erros de identificação.

As técnicas de bandeamento tornaram possíveis análises mais confiáveis da estrutura e variabilidade cromossômica. O bandeamento C em *Citrus* mostrou numerosos blocos heterocromáticos, principalmente nas regiões terminais dos braços cromossômicos e alguns poucos nas regiões proximais (Guerra, 1985). As bandas terminais variaram em tamanho e localizaram-se nos braços longos (Guerra, 1993). Ito *et al.* (1993), utilizando outra técnica de bandeamento, HKG, relataram a presença de bandas proximais em todos os cromossomos de *Citrus*. Contudo, o resultado diferente obtido por estes pesquisadores deve-se, provavelmente, à variação na técnica. A presença das bandas está ligada ao tempo de envelhecimento do material e ao tratamento a que o material é submetido. A partir do momento que se realizam alterações importantes na técnica, ou técnicas de bandeamento diferentes, outras bandas heterocromáticas podem ser reveladas. Portanto, os dados obtidos de diferentes técnicas devem ser comparados com cuidado, uma vez que podem estar revelando diferentes tipos de heterocromatina.

O bandeamento C pode afetar a morfologia do cromossomo e o padrão de bandeamento sofre variação até entre metáfases da mesma lâmina. Em vista disto, Guerra (1993) realizou a técnica de bandeamento com coloração seqüencial de CMA/DAPI, revelando grandes blocos brilhantes com CMA. Segundo o autor, esta técnica de bandeamento permite uma melhor conservação da morfologia cromossômica com alta reprodutividade dos resultados.

O bandeamento CMA/DAPI revelou um padrão de bandas semelhante ao observado com o bandeamento C, sendo que todas as bandas observadas foram CMA⁺. Os cromossomos foram classificados de acordo com o número e localização das bandas CMA⁺, permitindo realizar inferências quanto à evolução e à origem de alguns grupos de *Citrus* (Guerra, 1993).

O trabalho original de Guerra (1993), com seis espécies de *Citrus*, descreveu apenas cinco tipos cromossômicos. Porém, subsequentemente esses tipos foram revistos e ampliados. Matsuyama *et al.* (1996) propuseram outra nomenclatura, também baseada em CMA/DAPI, contudo ela não foi utilizada por outros autores. Atualmente duas nomenclaturas são utilizadas: a descrita por Carvalho *et al.* (2005), que revisa e amplia Guerra (1993) e a proposta por Miranda *et al.* (1997a), que também se baseia em Guerra (1993) com uma sutil diferença (o cromossomo sem banda é chamado de E, ao invés de F). A figura 1 representa esquematicamente os tipos propostos por Carvalho *et al.* (2005), atualizados por Lemos (2005).

Os tipos cromossômicos podem ser subdivididos em dois grupos: comuns e marcadores. Os cromossomos D (uma banda CMA⁺ terminal) e F (sem banda CMA⁺) fazem parte do primeiro grupo, uma vez que são numerosos e estão presentes em todos os acessos analisados até então. O tipo F_L (F_{Larger}) é uma variante do tipo F, que pode se apresentar também sem banda (F_L⁰) ou com uma pequena banda (F_L⁺). O segundo grupo é composto pelos cromossomos A (três bandas CMA⁺, duas terminais e uma proximal), B (duas bandas CMA⁺, uma terminal e uma proximal), C (duas bandas CMA⁺ terminais), E (uma banda CMA⁺ intersticial), G (duas bandas CMA⁺, uma subterminal e uma terminal) e H (uma banda CMA⁺ proximal). Este grupo não está em todos os acessos e, quando presente, estão em pequeno número, sendo muito úteis na diferenciação dos acessos (Pedrosa *et al.*, 2000; Cornélio *et al.*, 2003; Yamamoto e Tominaga, 2003; Carvalho *et al.*, 2005). Estes tipos cromossômicos são encontrados em espécies de *Citrus*, assim como em espécies de gêneros relacionados dentro da subtribo Citrineae (Barros-Silva e Guerra, 2006; Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007).

2.6.2 Análise conjunta CMA/DAPI e FISH

A FISH das seqüências de DNAr 5S e 45S adicionou novos marcadores no estudo cariotípico das espécies de *Citrus* e gêneros relacionados. A associação da FISH com o bandejamento CMA/DAPI gerou oito novos tipos cromossômicos: B/45S (cromossomo B com um sítio de DNAr 45S co-localizado com a banda CMA⁺ proximal), B/5S-45S (cromossomo B com um sítio de DNAr 5S adjacente ao sítio de DNAr 45S co-localizado com a banda CMA⁺ proximal), C/45S (cromossomo C com um sítio de DNAr 45S co-localizado com uma das bandas CMA⁺ terminais), C/5S-45S (cromossomo C com um sítio de DNAr 5S adjacente ao sítio de DNAr 45S co-localizado com uma das bandas CMA⁺ terminais), D/5S (cromossomo D com um sítio de DNAr 5S adjacente à banda CMA⁺), D/45S (cromossomo D com um sítio de DNAr 45S co-localizado com a banda CMA⁺), D/5S-45S (cromossomo D com um sítio de DNAr 5S adjacente ao sítio de DNAr 45S co-localizado com a banda CMA⁺) e F/5S (cromossomo F com um sítio de DNAr 5S subterminal). O cromossomo A apresenta sempre um sítio de DNAr 45S na banda CMA⁺ proximal, sem adicionar nenhuma diferenciação extra (Matsuyama *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 1997a; 1997b; Carvalho *et al.*, 2005; Barros-Silva e Guerra, 2006; Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007).

Essas duas abordagens foram aplicadas em diversas espécies/acessos de *Citrus* e de gêneros relacionados. Aproximadamente 100 acessos foram analisados com CMA/DAPI e mais da metade foi analisado com FISH com seqüências de DNAr 5S e 45S. Entre esses, alguns acessos de laranjas-doces foram estudados (Matsuyama *et al.*, 1996; Befu *et al.*, 2000; Pedrosa *et al.*, 2000), sempre indicando a mesma fórmula cromossômica heterogênea, 2B/45S + 2C + 1D/5S-45S + 6D + 7F. Essa heterozigotidade observada está atribuída à origem híbrida de *C. sinensis*, a partir do cruzamento entre *C. grandis* (toranja) e *C. reticulata* (tangerina). A laranja-azeda é outra espécie híbrida envolvendo a toranja, porém desta vez cruzando com a tangerina (Scora, 1975; Barret e Rhodes, 1976). Guerra (2007) analisou oito acessos de *C. aurantium* L. observando sempre a presença de cromossomos do tipo A, reforçando a indicação da toranja como parental. A presença do cromossomo F/5S, originário da toranja, também foi encontrado em alguns acessos de laranja-azeda. *Citrus grandis* é uma espécie monoembriônica e diferentes combinações cromossômicas podem estar presentes nos embriões oriundos da toranja, assim como diversas fórmulas cromossômicas foram descritas para esta espécie (Befu *et al.*, 2000; 2001; 2002). Yang *et al.* (2002) analisaram diversos indivíduos diplóides e poliplóides oriundos

do cruzamento entre dois acessos de toranja, observando que a composição dos mesmos foi muito variável (13 combinações em 38 indivíduos diplóides; três tipos em seis indivíduos triplóides; dois tipos em três tetraplóides).

A partir da variabilidade dos indivíduos derivados de *C. grandis*, somada à diversidade das tangerinas, uma gama de fórmulas cromossômicas poderia ser esperada. Contudo, observou-se uma constância da fórmula cromossômica em diferentes acessos de laranja-doce, possivelmente explicada pela origem monofilética associada à mutação somática e seleção dos clones assexuais (Pedrosa *et al.*, 2000).

Citrus medica (cidra), considerada uma das espécies puras do gênero, apresenta cariótipo homomórfico, $2B + 8D + 8F$, e constante nos relatos da literatura (Befu *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2005). A análise da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S reforça a condição pura deste taxa, apresentando um par de D/5S e um par de B/45S (Carvalho *et al.*, 2005). A cidra faz parte de um grupo de espécies relacionadas composta pelos limões, limas, cidras e toranjas (Asíns *et al.*, 1998), sendo o limão e a lima supostamente derivados da cidra. Os cariótipos definidos para os limões e as limas foram heteromórficos, concordando com as suas origens híbridas. A heterogeneidade observada nos cromossomos de limões concorda com a heterozigosidade genética revelada por marcadores morfológicos, moleculares e padrões isoenzimáticos (Carvalho *et al.*, 2005). Fang e Roose (1997) sugeriram uma origem polifilética para o grupo dos limões.

Na tentativa de ampliar os estudos cromossômicos no grupo dos limões, Lemos (2005) realizou análises no limão poliplóide ‘Tahiti’, variedades IAC05, IAC06 e 2000. A análise desses acessos mostrou em ‘IAC05’ ($2n=27$) uma fórmula cromossômica muito heterogênea: $3B/45S + 1C + 2D/5S-45S + 1D/5S + 10D + 7F + 1F_L^0 + 1F_L^+ + 1F_L^{st}$. Nos acessos IAC06 e 2000 houve variação no número cromossômico, de $2n=18-36$ em ‘IAC06’ e $2n=25-38$ em ‘2000’. Curiosamente, nessas análises a autora observou um tipo cromossômico novo, H, que parece ser semelhante ao reportado por Yamamoto e Tominaga (2003) em *C. keraji*, onde este cromossomo foi chamado de F. Entretanto, não é possível garantir que esses dois tipos sejam o mesmo, devido, principalmente, à ausência da coloração DAPI como contracolorante no relato de Yamamoto e Tominaga (2003). A sobreposição das bandas CMA^+ com o cromossomo corado permite um melhor posicionamento das bandas ao longo do cromossomo.

A origem de um novo tipo cromossômico pode ser resultado de recombinação cromossômica (inversões e/ou translocações) ou amplificação/desamplificação da sequência

repetitiva que forma a banda CMA⁺. No caso do cromossomo H, Lemos (2005) sugere que um evento de recombinação cromossômica por translocação, envolvendo um cromossomo B e um D ou F tenha sido responsável pela formação deste novo tipo cromossômico. As hipóteses são: 1) translocação da banda terminal do B para o D, dando origem a um C ou 2) translocação da banda terminal do B para o F, dando origem a um D (Figura 2). A presença do sítio de DNAr 45S co-localizado com a banda CMA⁺ do H reforça a suposição de recombinação por translocação envolvendo um cromossomo B.

Um evento de translocação similar foi observado nas limas, com o surgimento do cromossomo G. Carvalho *et al.* (2005) sugeriram que este tipo cromossômico deva ter sido originado de uma pequena translocação cromossômica, compreendendo a parte heterocromática terminal de um cromossomo D, ou a partir de um evento de recombinação entre cromossomos F_L⁺ heteromórficos para a posição terminal/subterminal da banda. Esta última hipótese é suportada pela observação de um único F_L em *C. aurantifolia*, sugerindo que o G seja o homólogo ao F_L.

2.7 Citogenética dos gêneros relacionados – Bandeamento cromossômico e FISH

Espécies relacionadas ao *Citrus* também foram analisadas, apresentando os mesmos tipos cromossômicos vistos em *Citrus*. Miranda *et al.* (1997a) analisaram dois gêneros relacionados: *Fortunella* (*F. crassifolia* Swing e *F. hindsii* var. Chintou Swing) e *Poncirus* (*P. trifoliata* (L.) Raf.) As duas espécies de *Fortunella* puderam ser diferenciadas pelo padrão de bandas CMA/DAPI, sendo que *F. crassifolia* apresentou 2B + 16D, enquanto *F. hindsii*, 2A + 2C + 14D. Em um segundo trabalho, Miranda *et al.* (1997b) localizou os sítios de DNAr 45S em *F. crassifolia*, sendo quatro sítios co-localizados com bandas heterocromáticas, 2B/45S + 2D/45S. A espécie *P. trifoliata* apresentou 2B + 10D + 6F, porém esse resultado difere dos reportados posteriormente por Brasileiro-Vidal *et al.* (2007), que descreveram 4B + 8D + 6F. Provavelmente, esta pequena diferença observada entre os autores tenha sido causada pela freqüente fraca coloração do CMA na banda proximal de dois cromossomos B de *P. trifoliata*. Esses autores também definiram a posição dos sítios de DNAr 5S e 45S (4B/5S-45S + 2D/5S-45S). Roose *et al.* (1988) também verificou a presença de seis sítios de DNAr 45S, quatro proximais e dois terminais, porém encontraram apenas quatro sítios de DNAr 5S. Provavelmente essa diferença de resultados deva-se a problemas técnicos do segundo relato.

Barros-Silva e Guerra (2006) analisaram, com FISH de DNAr 5S/45S, sete espécies de cinco gêneros relacionados ao *Citrus* – *Clausena excavata*, *Murraya koenigii*, *M. paniculata*, *Merrillia caloxylon*, pertencentes à tribo Clauseneae, e *Atalantia monophylla*, *Citrus hystrix*, *Fortunella obovata* e *Severinia buxifolia*, pertencentes à tribo Citreae. Os autores observaram que o DNAr 5S ocorreu preferencialmente associado ao DNAr 45S, apresentando uma única exceção, *Clausena excavata*, da subtribo Clauseneae. Provavelmente esta seja a condição ancestral do grupo e os rearranjos cromossômicos, quando envolvendo a região do DNAr 5S/45S, permitiram que ambos migrassem juntos para outros cromossomos.

Ao longo das diversas análises em *Citrus* e gêneros relacionados utilizando CMA/DAPI associadas à FISH, é importante realçar que todos os sítios de DNAr 45S foram co-localizados com bandas CMA⁺, ressaltando que as bandas proximais sempre possuíram um sítio de DNAr 45S. A freqüente observação desta banda proximal distendida e com coloração diferencial (CMA⁰) pode estar relacionada com a ativação do sítio de DNAr 45S, uma vez que a região relacionada com a região organizadora do nucléolo, quando ativa na interfase, chega à metáfase seguinte com o nível de metilação alterado e com proteínas residuais associadas ao DNA. Esses fatores também devem estar associados com a coloração neutra da banda CMA, uma vez que a interação diferencial de proteínas pode ser um fator alterando a ligação do fluorocromo (Cornélio, 1994).

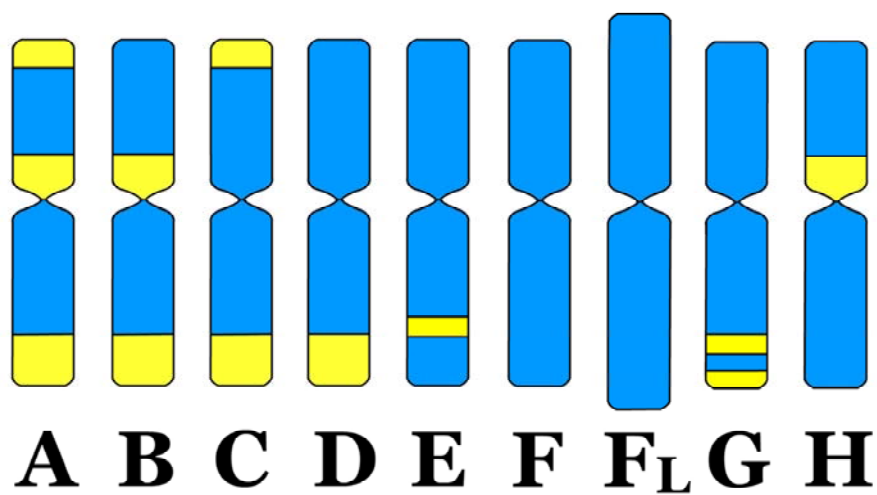


Figura 1: Tipos cromossômicos de *Citrus* e gêneros relacionados, de acordo com o tamanho e posição das bandas CMA⁺. As bandas CMA⁺ estão representadas em amarelo e os braços cromossômicos estão em azul (DAPI). (Modificado a partir de Carvalho *et al.*, 2005; Lemos, 2005).

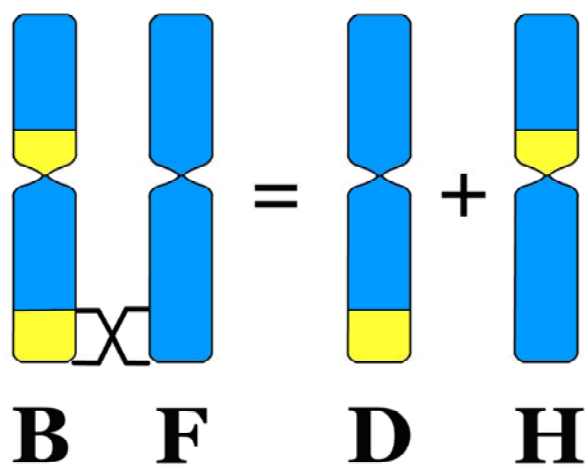


Figura 2: Esquema representativo de um dos rearranjos possíveis para a formação do cromossomo tipo H.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL PK. 1987a. Cytogenetical investigations in Rutaceae I. Meiotic studies in four *Citrus* species of hybrid origin. *Cytologia* 52: 753-756.

AGARWAL PK. 1987b. Cytogenetical investigations in Rutaceae II. Meiotic studies in three intergeneric hybrids of *Citrus*. *Cytologia* 52: 757-760.

APPELS, R.; MORRIS, R.; GILL, B.S.; MAY, C.E. 1998. *Chromosome Biology*. Boston/Dordrecht/London:Kluwer Academic Publishers, 401p.

ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. 2005. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). *Citros*. Campinas: IAC, p. 125-145.

ASÍNS, M.J.; MESTRE, P.F.; HERRERO, R.; NAVARRO, L.; CARBONELL, E.A. 1988. Molecular markers: a continuously growing biotechnology area to help *Citrus* improvement. *Fruits* 53:293-302.

BARRETT, H.C.; RHODES, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany* 1: 105-136.

BARROS-SILVA, A.E.; GUERRA, M. 2006. Associação dos sítios de DNAr 5S e 45S de espécies de *Citrus* e gêneros próximos. In: Resumos do 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2006. p.1274.

BEFU, M.; KITAJIMA, A.; HASEGAWA, K. 2001. Chromosome composition of some *Citrus* species and cultivars based on the chromomycin A3 (CMA) banding patterns. *Journal Japan Society of Horticultural Science* 70:83-88.

BEFU, M.; KITAJIMA, A.; HASEGAWA, K. 2002. Classification of the *Citrus* chromosomes with same types of chromomycin A banding patterns. *Journal Japan Society of Horticultural Science* 71:394-400.

BEFU, M.; KITAJIMA, A.; LING, Y.X.; HASEGAWA, K. 2000. Classification of ‘Tosa-Butan’ pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), ‘Washington’ Navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. *Journal Japan Society of Horticultural Science* 69:22-28.

- BOWMAN, K.D.; GMITTER Jr., F.G. 1990. Caribbean Forbidden Fruit: grapefruit's missing link with the past and bridge to the future? *Fruit Varieties Journal* 44: 41-44.
- BRASILEIRO-VIDAL, A.C.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SOARES FILHO, W.S.; GUERRA, M. 2007. A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica* 129:273-279.
- CABRAL, J.S.; FELIX, L.P.; GUERRA, M. 2006. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology* 29:659-664.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. 2002. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas* 136:159-168.
- CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W.S.; BRASILEIRO-VIDAL, A.C.; GUERRA, M. 2005. The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenetic and Genome Research* 109:276-282.
- CAVALLI, S.S. Apomixia: um método de reprodução assexual. In: FREITAS, L.B.; BERED, F (Org.). *Genética e evolução vegetal*. 1º ed. Porto Alegre: UFRGS. 2003. 41-56p.
- CHENG, Z.; PRESTING, G.G.; BUELL, C.R.; WING, A.; JIANG, J. 2001. High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* 157:1749-1757.
- CORNÉLIO, M.T.M. 1994. Variabilidade cromossômica em cultivares poliembriônicos e monoembriônicos de *Citrus*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 100f. Dissertação de Mestrado.
- CORNÉLIO, M.T.M.N.; FIGUEIRÔA, A.R.S.; SANTOS, K.G.B.; CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W.S.; GUERRA, M. 2003. Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Systematics and Evolution* 240: 149-61.

DARLINGTON, C.D.; LA COUR, L.F. The handling of chromosomes. 6° ed. Plymouth: Clarke, Doble & Brendon Ltd. 1976. 201p.

DE ARAÚJO, E.D.; QUEIROZ, L.P.; MACHADO, M.A. 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.

DE JONG, J.H.; FRANSZ, P.; ZABEL, P. 1999. Hight resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trends in Plant Science* 4: 258-262.

DE OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MACHADO, M.A. 2002. Diversidade genética entre híbridos de tangerina ‘Cravo™’ e laranja ‘Pêra™’. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 479-484.

FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95:408-417.

FAOSTAT. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Em www.faostat.fao.org/, visitado em 16 de julho de 2007.

FEDERICI, C.T.; FANG, D.Q.; SCORA, R.W.; ROOSE, M.L. 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 812-822.

FRANSZ, P.; ARMSTRONG, S.; ALONSO-BLANCO, C.; FISCHER, T.; TORRES-RUIZ, R.A.; JONES, G. 1998. Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 13:867-876.

FROST, H.B.; SOOST, R.K. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: Reuther, W.; Patchelor, L.D.; Webber, H.J. (Ed.). *The Citrus Industry*, Berkley: University of California Press. 2: 290-324.

GALL, J.; PARDUE, M.L. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 63:378-383.

- GMITTER FG, Jr. 1993. 'Marsh' Grapefruit. *Fruit Varieties Journal* 47:130-133.
- GUERRA, M.S. 1984. New chromosome numbers in Rutaceae. *Plant Systematics and Evolution* 146: 13-30.
- GUERRA, M. 1985. Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin patterns. *Caryologia* 38: 335-346.
- GUERRA, M.S. 1988. Mitotic and meiotic analysis of a pericentric inversion associated with a tandem duplication in *Euleterine bulbosa*. *Chromosoma* 97:80-87.
- GUERRA, M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71:234-241.
- GUERRA, M. Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: GUERRA, M. (Org.) FISH- Conceitos e aplicações na citogenética. 1º ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2004. 1-32p.
- GUERRA, M.; GARCIA, M.A. 2004. Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* 47:134-140.
- GUERRA, M; SANTOS, K.G.B.; SILVA, A.E.B.; EHRENDORFER, F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - A case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany* 87: 735-747.
- GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K.G.B.; SOARES FILHO, W.S. 1997. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. *Brazilian Journal of Genetics* 20:489-496.
- GUERRA, S. 2007. Origem e variabilidade cariotípica da laranja-azeda (*Citrus aurantium*). Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 58f. Trabalho de conclusão de curso.
- GUO, W.W.; DENG, X.X.; YI, H.L. 2000. Somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*C. paradisi*) for seedless triploid breeding. *Euphytica* 116:281-285.

- HANDA, T.; ISHIZAWA, Y.; OOGAKI, C. 1986. Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. Japan Journal of Genetics 61:15-24.
- HASTEROK, R.; MARASEK, A.; DONNISON, I.S.; ARMSTEAD, I.; THOMAS, A.; KING, I.P.; WOLNY, E.; IDZIAK, D.; DRAPER, J.; JENKINS, G. 2006. Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence *in situ* hybridization. Genetics 173:349-362.
- HERRERO, R.; ASÍNS, M.J.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. 1996a. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. Theoretical and Applied Genetics 92: 599-609.
- HERRERO, R.; ASÍNS, M.J.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. 1996b. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. Theoretical and Applied Genetics 92: 1327-1334.
- HODGSON, R.W. 1967. Horticultural Varieties of Citrus. IN: REUTHER W, WEBER HJ, BATCHELOR LD (eds). The Citrus industry. History, world distribution, botany and varieties, vol I. Berkeley: University of California Press, 431-591p.
- HOWELL E.C.; BARKER, G.C.; JONES, G.H.; KEARSEY, M.J.; KING, G.J.; KOP, E.P.; RYDER, C.D.; TEAKLE, G.R.; VICENTE, J.G.; ARMSTRONG, S.J. 2002. Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. Genetics 161:1225-1234.
- ITO, Y.; OMURA, M.; NESUMI, H. 1993. Improvement of chromosome observation methods for *Citrus*. Techniques on Gene Diagnosis and Breeding in fruit Trees 31-38.
- IWAMASA, M.; NITO, N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated citrus. In: Proceedings of the Sixth International Citrus Congress, 1988, Telaviv. Weikersheim: Margarf Scientific Books, 1988. p.265-275.
- JACKSON, S.A.; DONG, F.; JIANG, J. 1999. Digital mapping of bacterial artificial chomosomes by fluorescence *in situ* hybridization. The Plant Journal 17:581-587.

JACKSON, S.A.; CHENG, Z.; WANG, M.L.; GOODMAN, H.M.; JIANG, J. 2000. Comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping of a 431-kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansions of the *Brassica rapa* genome. *Genetics* 156:833-838.

JACOBS, M.D.; GARDNER, R.C.; MURRAY, B.G. 2000. Cytological characterization of heterochromatin and rDNA in *Pinus radiata* and *P. taeda*. *Plant Systematics and Evolution* 223: 71-79.

JIANG, J.; GILL, B.S. 2006. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068.

KATO, A.; LAMB, J.C.; BIRCHLER, J.A. 2004. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:13554-13559.

KOLLER, O.C. Citricultura: laranja, limão e tangerina. 1º ed. Porto Alegre: Editora Rígel, 1994. 446p.

KOORNNEEF, M.; FRANSZ, P.; DE JONG, H. 2003. Cytogenetic tools for *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research* 11 :183 194.

KRUG, C.A. 1943. Chromosome number in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. *Bot Gaz* 104: 602-611.

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

KULIKOVA, O.; GUALTIERI, G.; GEURTS, R.A.; KIM, D.J.; COOK, D.; HUGUET, T.; DE JONG, J. H.; FRANSZ, P.F.; BISSELING, T. 2001. Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 27:49-58.

KUMAMOTO, J.; SCORA, R.W.; LAWTON, H.W.; CLERX, W.A. 1986. Mystery of the forbidden fruit: historical epilogue on the origin of the grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). *Econ Bot* 41: 97-107.

- LEMOS, R.R. Variabilidade cromossômica no limão Tahiti. 2005. 40f. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2005.
- LI, L.; ARUMUGANATHAN, K. 2001. Physical mapping 45s and 5s rDNA on maize metaphase and of sorted chromosomes by FISH. *Hereditas* 134: 141 -145
- LIU, Z.L.; ZHANG, D.; HONG, D.Y.; WANG, X.R. 2003. Chromosomal localization of 5S and 18S-5.8S-25S ribosomal DNA sites in five Asian pines using fluorescence *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 106:198–204.
- LYSAK, M.A.; PECINKA, A.; SCHUBERT, I. 2003. Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromosome Research* 11: 195-204.
- LYSAK, M.A.; FRANSZ, P.F.; ALI, H.B.M.; SCHUBERT, I. 2001. Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 28: 689-697.
- LYSAK, M.A.; KOCH, M.A.; PECINKA, A.; SCHUBERT, I. 2005. Brassiceae chromosome triplication found across the tribe. *Genome Research* 15: 516-525.
- LYSAK, M.A.; LEXER, C. 2006. Towards the era of comparative evolutionary genomics in Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution* 259: 175–198.
- LYSAK, M.A.; BERR, A.; PECINKA, A.; SCHMIDT, R.; MCBREEN, K.; SCHUBERT, I. 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:5224-5229.
- MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). Citros. Campinas: IAC. 1º ed. 2005. p. 221-277.
- MARCON, A.B.; BARROS, I.C.L.; GUERRA, M. 2003. A karyotype comparison between two closely related species of *Acrostichum*. *American Fern Journal* 93:116–125.

- MARCON, A.B.; BARROS, I.C.L.; GUERRA, M. 2005. Variation in chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* (Pteridophyta). *Annals of Botany* 95:271-276.
- MATSUYAMA T, AKIHAMA T, ITO Y, OMURA M, FUKUI K. 1996. Characterization of heterochromatic regions in 'Trovita' orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by the fluorescent staining and FISH method. *Genome* 39: 941-945.
- MIRANDA M, IKEDA F, ENDO T, MORIGUCHI T, OMURA M. 1997a. Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chromosome Research*. 5: 86-92.
- MIRANDA M, IKEDA F, ENDO T, MORIGUCHI T, OMURA M. 1997b. rDNA sites and heterochromatin in Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swing.) chromosome revealed by FISH and CMA/DAPI staining. *Caryologia* 50: 333-340.
- MIRANDA, M.; IKEDA, F.; ENDO, T.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. 1997c. Chromosome markers and alterations in mitotic cells from interspecific *Citrus* somatic hybrids analysed by fluorochrome staining. *Plant Cell Reports* 16:807-812.
- MOORE, G.A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends in Genetics* 17: 536-540.
- MORAES, A.P.; GUERRA, M. 2006. Identificação de um dos ancestrais de *Emilia fosbergii* Nicolson (Asteraceae) por hibridização genômica *in situ*. In: 57º Congresso Nacional de Botânica, 2006, Gramado.
- MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S. 1991. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU, J.R.J. (eds.). *Citricultura Brasileira*. Fundação Cargill. Campinas. 1-18.
- MOSCONE, E.A.; MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J.M. 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.

- NAITHANI, S.P.; RAGHUVANSHI, S.S. 1958. Cytogenetical studies in the genus *Citrus*. *Nature* 17:1406-1407.
- NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; 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.
- PANG, X.M.; HU, C.G.; DENG, X.X. 2007. Phylogenetic relationships within *Citrus* and its related genera as inferred from AFLP markers. *Gen Res Crop Evol* 54:429-436.
- PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. 2000. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theoretical and Applied Genetics* 100:361-367.
- PEDROSA, A.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. 2002. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672.
- PEDROSA, A.; VALLEJOS, C.E.; BACHMAIR, A.; SCHWEIZER, D. 2003. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theoretical and Applied Genetics* 106:205-212.
- PEDROSA-HARAND, A.; ALMEIDA, C.C.S.; MOSIOLEK, M.; BLAIR, M.W.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics* 112:924-933.
- POTVIN, C.; BERGERON, Y.; SIMON, J.P. 1983. A numerical study of selected *Citrus* species (Rutaceae) based on biochemical characters. *Systematic Botany* 8:127-133.
- PRIMOSE, S.B. Princípios de análise do genoma. 2º ed. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2003. 193p.
- RAGHUVANSHI, S.S. 1962. Cytogenetical evolution in genus *Citrus*. *Cytologia* 27:172-187.
- RAN, Y.; HAMMETT, K.R.W.; MURRAY, B.G. 2001. Phylogenetic analysis and Karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Annals of Botany* 87:823-830.

- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Biology of plants. 6° ed. Nova Iorque: W.H. Freeman and Co. 1999. 944p.
- ROBINSON, T.R. 1933. The origin of the Marsh seedless grapefruit. Journal of Heredity 24:437-439.
- ROGATTO, S.R.; RAINHO, C.A. Citogenética molecular e câncer. In: GUERRA, M. (Org.) FISH- Conceitos e aplicações na citogenética. 1° ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2004. 149-170.
- ROOSE, M.L. 1988. Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in *Citrus* breeding and systematics. In: Proceedings of the Sixth International Citrus Congress, 1988, Telaviv. Weikersheim: Margarf Scientific Books, 1988. p.155-165.
- ROOSE, M.L.; SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. 1995. Citrus. In: SMARTT E SIMMONDS (eds). Evolution o crop plants. 2° ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 443-449p.
- RUAS, C.F.; VANZELA, A.L.L.; SANTOS, M.O.; FREGONEZI, J.N.; RUAS, P.M.; MATZENBACHER, N.I.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. 2005. Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. Genetics and Molecular Biology 28:129-139.
- RUIZ, C.; M. J. ASINS. 2003. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. Theor Appl Genet 106: 826-836.
- SAMUEL, R.; EHRENDORFER, F.; CHASE, M.W.; GREGER, H. 2001. Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequence and phytochemical features. Plant Biology 3:77-87.
- SCORA, R.W.; KUMAMOTO, J.; SOOST, R.K.; NAUER, E.M. 1982. Contribution to the origin of the grapefruit *Citrus paradisi* (Rutaceae). Systematic Botany 7:170-177.
- SCORA, R.W. 1975. IX. On the history and origin of citrus. Buly Botanical Club 102: 369-375.
- SHARMA, A.K.; BAL, A.K. 1957. Chromosome studies in *Citrus*. I Agronomia Lusitana 19:101-126

- SHIZUYA, H.; BIRREN, B.; KIM, U.J.; MANCINO, V.; SLEPAK, T.; TACHIIRI, Y.; SIMON, M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:8794-8797.
- SOARES FILHO, W.S. 2000. Porta-enxertos de citros para condições tropicais. Em <http://www.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/>, visitado em 14/07/2007.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. 1980. 'Oroblanco', a triploid pummelo – grapefruit hybrid. *Hortscience* 15:667-669.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. 1985. 'Melogold', a triploid pummelo – grapefruit hybrid. *Hortscience* 20:1134-1135.
- SWINGLE W.T., REECE P.C. 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, 190-430p.
- TANAKA, T. 1961. Citrologia (Semi-centennial commemoration paper on *Citrus* studies). Osaka: Citrologia Supporting Foundation, 114p.
- TANAKA, T. 1977. Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Studies Citrol.* 14:1-6.
- TRASK, B.J. 1991. Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics* 7:149-154.
- VAIO, M.; SPERANZA, P.; VALLS, J.F.; GUERRA, M.; MAZZELLA, C. 2005. 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* 96:191-200.
- VIANNA-MORGANTE, A.M. FISH no estudo dos cromossomos humanos. In: GUERRA, M. (Org.) FISH- Conceitos e aplicações na citogenética. 1º ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2004. 133-148p.

- WEBBER, H.J. 1967. History and development of the *Citrus* industry. IN: REUTHER W, WEBER HJ, BATCHELOR LD (eds). The Citrus industry. History, world distribution, botany and varieties, vol I. Berkeley: University of California Press, 1-39p.
- WU, J.H.; FERGUSON, A.R.; MOONEY, P.A. 2005. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid *Citrus* breeding. *Euphytica* 141: 229–235.
- YAMAMOTO, M.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; YAMADA, Y. 1993. Phylogenetic relationships of citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. *Japan Journal of Breeding* 43:355-365.
- YAMAMOTO, M.; TOMINAGA, S. 2003. High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. *Euphytica* 129:267-274.
- YAMAMOTO, M.; KUBO, T.; TOMINAGA, S. 2005. CMA banding patterns of chromosome of mid- and late- maturing citrus and acid citrus grown in Japan. *Journal Japan Society of Horticultural Science* 74:476-478.
- YAMAMOTO, M.; ABKENAR, A.A.; 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.
- YANG, Z. N., YE, X. R., CHOI, S., MOLINA, J., MOONAN, F., WING, R. A., ROOSE, M. L. E T. E. MIRKOV. 2001. Construction of a 1.2 Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genome* 44: 382-393.
- YANG, X.; KITAJIMA, A.; HASEGAWA, K. 2002. Chromosome pairing set and the presence of unreduced gametes explain the possible origin of polyploid progenies from the diploids ‘Tosa-Butan’ × ‘Suisho-Butan’ pummelo. *Journal Japan Society of Horticultural Science* 71:538-543.
- ZIOLKOWSKI, P.A.; KACZMAREK, M.; BABULA, D.; SADOWSKI, J. 2006. Genome evolution in *Arabidopsis/Brassica*: conservation and divergence of ancient rearranged segments and their breakpoints. *The Plant Journal* 47: 63–74.

4.1 MANUSCRITO 1

Diversidade cariotípica e origem dos pomelos

Manscrito publicado na revista *Chromosome Research* (2007) 15: 115-121

Diversidade cariotípica e origem dos pomelos

Ana Paula de Moraes¹, Walter S. Soares Filho² e Marcelo Guerra¹

¹*Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil,* ²*EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Brasil*

Cabeçalho: Diversidade cariotípica e origem dos pomelos

Fax: 51 55 81 2126 8348 Telefone: 51 55 81 21268846

Autor para correspondência: msfguerra@hotmail.com

Resumo

Os pomelos constituem um grupo de citros de origem recente, provavelmente resultante do cruzamento entre toranja e laranja-doce. Visando investigar a sua possível origem e variabilidade genética entre as cultivares de pomelos, o cariótipo de seis cultivares de pomelos, duas de toranjas e uma de tangelo (pomelo $\times$ tangerina) foram analisados utilizando dupla coloração seqüencial CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr. Os cariótipos dos pomelos ‘Duncan’ e ‘Foster’ diferiram dos encontrados para ‘Flame’, ‘Henderson’, ‘Marsh’ e ‘Rio Red’. O primeiro apresenta dois cromossomos com uma única banda CMA⁺ em ambas as regiões terminais (cromossomo tipo C) e seis cromossomos com somente uma banda CMA⁺ (cromossomo tipo D), enquanto os últimos apresentaram três cromossomos do tipo C e cinco do tipo D. Todos os acessos investigados exibiram dois cromossomos com DNAr 5S, mas um variável número de DNAr 45S. Os dois primeiros pomelos apresentaram quatro sítios de DNAr 45S, enquanto os demais pomelos, cinco sítios. As duas toranjas mostraram cariótipos idênticos, homozigotos para o padrão de bandas CMA⁺ e seus quatro sítios de DNAr 45S. De cada par cromossômico encontrado em toranja, um cromossomo parece estar presente no cariótipo dos pomelos. Os diferentes cariótipos de pomelos parecem ser resultantes de cruzamentos independentes entre toranjas, de diferentes cariótipos, com a laranja-doce. Os cromossomos marcadores encontrados no tangelo ‘Orlando’ e a posição de seus dois sítios DNAr 45S confirma o pomelo ‘Duncan’ e a tangerina ‘Dancy’ como seus parentais.

Palavras chaves: bandeamento CMA/DAPI, *Citrus*, pomelo, DNAr, evolução cariotípica

Introdução

O pomelo (*Citrus paradisi* Macfadyen) é uma cultura comercial de grande importância, principalmente na indústria de sucos, mas também como fonte de óleo essencial e de pectina (Hodgson 1967). A origem do pomelo é atribuída a uma hibridação entre a toranja [*C. grandis* (L.) Osb.] e a laranja-doce [*C. sinensis* (L.) Osb.], que teria ocorrido no Caribe há pouco mais de 200 anos (Webber 1943, Barret e Rhodes 1976, Scora *et al.* 1982). Desta forma, o pomelo é mais corretamente classificado como um híbrido interespecífico do que como espécie (Gmitter 1995). O primeiro híbrido foi descrito em 1750 nas Ilhas Barbadas (Kumamoto *et al.*, 1986) e referido como *forbidden fruit* (fruta proibida) por razões que não são claras no presente. A relação entre esses híbridos e o pomelo atual tem sido motivo de controvérsias (revisado por Bowman and Gmitter 1990). O nome científico *C. paradisi* foi dado por Macfadyen em 1830 a uma árvore de citros conhecida como *forbidden fruit* na Jamaica. Curiosamente, embora o pomelo seja considerado um híbrido natural surgido no Caribe, não há relatos da sua ocorrência natural na Ásia, de onde seus supostos ancestrais são nativos (Bowman and Gmitter 1990) e onde outros híbridos de toranja são conhecidos (Hodgson 1967). Os pomelos atuais são aparentemente derivados de um estoque de plantas silvestres introduzidas na Flórida em 1823 por Count Odette Philippi (Bowman and Gmitter 1990). Desse material ‘Duncan’, ‘Marsh’ e ‘Walters’ foram selecionadas, dando posteriormente origem a todas as demais cultivares (Gmitter 1993).

A natureza híbrida das espécies de citros, bem como a similaridade genética entre diferentes acessos e a origem das cultivares comercialmente importantes, tem sido investigada por diferentes abordagens, principalmente com marcadores moleculares (revisado por Moore 2001). Análises cariotípicas revelaram polimorfismo cromossômico entre espécies do gênero *Citrus* (Guerra 1993, Befu *et al.* 2000, Yamamoto e Tominaga 2003, Carvalho *et al.* 2005).

Frost (1925) contou corretamente o número cromossômico haplóide de $n=9$ em diversas espécies, posteriormente confirmado por diversos autores (ver, por exemplo, Guerra *et al.* 1997). Apesar da estabilidade do número cromossômico e da similaridade de tamanho e morfologia cromossômica, as espécies de *Citrus* e gêneros relacionados apresentam alta variabilidade na quantidade e localização de blocos heterocromáticos (Guerra *et al.* 2000). A dupla coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4'-6-diamino-2-fenil-indol (DAPI), que apresentam maior afinidade por pares de bases GC e AT, respectivamente, revelou blocos heterocromáticos CMA⁺/DAPI⁻ em vários cromossomos de todas as espécies de citros, assim como polimorfismo interspecífico e um alto nível de heterozigosidade cromossômica em quase todas as cultivares (ver Miranda *et al.* 1997, Yamamoto e Tominaga 2003, Carvalho *et al.* 2005).

Entre os pomelos, apenas 'Duncan' teve a sua fórmula cariotípica descrita (Befu *et al.* 2001). 'Duncan' apresenta alguns tipos cromossômicos marcadores também encontrados nas toranjas. As cultivares de toranjas apresentaram cariótipos diferentes (Befu *et al.* 2000; Befu *et al.* 2001; Yang *et al.* 2002), enquanto que a laranja-doce mostrou cariótipo estável, mas heteromórfico (Matsuyama *et al.* 1996, Miranda *et al.* 1997, Befu *et al.* 2000, Guerra *et al.* 2000, Pedrosa *et al.* 2000).

Além do bandeamento cromossômico, a localização e o número de sítios dos genes de DNAr 5S e 45S fornecem marcadores cromossômicos adicionais. A localização desses sítios foi reportada para algumas cultivares de laranja-doce (Pedrosa *et al.* 2000) e em um grupo de espécies estreitamente relacionadas que inclui lima, limões e cidra (Carvalho *et al.* 2005). Em ambos os trabalhos foi observada a ocorrência de heteromorfismo quanto à posição e número dos sítios de DNAr 5S e 45S em todos os acessos, à exceção da cidra (*C. medica* L.).

No presente trabalho foram analisados os padrões de bandas CMA⁺ e a distribuição de sítios de DNAr 5S e 45S em seis acessos de pomelos, procurando avaliar a similaridade cariotípica dentro deste grupo. Além disso, duas cultivares de toranja, ‘Israel’ e ‘Pink’, e um de tangelo, ‘Orlando’ (resultante do cruzamento entre *C. paradisi* cv. Duncan × *C. tangerina* cv. Dancy), foram analisadas, visando entender, de um lado, a relação entre os pomelos e seus possíveis parentais e, de outro lado, provar a transmissão dos cromossomos marcadores para o tangelo, um híbrido artificial entre parentais cariotipicamente heterozigotos.

Material e métodos

Material

Parede de ovários e brotos foliares de indivíduos adultos ou pontas de raízes de sementes ou plântulas de seis cultivares de pomelo (‘Duncan’, ‘Foster’, ‘Henderson’, ‘Marsh’, ‘Rio Red’, ‘Flame’), dois de toranja (‘Israel’ e ‘Pink’) e um de tangelo (‘Orlando’) foram analisados. Todos os acessos foram provenientes do banco de germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura.

Preparação das lâminas

Os materiais foram pré-tratados em 8-hidroxiquiloneína (0,002 M) por 5 h a 18 °C, fixados em 3:1 de etanol absoluto: ácido acético glacial (v/v) por 2-24 horas e estocados a –20 °C. Para a preparação das lâminas, os materiais foram lavados em água destilada e digeridos a 37 °C por 2 h em uma mistura de 2% celulase (Onozuka) e 20% pectinase (Sigma) (w/v), dissolvida em 0,01 M

tampão citrato pH 4,8. Em seguida, os materiais foram macerados em ácido acético 45%, cobertos com lamínula e congelados em nitrogênio líquido para remoção da lamínula. As lâminas foram coradas com uma mistura de DAPI (2 µg/ml):glicerol (1:1, v/v) para seleção das melhores metáfases.

Posteriormente, as lâminas foram descoradas em álcool absoluto:ácido acético glacial (3:1) por 30 min à temperatura ambiente e transferidas para etanol absoluto *overnight* a 10°C. As lâminas foram, então, secas ao ar e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente.

Coloração CMA/DAPI

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

Hibridização fluorescente in situ

A sonda de DNAr 5S foi obtida a partir do DNA genômico de *C. aurantifolia* (Chr.) Sw. por PCR utilizando os iniciadores 5'-GTGCGATCATACCAGC(AG)(CT)TAATGCACCGG-3' e 5'-GAGGTGCAACACGAGGACTTCCCAGGAGG-3' (Gottlob-McHugh *et al.* 1990). Os sítios de DNAr 45S foram localizados utilizando a sonda R2, um fragmento de 6,5Kb com a unidade de repetição 18S-5,8S-25S rDNA de *Arabidopsis thaliana*, gentilmente doado pelo Prof. Dr. Schweizer da Universidade de Viena. A sonda de DNAr 5S foi marcada por PCR com biotina-

16-dUTP (Roche), enquanto o DNAr 45S foi marcado por *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP (Life Technologies). O procedimento utilizado para hibridização *in situ* foi baseado em Moscone *et al.* (1996), com pequenas modificações. A mistura de hibridização contém 60% formamida (v/v), 5% dextran sulfato (w/v), 2× SSC, DNA de espermatozoides de salmão (0,3 ng/μL) e 2–5 ng/μL de sonda. A sonda de DNAr 5S foi detectada com anticorpo anti-biotina desenvolvido em camundongo (Dako) e os sinais amplificados com anticorpo anti-camundongo desenvolvido em coelho conjugado com TRITC (Roche). A sonda de DNAr 45S foi detectada com anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em ovelha e conjugado com FITC (Dako) e amplificado com anticorpo anti-ovelha desenvolvido em coelho e conjugado com FITC (Roche). Todas as preparações foram contracoradas com DAPI (2 μg/mL) e montadas em meio de montagem Vectashield (Vector). As imagens das células foram adquiridas como indicado anteriormente.

Resultados

Todos os acessos investigados apresentaram 18 cromossomos meta- a submetacêntricos. A heterocromatina foi sempre mais brilhante com CMA (bandas CMA⁺), enquanto o DAPI corou igualmente todo o complemento cromossômico, exceto nas regiões onde se localizavam os blocos CMA⁺, as quais não apareceram coradas (DAPI⁻). Em vários casos as bandas DAPI⁻ foram úteis na identificação de bandas CMA⁺ pequenas e pálidas.

A variação no número e na posição das bandas CMA⁺ permitiram identificar os diversos tipos cromossômicos (Carvalho *et al.* 2005): tipo A, duas bandas terminais e uma proximal; tipo B, uma terminal e uma proximal; tipo C, duas terminais; tipo D, uma terminal no braço longo e tipo F, sem bandas, a qual pertence o maior par F_L (Figura 1a e 2). Os cromossomos do tipo E

(uma banda intersticial) e G (duas bandas próximas terminais) reportados para outras espécies de *Citrus* (Carvalho *et al.* 2005), não foram encontradas. Os tipos cromossômicos A, B e C são mais conspícuos e menos freqüentes, funcionando como cromossomos marcadores, enquanto os tipos D e F são geralmente numerosos e amplamente encontrados entre as espécies de *Citrus*.

Os acessos de pomelo investigados apresentaram fórmulas cariotípicas semelhantes, podendo ser divididos em dois grupos: ‘Duncan’ e ‘Foster’, com $2A + 1B + 2C + 6D + 7F$ (Figura 1a-c) e ‘Marsh’, ‘Flame’, ‘Henderson’, ‘Rio Red’, com $2A + 1B + 3C + 5D + 7F$ (Figura 1d-f). As toranjas ‘Israel’ and ‘Pink’ mostraram $4A + 2C + 4D + 8F$, enquanto o tangelo ‘Orlando’ apresentou cariótipo bem diferente ($1B + 3C + 8D + 6F$), sem cromossomos A, característicos dos demais acessos (Tabela 1). A Figura 1a mostra todos os cromossomos identificados por letras, enquanto as demais células somente os cromossomos marcadores A, B e C estão identificados. Os cromossomos E e F são também indicados quando exibem sítios de DNAr. A Figura 2 mostra os idiogramas correspondentes.

Os cromossomos do tipo A mostraram variação de duas vezes no tamanho da banda no braço longo (Figura 1a). O tipo cromossômico B exibiu a banda CMA^+ proximal menor em comparação com a banda terminal (Figura 1a, 1d e 1j). Os cromossomos do tipo C igualmente apresentaram heteromorfismo no tamanho do cromossomo e das bandas, exceto nas toranjas (compare Figura 1a e 1g). Nas cultivares com três cromossomos C, dois destes cromossomos foram idênticos em tamanho e intensidade de bandas, enquanto o terceiro era maior (Figura 1d e 1j). Todas as cultivares de pomelo e toranja revelaram um cromossomo D com a banda CMA^+ significativamente maior, que algumas vezes pareceu compreender uma grande parte do braço longo. Em todos os cariótipos foi observado um par de cromossomos F_L (Figuras 1 e 2).

Todos os sítios de DNAr 45S coincidiram com bandas CMA^+ localizadas nas regiões proximais de cromossomos A e B ou nas regiões terminais do maior cromossomo D (Tabela 1 e

Figura 1 e 2). Entre os pomelos com 2C + 6D foram observados quatro sítios de DNAr 45S: três nos cromossomos A e B e o quarto no maior cromossomo D. Nos acessos com 3C + 5D foram observados cinco sítios de DNAr 45S, sendo quatro nas mesmas posições do grupo anterior e um sítio adicional localizado em outro cromossomo D. As toranjas ‘Israel’ e ‘Pink’ mostraram quatro sítios de DNAr 45S nos cromossomos A e o tangelo ‘Orlando’ apresentou somente dois sítios, um no cromossomo B e outro no D.

Os sítios de DNAr 5S não mostraram variação entre as cultivares de pomelo e tangelo analisadas. Foram detectados sempre dois sítios de DNAr 5S, um na região subterminal de um dos cromossomos F e outro no maior cromossomo D, adjacente a um sítio de DNAr 45S. Esse cromossomo D foi denominado D/5S-45S (ver Carvalho *et al.*, 2005). As toranjas apresentaram dois sítios de DNAr 5S em cromossomos F.

Discussão

A dupla coloração CMA/DAPI proporcionou uma clara diferenciação dos cariótipos dos acessos analisados. Além dos cromossomos A, B e C, também o cromossomo D pode servir de cromossomo marcador quando combinado com a distribuição dos sítios de DNAr. Três tipos de cromossomos D são conhecidos: i) D/5S, com um sítio de DNAr 5S na região da eucromatina; ii) D/45S, com um sítio de DNAr 45S co-localizado com a banda CMA⁺ e iii) D/5S-45S, com os sítios de DNAr adjacentes e co-localizados com a banda CMA⁺ (Pedrosa *et al.* 2000, Carvalho *et al.* 2005). Igualmente, o tipo F pode ser um bom marcador quando possuir um sítio de DNAr 5S (F/5S), conhecido anteriormente apenas em *C. sinensis* (Pedrosa *et al.* 2000). Nas cultivares analisadas, foram encontrados todos esses tipos cromossômicos, exceto o D/5S, permitindo uma análise cariotípica detalhada.

O padrão de bandeamento analisado mostrou que as seis cultivares de pomelos não apresentam cariótipos idênticos. Os pomelos ‘Duncan’ e ‘Foster’ apresentaram a fórmula cariotípica $2A + 1B + 2C + 6D + 7F$, enquanto ‘Flame’, ‘Henderson’, ‘Marsh’ e ‘Rio Red’ diferiram por possuir $3C + 5D$, ao invés de $2C + 6D$. Mantendo em mente os diferentes tipos de cromossomos D, a diferença entre esses dois grupos torna-se ainda maior: $5D + 1D/5S-45S$ para ‘Duncan’ e ‘Foster’ e $3D + 1D/5S + 1D/5S-45S$ para as demais cultivares. Como os sítios de DNAr 45S em *Citrus* são CMA^+ , cinco dos seis cromossomos D de ‘Duncan’ e ‘Foster’ devem ser portadores de uma sequência satélite rica em GC não relacionada ao DNAr, enquanto nos demais acessos apenas três dos cinco D apresentam esta sequência. Considerando que seis cultivares de pomelo formam dois grupos com diferentes cariótipos, é pouco provável que todos os pomelos sejam derivados apomiticamente do mesmo híbrido, como proposto por Barret e Rhodes (1976).

O único relato anterior da fórmula cariotípica de um pomelo foi publicado por Befu *et al.* (2001) com 1C a menos e 1F a mais do que nós encontramos para ‘Duncan’. Essa diferença não era esperada. A explicação pode ser o fato desses autores não terem identificado bandas CMA^+ fracas, devido à falta do DAPI como contracolorante, ou uma forte redução/amplificação de bandas heterocromáticas nesse acesso apomítico.

O cariótipo de um dos possíveis ancestrais do pomelo, *C. sinensis*, foi analisado em pelo menos 11 cultivares diferentes (Guerra 1993, Matsuyama *et al.* 1996, Miranda *et al.* 1997a, Befu *et al.* 2000, Pedrosa *et al.* 2000), apresentando sempre a fórmula $2B + 2C + 7D + 7F$, com diferentes tamanhos de cromossomos C e os sítios de DNAr localizados em dois B/45S, um D/5S-45S e um F/5S (Pedrosa *et al.*, 2000). A espécie produz geralmente embriões nucelares, permitindo a manutenção da heterozigosidade do cariótipo. A toranja, *Citrus grandis*, por outro lado, é uma espécie monoembriônica, produzindo exclusivamente, ou predominantemente,

embriões zigóticos (Barret e Rhodes, 1976). A fórmula cariotípica e a distribuição de sítios de DNAr para as duas toranjas analisadas indicam um cariótipo homozigoto, suportando a hipótese de que *C. grandis* seja uma das possíveis espécies puras do subgênero *Citrus*, como proposto por Barret e Rhodes (1976). Contudo, alguns cariótipos heteromórficos foram descritos previamente para as toranjas, sugerindo que esta espécie é naturalmente polimórfica para alguns tipos cromossômicos. Guerra (1993) e Befu *et al.* (2002) reportaram a presença de $3A + 3C$ e $3A + 2C$, respectivamente, em diferentes toranjas. Este dado sugere que os cromossomos A e C podem ser encontrados em mais de um par cromossômico nesta espécie (veja também Yang *et al.* 2002). Portanto, cariótipos homomórficos e heteromórficos podem ocorrer naturalmente em *C. grandis*, diferindo de outras espécies de *Citrus* consideradas verdadeiras, as quais se apresentam cariotipicamente homomórficas (Befu *et al.* 2001, Cornélio *et al.* 2003, Carvalho *et al.* 2005).

A característica citológica mais marcante de *C. grandis* é a presença de cromossomos A, não encontrados em laranja-doce, cidras, limas, limões (Carvalho *et al.*, 2005) e a maioria das tangerinas analisadas até então (Cornélio *et al.*, 2003; Yamamoto e Tominaga, 2003). A presença de dois cromossomos A em todos os acessos de pomelo confirma sua relação com as toranjas. Esses dois cromossomos A provavelmente são não-homólogos, uma vez que *C. sinensis* não possui cromossomos A e *C. grandis* possui, pelo menos, dois pares. Contudo, ‘Duncan’ e ‘Foster’ devem ter surgido da fusão de um gameta de *C. sinensis* ($1B/45S + 1C + 3D + 1D/5S-45S + 3F$) e um gameta de *C. grandis* ($2A/45S + 1C + 2D + 3F + 1F/5S$). A formação dos acessos com $3C + 5D$ pode ter ocorrido de forma similar, envolvendo, por exemplo, o mesmo gameta de *C. sinensis* e um gameta de *C. grandis* com $2A/45S + 2C + 2D + 2F + 1F/5S$. Todavia, esses acessos de pomelo com $3C + 5D$ apresentam um cromossomo $D/45S$, que não é encontrado nas toranjas, tampouco nas laranjas-doces. Uma vez que já foram observados até sete cromossomos D em uma cultivar de toranja (Miranda *et al.* 1997), é possível que esse

cromossomo D/45S exista em alguma cultivar ainda não analisada. Alternativamente, ‘Marsh’ pode ter se originado a partir do cruzamento entre ‘Duncan’, ou cultivar similar, com um dos vários híbridos (*C. grandis* × *C. sinensis*) que foram reportados para o Caribe (Robinson 1933), enquanto ‘Flame’, ‘Henderson’ e ‘Rio Red’ são derivados de ‘Marsh’ por mutação de ramo (Bowman e Gmitter 1990) conservando o mesmo cariótipo.

De acordo com Webber (1943), os tangelos descendem do cruzamento entre pomelo (*C. paradisi* ‘Duncan’) × tangerina (*C. tangerina* ‘Dancy’) realizado em 1827 na Estação Experimental da Flórida, sendo que a maioria dos acessos resultantes de importância comercial assemelha-se à tangerina (Webber, 1943). As fórmulas cariotípicas do pomelo ‘Duncan’ ($2A + 1B + 2C + 5D + 8F$) e da tangerina ‘Dancy’ ($1C + 12D + 5F$) são compatíveis com a do tangelo ‘Orlando’ ($1B + 3C + 8D + 6F$). A falta de cromossomo A em ‘Orlando’ deve ser atribuída à segregação independente destes dois cromossomos não-homólogos em ‘Duncan’. Igualmente os dois cromossomos C de ‘Duncan’ devem pertencer a pares heteromórficos distintos, já que ambos foram transmitidos para o tangelo. Adicionalmente, a presença do cromossomo F/5S, presente em pomelo e laranja-doce e raro em outros citros evidencia o parentesco do tangelo com o pomelo.

A concordância encontrada aqui entre cariótipos parentais e descendentes, por um lado, e com o registro histórico, por outro, demonstra o valor das análises citogenéticas na reconstrução da origem de híbridos e no entendimento da filogenia e evolução de *Citrus*.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelas agências brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, (n. 474589/03-0, 307916/03-0, e 140273/04-2) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia, FACEPE, (Edt. 0005-05-03/04).

Referências

- Barrett HC, Rhodes AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst Bot* **1**: 105-136.
- Befu M, Kitajima A, Ling YX, Hasegawa K (2000) Classification of 'Tosa-Butan' pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), 'Washington' Navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. *J Japan Soc Hort Sci* **69**:22-28.
- Befu M, Kitajima A, Hasegawa K (2001) Chromosome composition of some citrus species and cultivars based on the chromomycin A₃ (CMA) banding patterns. *J Japan Soc Hort Sci* **70**:83-88.
- Befu M, Kitajima A, Hasegawa (2002) Classification of the *Citrus* chromosomes with same types of chromomycin A banding patterns. *J Japan Soc Hort Sci* **71**:394-400.
- Bowman KD, Gmitter FG, Jr. (1990) Caribbean Forbidden Fruit: grapefruit's missing link with the past and bridge to the future? *Fruit Var J* **44**: 41-44.
- Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M (2005) The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* **109**:276-282.
- Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M (2003) Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst Evol* **240**: 149-161.
- Frost HB (1925) The chromosomes of *Citrus*. *J Wash Acad Sci* **15**: 1-2.
- Gmitter FG, Jr. (1993) 'Marsh' Grapefruit. *Fruit Var J* **47**:130-133.
- Gmitter FG, Jr (1995) Origin, evolution, and breeding of the grapefruit. *Plant Breed Rev* **13**:345-363.
- Gottlob-McHugh SG, Lévesque M, MacKenzie K, Olson M, Yarosh O, Johnson DA (1990) Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. *Genome* **33**:486-494.

Guerra M (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* **71**:234-241.

Guerra M, Pedrosa A, Silva AEB, Cornélio MTM, Santos KGB, Soares Filho WS (1997) Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. *Braz J Genet* **20**:489-496.

Guerra M, Santos KGB, Silva AEB, Ehrendorfer F (2000) Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae – a case of parallel chromosomal evolution. *Am J Bot* **87**: 735-747.

Hodgson RW (1967) Horticultural varieties of *Citrus*. In: Reuter W, Webber HJ, Batchelor LD, eds. *The citrus industry. History, world distribution botany and varieties*, vol I. University of California Press, pp 431-591.

Kumamoto J, Scora RW, Lawton HW, Clerx WA (1986) Mystery of the forbidden fruit: historical epilogue on the origin of the grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). *Econ Bot* **41**: 97-107.

Matsuyama T, Akihama T, Ito Y, Omura M, Fukui K (1996) Characterization of heterochromatic regions in ‘Trovita’ orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by the fluorescent staining and FISH methods. *Genome* **39**:941-945.

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 Res* **5**: 86-92.

Moore, GA (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet* **17**: 536-540.

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.

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.

Robinson TR (1933) The origin of the Marsh seedless grapefruit. *J Hered* **24**: 437-439.

Scora RW, Kumamoto J, Soost RK, Nauer EM (1982) Contribution to the origin of the grapefruit *Citrus paradisi* (Rutaceae). *Syst Bot* **7**:170-177.

Webber, HJ (1943) Cultivated varieties of citrus. In: Webber, HJ, eds. *The citrus industry. History, world distribution, botany and varieties*, vol I. University of California Press, pp 475-668.

Yamamoto M, Tominaga S (2003) High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. *Euphytica* **129**:267-274.

Yang X, Kitajima A, Hasegawa K (2002) Chromosome pairing set and the presence of unreduced gametes explain the possible origin of polyploid progenies from the diploids ‘Tosa-Butan’ X ‘Suisho-Butan’ pummelo. *J Japan Soc Hort Sci* **71**:538-543.

Figuras

Figura 1: Padrão de bandejamento CMA⁺ e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S em pomelos (a-f), toranjas (g-i) e tangelo (j-l). **a-c:** ‘Foster’. **d-f:** ‘Henderson’. **g-i:** toranja ‘Pink’. **j-l:** tangelo ‘Orlando’. Fotografias na coluna da esquerda mostram metáfases com bandejamento CMA⁺. As outras duas colunas mostram cromossomos corados com DAPI (pseudocolorido em cinza) com os sítios de DNAr 5S em vermelho (coluna do meio) e DNAr 45S em verde (coluna da direita). Letras maiúsculas indicam os tipos cromossômicos. Cabeça de seta e setas indicam a posição dos sítios pontuais de DNAr 5S e 45S, respectivamente. Barra em l corresponde a 5 µm.

Figura 2: Representação esquemática da distribuição cromossômica das bandas CMA⁺ e dos sítios de DNAr 5S e 45S nas cultivares analisadas. O tamanho relativo dos cromossomos e morfologia apresentados neste idiograma é uma aproximação. Blocos amarelos = bandas CMA⁺, blocos vermelhos = sítios de DNAr 5S rDNA e blocos verdes = sítios de DNAr 45S.

Tabela 1: Fórmula cariotípica definida pelas bandas CMA⁺ e posição dos sítios de DNAr 5S e 45S em pomelos, toranjas e tangelo.

Cultivar	Fórmula cariotípica	Distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S		
		5S	45S	5S-45S
Pomelo				
Duncan/Foster	2A + 1B + 2C + 6D + 7F	1F	2A + 1B	1D
Flame/ Henderson/ Marsh/ Rio	2A + 1B + 3C + 5D + 7F	1F	2A + 1B + 1D	1D
Red				
Toranja				
Israel/Pink	4A + 2C + 4D + 8F	2F	4A	-
Tangelo				
Orlando	1B + 3C + 8D + 4F + 2F _L	1F	1B	1D

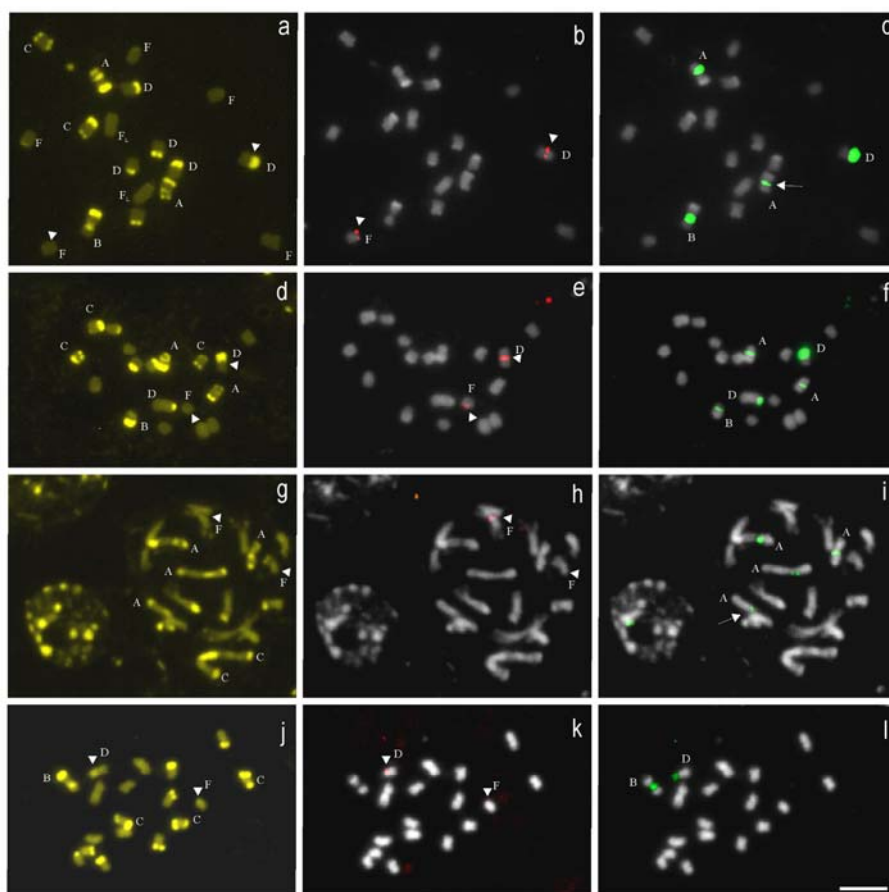


Figura 1

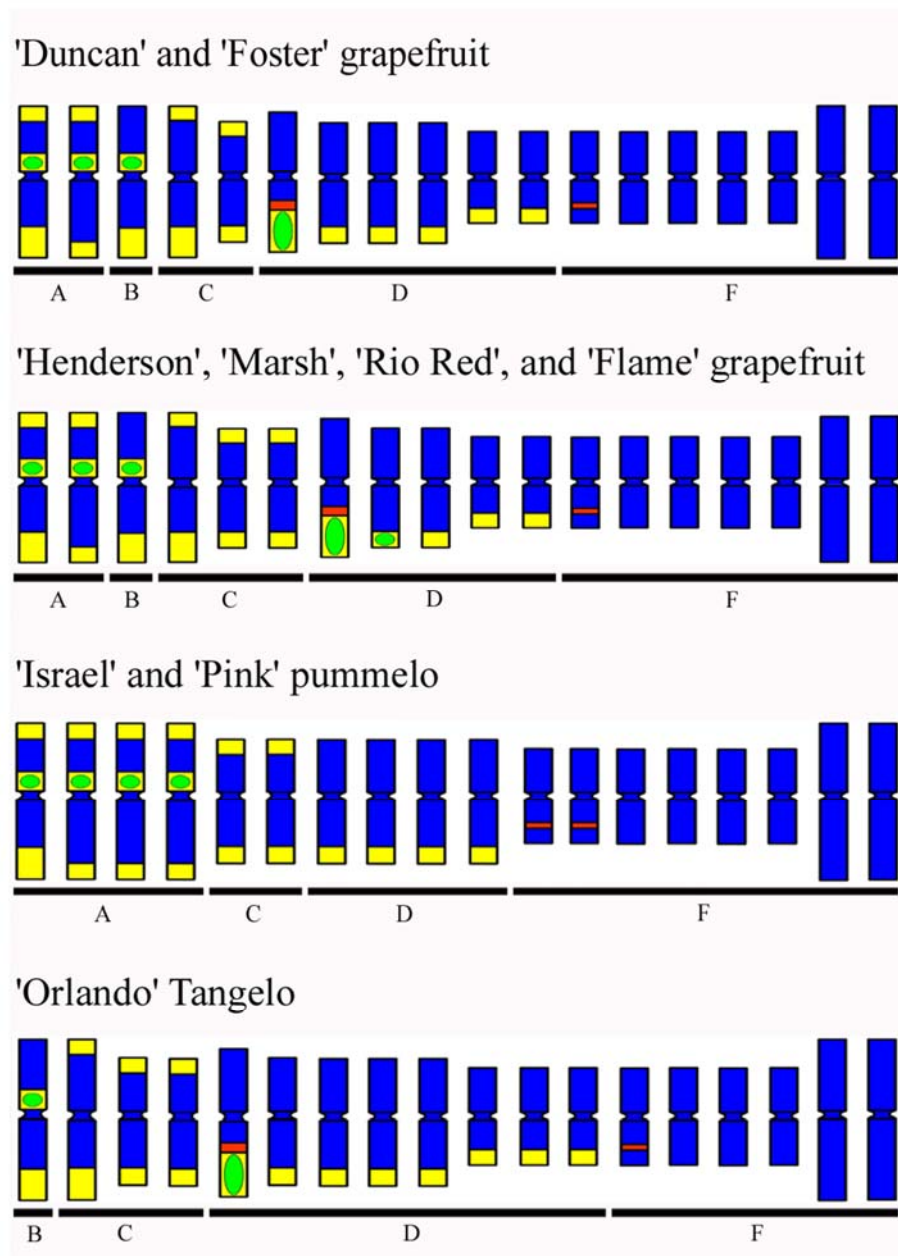


Figura 2

4.2 MANUSCRITO 2

Marcador cromossômico distingue acessos de tangerinas híbridas e não-híbridas

Manscrito submetido à revista *Cytogenetics and Genome Research* em
julho de 2007

Marcador cromossômico distingue acessos de tangerinas híbridas e não-híbridas

Ana Paula de Moraes^a, Roberta Rodrigues Lemos^a, Ana Christina Brasileiro-Vidal^b, Walter S. Soares Filho^c e Marcelo Guerra^a

^a**Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife, PE (Brasil)**

^b**Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife, PE (Brasil)**

^c**EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 44380-000 Cruz das Almas, BA (Brasil)**

Cabeçalho: Marcador cromossômico em tangerinas

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pelas agências brasileiras de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (n. 474589/03-0, 307916/03-0 e 140273/04-2) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia - FACEPE (Edt. 0005-05-03/04).

Requisição de separatas para M. Guerra, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE (Brasil); telefone: +55-81-2126-8846; fax: +55-81-2126-8348; e-mail: mguerra@ufpe.br.

Resumo. Tangerina é o nome comum dado a um grupo de espécies de *Citrus* que apresenta uma grande variação em caracteres morfológicos e moleculares, assim como em número de espécies. Visando identificar marcadores cromossômicos e auxiliar no esclarecimento das relações dentro deste grupo, foram analisados os kariótipos de 13 acessos de tangerinas, utilizando coloração CMA/DAPI e hibridização *in situ* com sondas DNAr 5S e 45S. O padrão de bandas CMA⁺, junto com a posição dos sítios de DNAr revelaram que as tangerinas podem ser separadas kariologicamente em três grupos: a) *C. sunki* e *C. reshni*; b) as tangerinas mediterrâneas, *C. deliciosa*, e as espécies proximamente relacionadas *C. tangerina* cv. Dancy e *C. reticulata* cv. Cravo; c) as demais cultivares, as quais são citologicamente heterozigotas e tratando-se provavelmente de híbridos interespecíficos. Os dois primeiros grupos foram assumidos como sendo compostos por espécies puras, junto com *C. medica* e *C. grandis*. Foi identificado um cromossomo marcador para espécies de tangerina e a relação entre as espécies puras e alguns híbridos é discutida.

Tangerina é o nome comum dado a um grupo de espécies de *Citrus* L., cujas frutas são facilmente reconhecidas pela sua casca, geralmente, fina e facilmente destacável, além de aroma e sabor característicos. Todavia, apesar desta simples caracterização, a gama de variações em caracteres morfológicos observada em acessos de tangerina é muito maior do que a observada entre acessos de laranjas [*C. sinensis* (L.) Osbeck], toranjas [*C. grandis* (L.) Osbeck] e pomelos (*C. paradisi* Macfad.) (Hodgson, 1967). Swingle e Reece (1967) observaram que as tangerinas incluíam tanto cultivares monoembriônicas quanto poliembriônicas, assim como tipos auto-compatíveis e auto-incompatíveis. Esses autores reconheceram apenas três espécies de tangerinas e assumiram que a maioria dos acessos seria híbrida, ao invés de espécies puras, enquanto Tanaka (1969) separou as tangerinas em 36 espécies.

Nos últimos 20 anos, vários estudos bioquímicos e moleculares têm tentado por ordem neste grupo caótico, porém com resultados modestos. Em geral, esses trabalhos revelaram uma grande heterogeneidade molecular, sugerindo que a maioria dos acessos de tangerina pertence a uma única espécie, *C. reticulata* Blanco, composta de vários genótipos diferentes e híbridos (Luro et al., 1995; Fang et al., 1997; Coletta Filho et al., 1998; Federici et al., 1998; Nicolosi et al., 2000). Para esses autores existem apenas três espécies em *Citrus*: *C. grandis*, *C. medica* L. e *C. reticulata* (revisado por Moore, 2001). Por outro lado, dois extensivos estudos citogenéticos em acessos de tangerina (Cornélio et al., 2003; Yamamoto e Tominaga, 2003) independentemente revelaram uma variação em tangerina muito maior do que a observada em outros grupos de *Citrus*, sugerindo um status polifilético, e não monofilético, para este grupo.

Apesar da estabilidade observada quanto ao número cromossômico no gênero ($2n=18$), as espécies de *Citrus* são citogeneticamente bem caracterizadas, com base em diferentes padrões de bandas cromossômicas ricas em GC, reveladas pelo fluorocromo cromomicina A₃, CMA (Guerra, 1993). Essas bandas brilhantes com CMA (CMA⁺) também podem ser identificadas

como bandas coradas negativamente com 4'-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI), o qual liga-se preferencialmente ao DNA rico em AT. A distribuição cromossômica das bandas CMA⁺ em espécies de *Citrus* permitiram a caracterização de sete tipos cromossômicos diferentes (Carvalho et al., 2005), cinco dos quais foram encontrados na maioria das cultivares. O tipo cromossômico A (duas bandas terminais e uma proximal), B (uma banda terminal e uma proximal), C (duas bandas terminais), E (uma banda intersticial) e G (uma banda terminal e uma sub-terminal) são classificados como raros, enquanto os tipos D (uma banda terminal) e F (sem bandas) são mais comuns.

A análise do cariótipo de dezenas de acessos revelou que alguns híbridos, como pomelos e tangelos, caracteristicamente apresentaram grande heteromorfismo para um a três pares cromossômicos, enquanto acesso de origem não-híbrida, como a cidra (*C. medica*) e espécies silvestres de vários gêneros relacionados aos *Citrus*, são homozigotas ou apresentam um padrão de bandas CMA⁺ discretamente heteromórficos (Guerra et al., 2000; Carvalho et al., 2005; Brasileiro-Vidal et al., 2007; Moraes et al., 2007). Contudo, é assumido que o heteromorfismo nos tipos cromossômicos de espécies de *Citrus* é uma forte indicação de hibridismo. Befu et al. (2001; 2002), Cornélio et al. (2003), Yamamoto e Tominaga (2003) e Yamamoto et al. (2005) descreveram o padrão de bandeamento com CMA de 23 cultivares diferentes de tangerinas e encontraram que a maioria delas são heterozigotas. Cornélio et al. (2003) identificaram dois grupos de tangerinas que são homozigotos e podem representar espécies verdadeiras. O primeiro grupo foi representado por duas espécies silvestres: *C. sunki* (Hayata) Hort. ex Tan. e *C. reshni* Hort. ex Tan., ambas com a fórmula cariotípica mais simples, 14D + 4F. O segundo grupo foi formado pelas cultivares Rio, Montenegrina e Comum de *C. deliciosa* Ten. e *C. reticulata* cv. Cravo, com 2C + 10D + 6F.

Um refinamento adicional à análise cariotípica em espécies de *Citrus* foi obtido quando metáfases bandeadas com CMA foram sequencialmente hibridizadas com sondas de DNAr 5S e 45S pela FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization). Apesar das espécies de *Citrus* terem poucos sítios de DNAr, eles são muito úteis na distinção entre subtipos de cromossomos (Pedrosa et al., 2000; Carvalho et al., 2005; Moraes et al., 2007). Neste trabalho, a distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S foi analisada em 10 espécies de tangerina e em um híbrido sintético, de acordo com o sistema de Tanaka, visando identificar grupos citologicamente homozigotos e proporcionar novos conhecimentos sobre a relação entre tangerinas e entre elas e outras espécies de *Citrus*.

Material e métodos

Plântulas ou plantas jovens de 10 espécies de tangerina, representadas por 12 cultivares [*C. sunki*, *C. reshni*, *C. reticulata* cv. Cravo e Ponkan, *C. deliciosa* cv. Comum e Montenegrina, *C. tangerina* Hort. ex Tanaka cv. Dancy, *C. clementina* Hort. ex Tanaka, *C. unshiu* Marcow., *C. amblycarpa* (Hassk.) Ochse, *C. tachibana* (Makino) Tanaka, *C. depressa* Hayata] e o tangor cv. Murcott (*C. sinensis* × *C. reticulata*) foram analisadas. No sentido de evitar utilizar embriões zigóticos, cinco pontas de raízes de cada acesso foram analisadas individualmente e somente aquelas com fórmula cariotípica idêntica e repetida em, pelo menos, três raízes foram aceitas para as análises (veja também Cornélio et al., 2003; Carvalho et al., 2005). Todos os acessos foram provenientes do banco ativo de germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia.

As raízes foram pré-tratados em 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por 5 h a 18 °C, fixados em etanol absoluto: ácido acético glacial (3:1, v/v) por 2-24 h e estocados a -20 °C.

Posteriormente, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada e digeridas em uma mistura de 2% celulase (Onozuka) e 20% pectinase (Sigma) a 37 °C por 2 h. Os meristemas foram macerados em uma gota de ácido acético 45% e congelados em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com uma mistura de DAPI (2 µg/mL): glicerol (1:1, v/v) para seleção das melhores células. Posteriormente elas foram descoradas em álcool absoluto:ácido acético glacial (3:1, v:v) por 30 min à temperatura ambiente e transferidas para etanol absoluto *overnight* a 10 °C. As lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias.

As lâminas envelhecidas foram coradas com CMA (0,5 mg/mL) por 1 h e contracoradas com DAPI (1 µg/mL) por 30 min. As melhores metáfases foram capturadas com câmara Cohu utilizando o programa QFISH da Leica. As lâminas foram novamente descoradas e estocadas a -20 °C.

As sondas D2, de *Lotus japonicus*, e R2, de *Arabidopsis thaliana*, foram utilizadas para localizar os sítios de DNAr 5S e 45S, respectivamente. A sonda D2 foi marcada com biotina-16-dUTP (Roche) ou Cy3 (Invitrogen) e a sonda R2, com digoxigenina-11-dUTP (Life Technologies), ambas por *nick translation*. A FISH seguiu o protocolo de Jiang et al. (1995) com pequenas modificações. A mistura de hibridização constituiu-se de 60% formamida (v/v), 5% sulfato dextran (w/v), 2× SSC e 2–5 ng/µL de sonda. Após a hibridização *overnight*, as lâminas foram lavadas em 2× SSC a temperatura ambiente por 5 min, passando para solução de formamida 20% em 0,1× SSC a 37 °C por 15 min, seguida de duas lavagens em 2× SSC a 37 °C por 5 e 10 min, respectivamente. A sonda marcada com biotina foi detectada com anticorpo anti-biotina desenvolvido em camundongo (Dako) e os sinais amplificados com anticorpo anti-camundongo desenvolvido em coelho conjugado com TRITC (Roche). A sonda marcada com digoxigenina foi detectada com anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em ovelha e conjugado

com FITC (Dako) e amplificado com anticorpo anti-ovelha desenvolvido em coelho e conjugado com FITC (Roche). Todas as preparações foram contracoradas com DAPI (1 µg/mL) e montadas com Vectashield (Vector). As imagens foram adquiridas como indicado antes.

Resultados

Os acessos analisados apresentaram 18 cromossomos que foram diferenciados pelo tamanho e localização das bandas $CMA^+/DAPI^-$. Os cromossomos dos tipos A – G foram encontrados (Figuras 1-3). O maior par de cromossomos F, também referido por F_L , foi identificado em todos os acessos e apresentou uma banda CMA^+ pontual em um dos cromossomos, em *C. sunki* e *C. reshni* (Fig. 1A).

O padrão de bandas CMA^+ observado permitiu separar os 13 acessos de tangerinas em quatro grupos, de acordo com Cornélio et al. (2003): I) somente com os cromossomos tipos D e F (Figs. 1A, 3A); II) somente cromossomos C, D e F (Fig. 1C, E, 3B-C); III) com quatro ou cinco diferentes tipos cromossômicos, exceto o tipo A (Figs. 1F, 2A, C, D e F, 3D-H) e IV) com um cromossomo A (Fig. 2H, 3I).

Em alguns acessos, os cromossomos marcadores apresentaram pequenos heteromorfismos quanto à posição e tamanho das bandas CMA^+ . A banda CMA proximal do cromossomo B foi frequentemente menos brilhante, ou neutra (CMA^0 , Fig. 2C) Em *C. unshiu*, um dos cromossomos C apresentou uma banda maior que a outra (Fig. 2A). A posição da única banda CMA^+ do cromossomo E pareceu ser mais subterminal em *C. amblycarpa*, enquanto em *C. tachibana* (Fig. 2D) e *C. depressa* (Fig. 2F), bandas intersticiais e subterminais foram observadas.

Em vários acessos, os sítios de DNAr 5S variaram em tamanho, especialmente no grupo III (ver Figs. 1G, 2C e 2I). Em todos os acessos, os sítios de DNAr 5S foram localizados na

região eucromática, enquanto os sítios de DNAr 45S foram co-localizados com bandas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ ou $\text{CMA}^0/\text{DAPI}^-$ (Figs. 1 e 2). Todos os cromossomos dos tipos A e B apresentaram um sítio de DNAr 45S co-localizado na banda CMA^+ proximal (Figs. 2 e 3) e foram identificados como A/45S e B/45S, respectivamente. Por outro lado, somente um ou dois cromossomos do tipo D tiveram um sítio de DNAr 45S co-localizado com a banda CMA^+ . Nestes casos, sempre houve um sítio de DNAr 5S adjacente ao sítio de DNAr 45S e o cromossomo foi identificado como D/5S-45S. Similarmente, o cromossomo F que apresentou sítio de DNAr 5S, encontrado somente em ‘Murkot’, foi denominado F/5S (Fig. 2I). O sítio de DNAr 45S localizado no cromossomo D/5S-45S esteve frequentemente distendido e, neste caso, a sua banda CMA foi frequentemente neutra (Figs. 1C, D). Algumas vezes, isso também foi observado na banda proximal do cromossomo B (Figura 2C).

Os resultados da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S estiveram em concordância com a prévia divisão das tangerinas em grupos (Tabela 1 e Fig. 3). Os acessos dos grupos I e II apresentaram um par de cromossomos D/5S-45S (Fig. 1A, E), enquanto os acessos do grupo III mostraram um par de cromossomos D/5S-45S e um cromossomo B/45S (Figs. 1F, G e 2B, C, E e G). O único acesso do grupo IV, o tangor ‘Murkot’, foi mais complexo, apresentando um cromossomo A/45S, um B/45S, um D/5S-45S e um F/5S (Fig. 2H, I).

Discussão

A fórmula cariotípica

A maioria das amostras investigadas aqui foi heterozigota para o padrão de bandas CMA^+ , como previamente reportado por Cornélio et al. (2003) e Yamamoto e Tominaga (2003). A fórmula cariotípica de *C. amblycarpa* foi descrita pela primeira vez. Todos os outros acessos

analisados tiveram padrão de bandeamento CMA/DAPI muito similares com os previamente descrito por Befu et al. (2001, 2002), Cornélio et al. (2003), Yamamoto e Tominaga (2003) e Yamamoto et al. (2005).

Contudo, em alguns acessos há algumas aparentes contradições entre os resultados presentes e dos artigos prévios. A fórmula cariotípica descrita aqui e por Cornélio et al. (2003) para *C. sunki* e *C. tangerina* foi $14D + 4F$ e $1C + 11D + 6F$, respectivamente, enquanto Yamamoto e Tominaga (2003) reportaram $12D + 6F$ para *C. sunki* e $1C + 10D + 7F$ para *C. tangerina* [seguindo a nomenclatura de Carvalho et al. (2005)]. Em ambos os casos parece que um, ou dois, pares cromossômicos D foram interpretado como cromossomos F por Yamamoto e Tominaga (2003). Esta diferença pode ser atribuída ao procedimento de coloração utilizado, uma vez que os últimos autores não utilizaram DAPI como contra corante. Contudo, a possibilidade de heteromorfismo de bandas não pode ser descartada. As espécies de *Citrus* não apresentam bandas $DAPI^+$, mas a utilização do DAPI é muito importante como contra corante, uma vez que ele intensifica o contraste de bandas CMA^+ e permite a identificação de bandas CMA^0 como bandas $DAPI^-$ (Cornélio et al., 2003; Carvalho et al., 2005). Além disso, as bandas CMA^+ co-localizadas com sítio de DNAr 45S pode exibir diferença na intensidade do brilho, de positiva a neutra, mesmo em diferentes células de uma mesma lâmina, mas são sempre $DAPI^-$. Entretanto, se a contra coloração com DAPI não for utilizada, é possível que um ou dois cromossomos D/5S-45S pareçam cromossomos F.

Similarmente, o cariótipo de *C. deliciosa* descrito aqui e por Cornélio et al. (2003) como $2C + 10D + 6F$ deve ser o mesmo reportado por Yamamoto e Tominaga (2003) como $1C + 10D + 7F$, onde um cromossomo C e um D foram interpretado como D e F, respectivamente. Cornélio et al. (2003) observaram que os cromossomos C de *C. deliciosa* possuem duas bandas CMA^+ de diferentes tamanhos, uma delas sendo pequena e pálida, deixando esse cromossomo similar a um

D. Se esta conclusão está correta, o cariótipo de *C. deliciosa* é estável, em pelo menos, quatro cultivares: Rio, Montenegrina, Comum (Cornélio *et al.*, 2003 e o presente artigo) e Tardio di Ciaculli (Yamamoto e Tominaga, 2003).

O cariótipo de *C. reticulata* cv. Ponkan foi descrito por Cornélio *et al.* (2003) como apresentando um cromossomo C com uma das bandas CMA⁺ terminal pequena e fraca, porém isto não foi observado por Yamamoto e Tominaga (2003), como também não foi observado no presente trabalho.

Distribuição dos sítios de DNAr

Entre os acessos analisados, somente *C. sunki*, *C. reshni*, ambas cultivares de *C. deliciosa*, *C. reticulata* cv. Cravo e *C. tangerina* cv. Dancy apresentaram um único par cromossômico homozigoto com D/5S-45S. Esses acessos foram separados por Cornélio *et al.* (2003) em grupo I, constituído por *C. sunki* e *C. reshni*, com fórmula cromossômica simples 14D + 4F, e grupo II, representado aqui por *C. deliciosa* e *C. reticulata* cv. Cravo, com 2C + 10D + 6F. Em *C. tangerina* cv. Dancy um cromossomo C foi substituído por um D, provavelmente devido a uma das bandas terminais do cromossomo C ser muito pequena. Esta cultivar foi descrita como proximamente relacionada com *C. deliciosa* por Nicolosi *et al.* (2000), utilizando RAPD e SCARs. Todos os acessos do grupo III apresentaram um par de D/5S-45S e um cromossomo B/45S, enquanto o acesso do grupo IV exibiu uma complexa composição de sítios de DNAr 5S-45S. Em trabalho prévio (Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007) nós havíamos comentado que duas cultivares de tangerina apresentavam um único cromossomo B/5S-45S. Todavia, este dado não foi confirmado aqui. O falso sinal foi provavelmente causado por contaminação da sonda. Até o momento, o cromossomo B/5S-45S foi encontrado somente em *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007) e *C. hystrix* DC. (dados não publicados).

Entre as espécies de *Citrus*, o tipo cromossômico D/5S-45S foi encontrado em homozigose em todos os acessos de tangerina, exceto no tangor 'Murkot', um híbrido sintético de tangerina. Notavelmente, o cromossomo D/5S-45S não foi encontrado em homozigose em nenhum outro acesso de *Citrus* analisado previamente. Deste modo, o tipo cromossômico D/5S-45S parece ser um bom cromossomo marcador para este grupo. Duas outras espécies, *C. grandis* e *C. medica*, também foram citologicamente caracterizadas pela presença exclusiva de cromossomos marcadores em homozigose: A/45S e F/5S na primeira (Moraes et al., 2007) e D/5S na segunda (Carvalho et al., 2005).

Origem das tangerinas

Apesar de Swingle e Reece (1967) considerarem somente três espécies de tangerinas (*C. reticulata*, *C. tachibana* e *C. indica* Tanaka), do ponto de vista citogenético *C. reticulata sensu* Swingle compreende, pelo menos, três espécies verdadeiras (*C. sunki*, *C. reshni* e *C. deliciosa*) e vários híbridos. *Citrus sunki*, chamada por Swingle como *C. reticulata* var. *austera*, e *C. reshni* podem ser diferenciadas por caracteres morfológicos e distribuição geográfica, mas citogenética e molecularmente elas parecem ser muito similares (discutido por Cornélio et al., 2003). Entre as outras duas espécies de tangerina aceitas por Swingle (*C. tachibana* e *C. indica*), apenas a primeira é citogeneticamente conhecida e foi demonstrado aqui ser altamente heteromórfica (veja também Yamamoto e Tominaga, 2003) e provavelmente de origem híbrida.

Comparando as três espécies assumidas como puras (*C. sunki*, *C. reshni* e *C. deliciosa*) pode-se ficar tentado a especular que *C. sunki* e *C. reshni*, com suas frutas ácidas e pequenas, estão menos provavelmente envolvidas na origem das tangerinas doces e comestíveis. Adicionalmente, a maioria dos acessos de tangerinas analisada possuem um cromossomo C, exceto *C. sunki* e *C. reshni*. Por outro lado, *C. deliciosa* possui frutos muito atrativos sendo a

única tangerina que apresentou cromossomos C em homozigose. Entretanto, esta tangerina é a melhor candidata a representante à ancestral envolvida na origem de vários híbridos interspecíficos comestíveis. *C. tangerina* cv. Dancy e *C. reticulata* cv. Cravo, consideradas por Tanaka (1969) como espécies distintas, parecem ser variações das tangerinas mediterrâneas. De acordo com Hodgson (1967), *Citrus tangerina* cv. Dancy parece ter sido introduzida de Tangiers (Marrocos) na Flórida (Estados Unidos) em 1867, enquanto a variedade brasileira *C. reticulata* cv. Cravo parece ser relacionada com a variedade portuguesa ‘Carvalhais’, um possível híbrido natural da tangerina mediterrânea ‘Setubalense’. Portanto, ambas cultivares podem ter sido originadas a partir variedades cultivadas na região do Mediterrâneo. A origem das tangerinas mediterrâneas não é clara, mas, mais provavelmente, elas se originaram a partir dos tipos ou variedades chinesas (Hodgson, 1967).

Por outro lado, as espécies de tangerinas ácidas, *C. sunki* e *C. reshni*, podem estar envolvidas na origem de outros híbridos de *Citrus* com frutos ácidos. Por exemplo, *C. jambhiri* Lush., o limão rugoso, é um suposto híbrido entre tangerina e *C. medica* (Scora, 1975; Potvin et al., 1983; Federici et al., 1998). Na verdade, Carvalho et al. (2005) observaram que metade do cariótipo do limão rugoso é idêntico ao complemento haplóide de *C. medica*, herdando os cromossomos B/45S e D/5S desta espécie. A outra metade do cariótipo corresponde perfeitamente ao conjunto haplóide de *C. reshni*, incluindo o cromossomo D/5S-45S. O mesmo se aplica à lima ‘Rangpur’ (*C. limonia* Osbeck), também um possível híbrido entre tangerina e *C. medica* (Nicolosi et al., 2000), com metade do complemento similar a *C. reshni* e a outra metade, a *C. medica*. Desta forma, o cromossomo D/5S-45S pode ser um bom marcador para testar supostos envolvimento de tangerinas na origem de vários híbridos no gênero *Citrus*. Adicionalmente, a presença ou ausência do cromossomo B é um marcador citogenético adicional para distinguir entre os dois principais grupos de tangerinas.

Referências

- Befu M, Kitajima A, Hasegawa K: Classification of the *Citrus* chromosomes with same types of chromomycin A banding patterns. J Japan Soc Hort Sci 71:394-400 (2002).
- Befu M, Kitajima A, Hasegawa K: Chromosome composition of some *Citrus* species and cultivars based on the chromomycin A₃ (CMA) banding patterns. J Japan Soc Hort Sci 70:83-88 (2001).
- Brasileiro-Vidal AC, dos Santos-Serejo JA, Soares Filho WS, Guerra M: A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. Genetica 129:273-279 (2007).
- Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M: The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. Cytogenet Genome Res 109:276-282 (2005).
- Coletta Filho HD, Machado MA, Targon MLPN, Moreira MCPQDG, Pompeu Jr J: Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. Euphytica 102:133-139 (1998).
- Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M: Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. Plant Syst Evol 240: 149-161 (2003).
- Fang DQ, Roose ML: Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor Appl Genet 95:408-417 (1997).
- Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML: Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. Theor Appl Genet 96:812-822 (1998).
- Guerra M: Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. Heredity 71:234-241(1993).

- Guerra M, Santos KGB, Silva AEB, Ehrendorfer F: Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - A case of parallel chromosomal evolution. *Amer J Bot* 87:735-747 (2000).
- Hodgson RW: Horticultural varieties of *Citrus*. 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 431-591 (1967).
- Jiang J, Gill BS, Wangt GL, Ronald PC, Wardt DC: Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 92:4487-4491 (1995).
- Luro F, Laigret F, Bové JM, Ollitrault P: DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. *HortScience* 30:1063-1067 (1995).
- Moore GA: Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet* 17:536-540 (2001).
- Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M: Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res.* 15:115-121 (2007).
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E: *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1155-1166 (2000).
- Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M: Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor Appl Genet* 100:361-367 (2000).
- Potvin C, Bergeron Y, Simon JP: A numerical taxonomic study of selected *Citrus* species (Rutaceae) based on biochemical characters. *Syst Bot* 8:127-133 (1983).
- Scora RW: IX. On the history and origin of *Citrus*. *Bull Torrey Bot Club* 102: 369-375 (1975).
- Swingle WT, Reece PC: 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 (1967).

Tanaka T: Misunderstanding with regard to *Citrus* classification and nomenclature. Bull Uni Osaka Pref Ser B 21:139-145 (1969).

Yamamoto M, Kubo T, Tominaga S: CMA banding patterns of chromosome of mid- and late-maturing citrus and acid citrus grown in Japan. J Japan Soc Hort Sci 74:476-478 (2005).

Yamamoto M, Tominaga S: High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. Euphytica 129:267-274 (2003).

Legendas

Fig. 1 Padrão de bandeamento CMA⁺ e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S em tangerinas dos grupos I, II e *C. clementina*. (A, B) *Citrus reshni*. (C, D) *C. reticulata* cv. Cravo. (E) *C. tangerina* cv. Dancy. (F, G) *C. clementina*. A, C e F mostram metáfases coradas com CMA, enquanto B, D e G mostram as mesmas metáfases contra coradas com DAPI e hibridizada com as sondas de DNAr 5S (rosa) e 45S (verde). E mostra metáfase corada com CMA sobreposta com DAPI, Cy3 (DNAr 5S) e FITC (DNAr 45S). Letras maiúsculas em C, E e F indicam cromossomos B e C. Setas apontam os cromossomos com sítios de DNAr 5S e 45S. Asteriscos em A sinalizam o cromossomo F_L⁺. Detalhes em E mostra o cromossomo D/5S-45S sem os sinais da FISH. Detalhe em G mostra o cromossomo D/5S-45S sem o sinal do sítio de DNAr 45S (seta amarela). Barra = 5 µm.

Fig. 2 Padrão de bandeamento CMA⁺ e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S em tangerinas. (A, B) *C. unshiu*. (C) *C. amblycarpa*. (D, E) *C. tachibana*. (F, G) *C. depressa*. (H, I) Tangor ‘Murcott’. (A, D, F e H) mostram metáfases coradas com CMA. B, E, G e I mostram a mesma metáfase contra corada com DAPI e hibridizada com DNAr 5S (rosa) e 45S (verde). Em C, metáfase corada com CMA sobreposta com DAPI, Cy3 (DNAr 5S) e FITC (DNAr 45S). Letras maiúsculas em A, C, D, F e H indicam os tipos cromossômicos. Setas indicam os sítios de DNAr 5S e 45S. Detalhes em C e G mostram cromossomos B/45S corados com CMA/DAPI e com FITC, respectivamente. Asterisco em D sinaliza uma sobreposição parcial entre um cromossomo E e um D. Barra = 5 µm.

Fig. 3 Idiograma representativo da distribuição das bandas CMA⁺ e sítios de DNAr 5S e 45S nos acessos analisados. A fórmula cariotípica está indicada abaixo do idiograma. Blocos pretos =

bandas CMA⁺. Cabeças de setas = sítios de DNAr 5S. Círculos hachurados = sítios de DNAr 45S.

Tabela 1: Lista dos acessos de tangerina analisados com a respectiva fórmula cariotípica, número e posição de sítios de DNAr. Nome das espécies de acordo com Tanaka (1969).

Grupo	Espécie	Fórmula cariotípica	Cromossomos com sítios de DNAr 5S e 45S
I	<i>Citrus reshni</i> Hort. ex Tanaka	14D + 4F	2D/5S-45S
	<i>C. sunki</i> (Hayata) Hort. ex Tanaka	14D + 4F	2D/5S-45S
II	<i>C. deliciosa</i> Ten. cv. Comum / Montenegrina	2C + 10D + 6F	2D/5S-45S
	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. Cravo	2C + 10D + 6F	2D/5S-45S
	<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tanaka cv. Dancy	1C + 11D + 6F	2D/5S-45S
III	<i>C. amblycarpa</i> (Hassk.) Ochse	1B + 11D + 1E + 4F + 1G	1B/45S + 2D/5S-45S
	<i>C. clementina</i> Hort. ex Tanaka	1B + 1C + 11D + 5F	1B/45S + 2D/5S-45S
	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. Ponkan	1B + 1C + 11D + 5F	1B/45S + 2D/5S-45S
	<i>C. depressa</i> Hayata	1B + 1C + 10D + 2E + 4F	1B/45S + 2D/5S-45S
	<i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka	1B + 1C + 10D + 3E + 3F	1B/45S + 2D/5S-45S
	<i>C. unshiu</i> Marcow.	1B + 2C + 10D + 5F	1B/45S + 2D/5S-45S
IV	Tangor [<i>C. sinensis</i> (L.) Osb. x <i>C. reticulata</i> Blanco] ‘Murcott’	1A + 1B + 10D + 6F	1A/45S + 1B/45S + 1D/5S-45S + 1F/5S

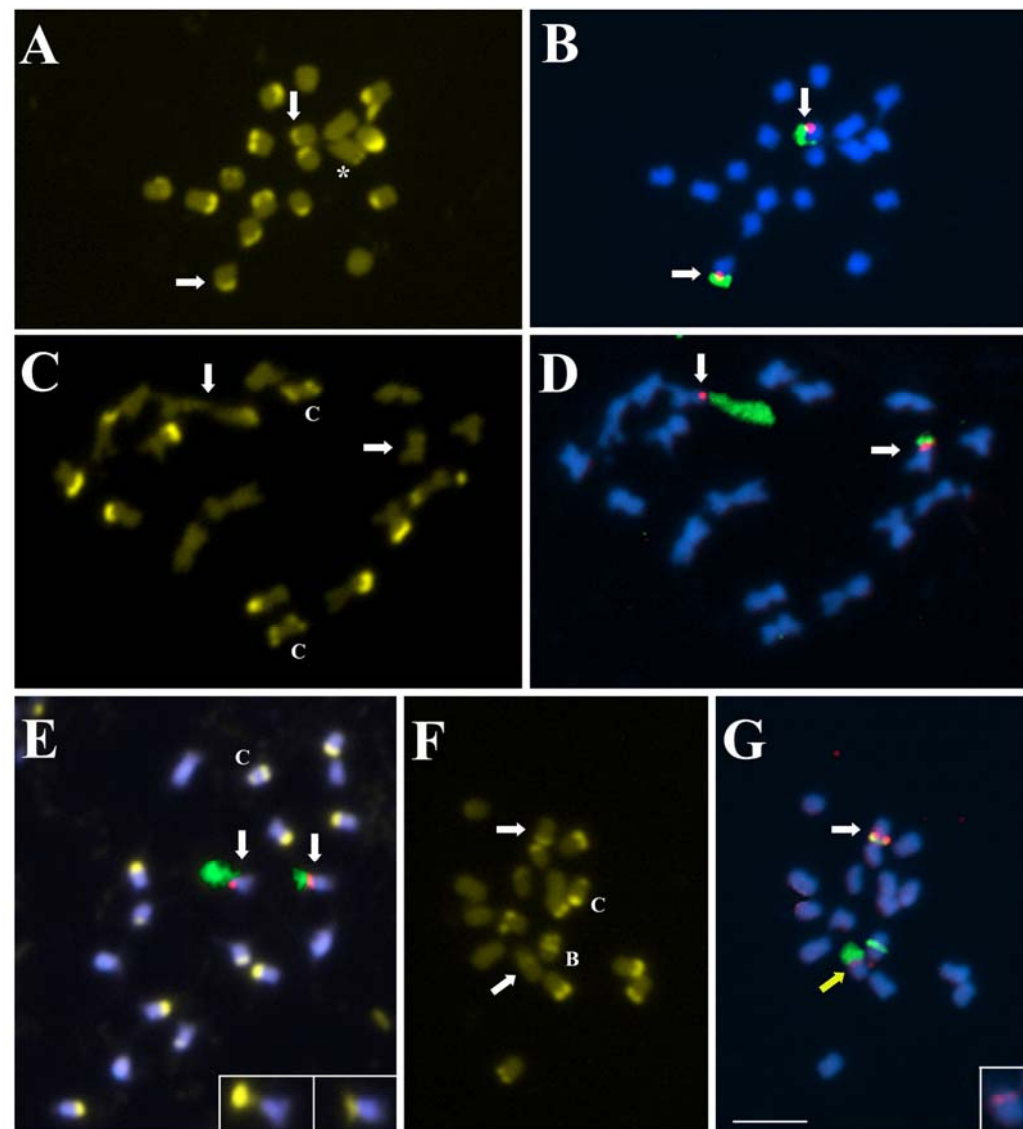


Fig. 1.

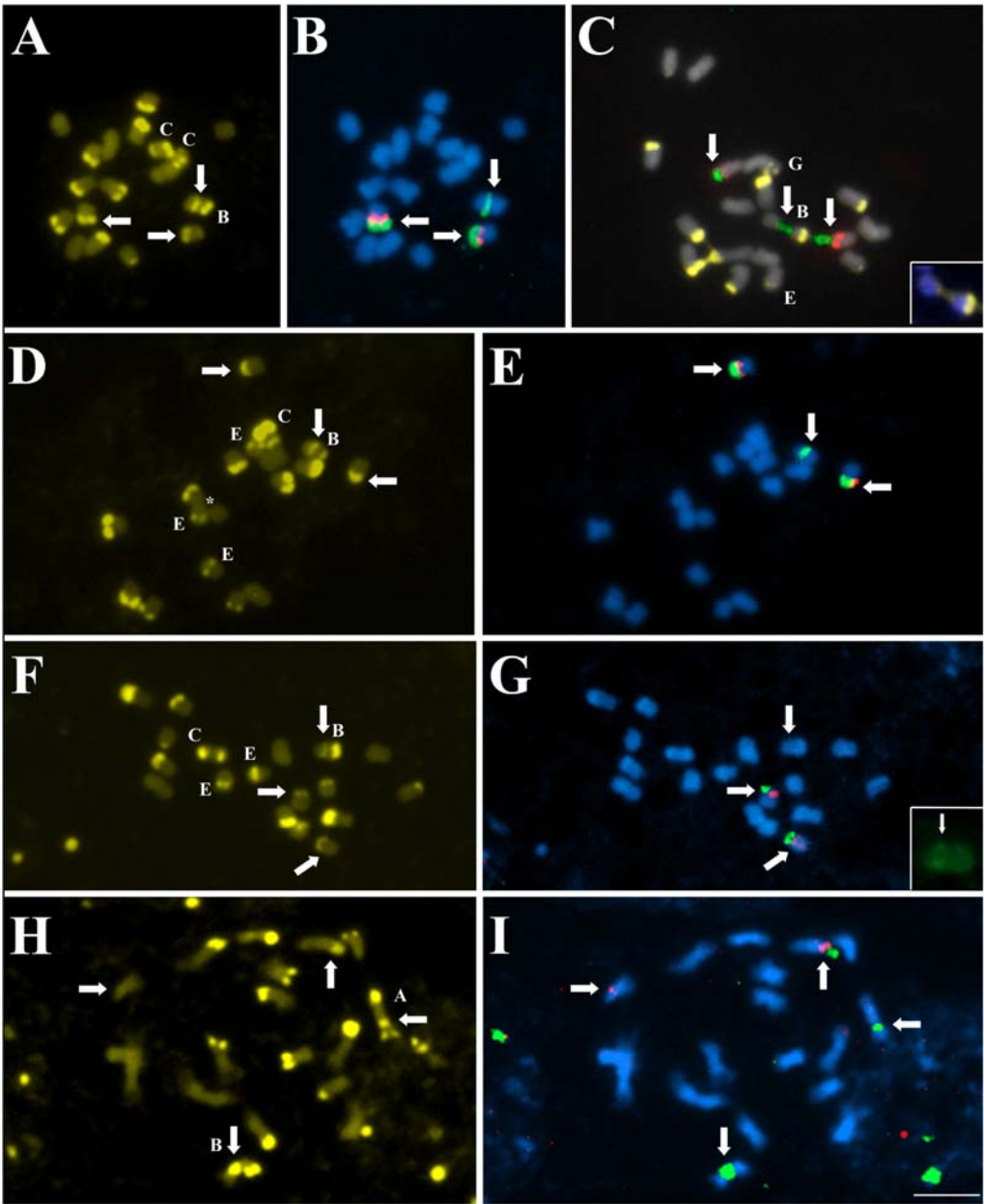


Fig. 2.

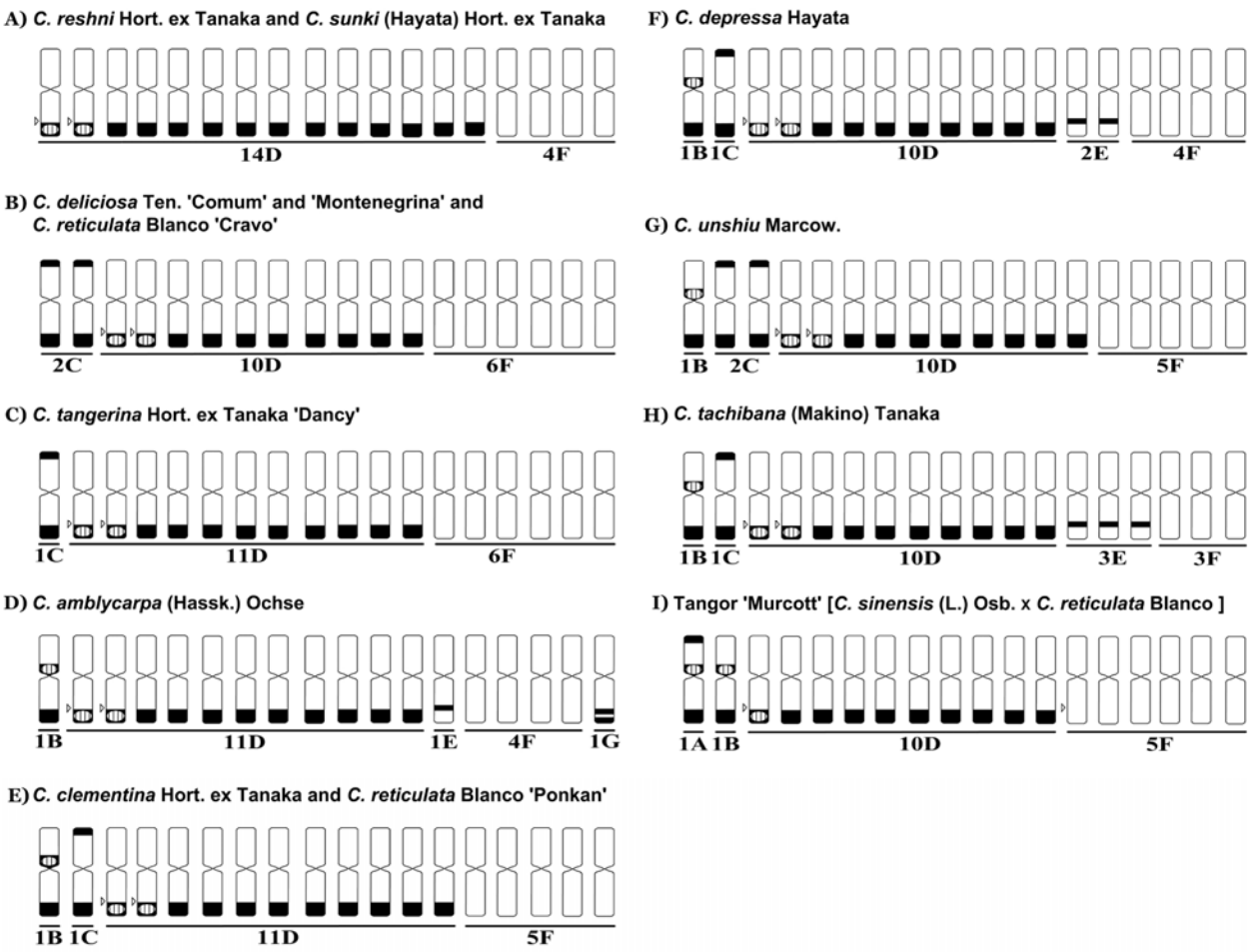


Fig. 3

4.3 MANUSCRITO 3

Construção de um mapa citomolecular em *Poncirus trifoliata* (L.)

Raf.

Manscrito a ser submetido à revista *Genetics* em dezembro de 2007

Construção de Um Mapa Citogenético Molecular em *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

Ana Paula Moraes^{*}, T. Erik Mirkov[†] and Marcelo Guerra^{*1}

^{}Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-420, Brazil and [†]Department of Plant Pathology and Microbiology, The Texas A&M University Agricultural Experiment Station, Weslaco, TX 78596, USA*

¹Autor para correspondência: Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife – PE, Brasil

Mapa Citomolecular em *P. trifoliata*

Palavras chaves: CMA, FISH, BAC, Chromosome mapping, *Poncirus trifoliata*

Autor para correspondência: M. Guerra, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Nelson Chaves S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife – PE, Brasil, telefone: +55-81-2126-8846; fax: +55-81-2126-8348; e-mail: mguerra@ufpe.br

RESUMO

Neste trabalho, os nove pares cromossômicos de *P. trifoliata* foram identificados com base na hibridização de seqüências de cópia única, em conjunto com o bandeamento CMA/DAPI e localização de sítios de DNAr 45S. Os BACs utilizados foram selecionados a partir da biblioteca genômica de *P. trifoliata* ‘Pomeroy’ pela fraca/ausente reação de hibridização com a sonda genômica. Na hibridização *in situ* a maioria dos BACs gerou sinais fortes nos cromossomos e sem a necessidade de utilização de DNA bloqueador. Apenas dois BACs marcaram todo o complemento cromossômico e cinco, as regiões pericentroméricas de todos os cromossomos. Dentre os cromossomos do tipo B, cada braço cromossômico foi mapeado por, pelo menos, um BAC. Entre os cromossomos D, dois foram identificados por BACs, ambos mapeados nas regiões terminais do braço longo dos pares cromossômicos, um pelo sítio de DNAr 45S e outro pela ausência de marcas. Seis BACs permitiram o reconhecimento dos três pares de cromossomos F, sendo que quatro BACs foram selecionados da região do gene de resistência ao vírus da tristeza dos citros, gerando sinais co-localizados em um único par de F.

Os citros são amplamente cultivados nas áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo, constituindo uma das mais importantes fruticulturas, sendo o Brasil e os EUA os maiores produtores. Contudo, a produtividade brasileira média é baixa (duas caixas por hectare), principalmente devido ao ataque de patógenos, como o vírus da tristeza dos citros, VTC (Machado *et al.* 2005), que causa grandes perdas econômicas pela morte das plantas e redução

do tamanho dos frutos (Meissner *et al.* 2002). Entre as espécies de *Citrus*, nenhuma apresenta resistência a esta doença, entretanto, no gênero *Poncirus*, proximamente relacionado ao *Citrus*, tem sido demonstrada resistência ao VTC, que pode ser transferida para *Citrus* (Garnsey *et al.* 1987).

A característica de resistência ao VTC foi mapeada geneticamente nos grupos de ligação I por Gmitter *et al.* (1996) e Cristofani *et al.* (1999) e no grupo de ligação IV por Ruiz e Asíns (2003) e Bernet *et al.* (2004). Contudo, os mapas genéticos elaborados nesses dois trabalhos não apresentam marcadores em comum, não havendo relação entre eles. Os demais mapas genéticos disponíveis para *P. trifoliata* (L.) Raf. são pouco saturados e apresentam números de grupos de ligação e número haplóide de cromossomos diferentes (p. ex. Cristofani *et al.* 1999), dificultando a integração dos mapas genético e cromossômicos. Os mapas de ligação, a menos que estejam integrados a mapas cromossômicos, revelam muito pouco da distribuição física dos grupos de genes e marcadores genéticos (Islam-Faridi *et al.* 2002).

Por sua vez, a caracterização cromossômica de *P. trifoliata*, assim como a de diversos representantes da tribo Citreae, tem sido muito informativa, principalmente a partir da utilização da técnica de bandeamento cromossômico com cromomicina A₃ (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Os fluorocromos CMA e DAPI apresentam afinidades diferentes, ligando-se preferencialmente a regiões ricas em GC e AT, respectivamente, formando blocos brilhantes chamados bandas CMA⁺ ou DAPI⁺. Todas as bandas identificadas em Citreae foram CMA⁺ e permitiram diferenciar os cromossomos dessas espécies em sete tipos diferentes, de acordo com o número e posição das bandas (Carvalho *et al.* 2005). Esses tipos cromossômicos foram designados por letras, de A a G, de acordo com a nomenclatura descrita por Guerra (1993) e ampliada por Carvalho *et al.* (2005). Dentre os tipos identificados, cinco estão sempre em número reduzido e representam os mais indicativos das relações entre as espécies, sendo chamados de cromossomos marcadores (cromossomos tipos A, B, C, E e G), enquanto os outros dois (D e F) são mais freqüentes (Figura 1a). A origem destes tipos cromossômicos não é totalmente compreendida. As diferenças morfológicas existentes entre alguns cromossomos do

mesmo tipo sugerem que é possível que cada tipo tenha surgido mais de uma vez na evolução deste grupo e que cromossomos do mesmo tipo não sejam obrigatoriamente homólogos ou homeólogos.

A introdução da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) na citogenética deste grupo significou um refinamento na análise cromossômica, localizando sítios de DNAr 5S e 45S e elevando para 15 os tipos cromossômico conhecidos (Carvalho *et al.* 2005; Brasileiro-Vidal *et al.* 2007; Moraes *et al.* 2007, no prelo). Até o momento, aproximadamente 100 acessos de *Citrus* e gêneros próximos foram analisados com bandeamento CMA/DAPI e metade destes também com FISH de DNAr 5S e 45S (Guerra *et al.* 1993; Miranda *et al.* 1997a, b; Pedrosa *et al.*, 2000; Befu *et al.* 2000, 2001, 2002, Yang *et al.* 2002; Cornélio *et al.* 2003; Yamamoto e Tominaga 2003; Yamamoto *et al.* 2005, 2007). Com a introdução desses parâmetros os tipos cromossômicos mais abundantes (D e F) foram subdivididos em seis tipos, sendo quatro destes com sítios de DNAr 5S/45S (Figura 1b) e muito informativos filogeneticamente (Carvalho *et al.* 2005; Moraes *et al.* 2007, no prelo).

Apesar do grande número de tipos cromossômicos reconhecidos, ainda não é possível identificar todos os pares cromossômicos, seja em *Poncirus*, seja em outro gênero relacionado. Em *P. trifoliata*, a coloração com CMA e DAPI permitiu dividir os nove pares cromossômicos em três grupos: 4B + 8D + 6F. Entre os cromossomos F um par foi diferenciado dos demais por ser o maior do complemento, chamado de F_L. A localização dos genes de DNAr 5S e 45S demonstrou a existência em *P. trifoliata* de um tipo cromossômico exclusivo, o B/5S-45S (cromossomo do tipo B com um sítio de DNAr 5S adjacente ao sítio de DNAr 45S co-localizado com a banda proximal CMA⁺). Outro par de cromossomos D também apresentou sítios de DNAr 5S-45S adjacentes, com o sítio do DNAr 45S co-localizado com a banda CMA⁺ (Brasileiro-Vidal *et al.* 2007).

O desenvolvimento de marcadores citomoleculares adicionais é de grande interesse para a citogenética vegetal. As bibliotecas genômicas, que vêm sendo desenvolvidas para diversas espécies vegetais, servem como fonte de um grande número de sondas de cópia única, as quais

podem ser localizadas diretamente nos cromossomos. A hibridização *in situ* dessas seqüências permite o reconhecimento individual dos cromossomos, a integração de mapas cromossômicos e genéticos, além de auxiliar nas análises da relação cromossômica entre espécies e gêneros relacionados (Kulikova *et al.* 2001; Cheng *et al.* 2001; Howell *et al.* 2002; Pedrosa *et al.* 2003; Hasterok *et al.* 2006).

Em vista do grande interesse na elaboração de um mapa cromossômico e na introdução de novas marcas moleculares nos cromossomos de *P. trifoliata*, o presente trabalho teve por objetivo selecionar seqüências de cópia única na biblioteca genômica e hibridizá-las *in situ*. Os dados de FISH das seqüências de cópia única foram comparados aos dados de bandeamento CMA/DAPI e localização de sítios de DNAr 45S. A região de resistência ao VTC também foi localizada diretamente nos cromossomos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material: Sementes germinadas e indivíduos jovens de *P. trifoliata* foram utilizados para análise. O material foi proveniente do Banco de Germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Preparação das lâminas e coloração CMA/DAPI: As raízes foram pré-tratadas em 8-hidroxiquiloneína (0,002 M) por 24 h a 10°, fixadas em 3:1 (etanol absoluto: ácido acético glacial) por 2-24 h e estocados a -20°. A metodologia para preparo de lâminas foi realizada como descrito em Moraes *et al.* (2007). As lâminas envelhecidas por três dias foram coradas com CMA (0.5 mg/mL), por 1 h, seguido por DAPI (1 µg/mL), por 30 min. As metáfases foram fotografadas com câmera Cohu utilizando o software QFISH (Leica).

Hibridização fluorescente *in situ*: Os sítios de DNAr 45S foram localizados utilizando a sonda R2, um fragmento de 6,5 kb contendo a unidade de repetição 18S-5,8S-25S de *Arabidopsis thaliana*. O plasmídio contendo o DNAr 45S e os BACs selecionados foram marcados por *nick translation* (Life Technologies) com digoxigenina-11-dUTP e Cy3-dUTP,

respectivamente. A FISH seguiu protocolo de Jiang *et al.* (1995) com pequenas modificações. A hibridização foi realizada com nível de estrigência de 73%. As concentrações das sondas foram empiricamente ajustadas, aumentando a quantidade para reforçar sinais fracos e diminuindo para controlar sinais fortes. Quando necessária, a fração repetitiva *Cot*-1 do DNA genômico de *P. trifoliata*, preparada segundo Zwick *et al.* (1997), foi adicionada à mistura de hibridização como DNA bloqueador. O sítio de DNAr 45S foi detectado com o anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em ovelha e conjugado com FITC (Dako) e amplificado com anticorpo contra anticorpos de ovelha desenvolvido em coelho e conjugado com FITC (Roche). Todas as preparações foram contracoradas com DAPI (2 µg/mL) e montadas em Vectashield (Vector). As imagens foram adquiridas como descrito anteriormente.

Screening da biblioteca de BACs: A biblioteca genômica de *P. trifoliata* ‘Pomeroy’ está plotada em três filtros de alta densidade (<http://www.genome.clemson.edu>). Destes, apenas o filtro A foi utilizado. A sonda genômica foi marcada com [³²P]dCTP por *random primer* e adicionada no tampão de hibridização, preparado de acordo com protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989). A hibridização foi realizada por 18 h a 65°, sob agitação. As lavagens foram realizadas com alta estrigência (2 × SSC + 0,1% SDS, 1 × SSC + 0,1% SDS, 0,1 × SSC + 0,1% SDS, 15 min cada). A detecção da hibridização foi feita pela exposição do filtro ao filme de raio-X (Kodak), por 24 h a -80°. Foram selecionados os BACs que apresentaram fraca ou ausente reação de hibridização à sonda genômica. Os BACs selecionados no filtro da biblioteca, após a confirmação da presença do inserto, passaram por uma nova seleção a partir de *dot-blot* em membrana, utilizando kit *DIG-High Prime* (Roche), de acordo com as especificações do fabricante.

RESULTADOS

Hibridização do filtro da biblioteca de BAC: Visando selecionar BACs que não tivessem DNA repetitivo no inserto, um dos filtros da biblioteca genômica de *P. trifoliata* foi

hibridizado com sonda genômica marcada radiotivamente. Foram selecionados os BACs que não apresentaram reação de hibridização com a sonda, ou apresentaram reação muito fraca. Um total de 5.184 clones foi selecionado a partir de um único filtro da biblioteca genômica, representando 28,12% do total de clones. Destes, uma sub-amostra de 264 clones foi hibridizada em membrana, visando selecionar aqueles que não apresentaram sinal devido apenas à ausência de DNA repetitivo no inserto e não devido à baixa taxa de crescimento da bactéria ou à ausência de inserto. Os BACs utilizados na FISH foram derivados desta sub-amostra.

Os BACs mapeados previamente em um *contig* de 1,2 Mb contendo o gene de resistência ao VTC também foram selecionados pela fraca/ausente reação com a sonda genômica. Partindo de uma sub-amostra de 35 BACs desta região, apenas 12 clones foram selecionados, dos quais cinco foram hibridizados *in situ*.

Hibridização *in situ*: Foram hibridizados 24 BACs, permitindo identificar sete dos nove pares cromossômicos. Contudo, os nove pares puderam ser diferenciados com a união dos dados de bandeamento CMA/DAPI e FISH de DNAr 45S, uma vez que os dois cromossomos não mapeados são do tipo D, um com e outro sem sítio de DNAr 45S. Todos os pares identificados foram homomórficos para o padrão de bandas CMA/DAPI, em acordo com Brasileiro-Vidal *et al.* (2007). Deste conjunto de BACs dois apresentaram marcação dispersa em todo o complemento cromossômico (BAC 07A09 e 18C13; Fig. 2A), cinco marcaram a região pericentromérica de todo o complemento cromossômico (BACs 02B10, 03K13, 03N09, 07F02 e 08C13; Fig. 2B) e quatro não apresentaram marcação (BACs 08B11, 13G02, 14B12 e 48B13). Nenhum dos BACs mapeados coincidiu com as bandas CMA⁺, inclusive os BACs que apresentaram marcação dispersa e pericentromérica. Nos cromossomos B foi possível observar blocos de marcação dos BACs pericentroméricos adjacente dos dois lados da banda CMA⁺ (Fig. 2B).

Os demais 13 BACs geraram sinais únicos nos cromossomos. Os clones que hibridizaram em cromossomos do mesmo tipo foram re-hibridizados conjuntamente em uma mesma lâmina, permitindo checar se estavam no mesmo par cromossômico ou não. A maioria dos clones

apresentou sinais fortes e altamente reprodutíveis, sendo que apenas três clones (01B09, 14A12 e 24C13) produziram sinais fracos não identificáveis em todas as células da lâmina e apenas em dois BACs (2G12 e 6I11) foi preciso utilizar DNA bloqueador C_{ot} -1 (Tabela 1).

Nos dois pares de cromossomos do tipo B, cada braço cromossômico foi identificado por, pelo menos, um clone: par 1) BACs 27P09 e 28A07 co-localizados na região terminal do braço curto e o BAC 14A12 na região intersticial do braço longo, par 2) BAC 21L13 na região terminal do braço curto e o BAC 06I11 na região intersticial do braço longo (Figura 3A-B). O sinal do BAC 14A12 pareceu, algumas vezes, estar localizado dentro da banda CMA^+ , mas provavelmente isto se deveu ao fato de que a banda CMA^+ indica uma região maior do que a realmente ocupada pelas seqüências de DNA repetitivo ricas em GC, provavelmente devido a um artefato óptico causado pelo longo tempo de exposição necessário para visualização da heterocromatina. O mesmo BAC, quando hibridizado em cromossomos mais distendidos gerou sinal claramente ao lado da banda CMA^+ (detalhe na Figura 3B).

Dentre os quatro pares de cromossomos do tipo D, dois foram reconhecidos pela presença de BACs no braço curto (par 1, BAC 02C12 na região sub-terminal e par 2, BAC 28A05, na região terminal). Outro par foi identificado pela presença do sítio de DNAr 45S co-localizado com a banda CMA^+ , enquanto o quarto par foi diferenciado dos demais pela ausência de marcas (Figura 3C-D). Os três pares de cromossomos F foram mapeados (Figura 3E-F). O primeiro par foi identificado por quatro, dos cinco BACs hibridizados da região do gene de resistência ao VTC (BACs 02G12, 24E07, 36A15 e 55B01). Os quatro BACs foram co-localizados na região intersticial de um dos braços deste par de cromossomos F. O BAC 01B09 identificou o outro par de cromossomos F, marcando na região terminal de um dos braços. O maior cromossomo do complemento, F_L , além de ser identificado pela sua morfologia, também pôde ser identificado pelo BAC 24C13, na região terminal de um dos braços e pelo BAC 59C23, também da região do VTC, na região intersticial do mesmo braço. A figura 4 mostra o idiograma com a posição de todos os BACs que apresentaram sinais únicos e sítios de DNAr 45S, demonstrando o reconhecimento de cada par cromossômico.

DISCUSSÃO

A FISH de BACs é uma excelente ferramenta no estabelecimento de novas marcas moleculares na citogenética de plantas, além de ser útil no desenvolvimento de mapas citogenéticos em espécies vegetais de importância comercial. FISH de BACs de cópia única permitiu o reconhecimento individual dos nove pares cromossômicos em *P. trifoliata*.

Uma parcela substancial do genoma das plantas é composta por DNA repetitivo organizado em tandem ou disperso (Sharma e Raina 2005). As espécies de *Citrus* apresentam grandes blocos de DNA repetitivo em tandem, rico em GC, que formam as bandas CMA⁺. Ingle *et al.* (1973) descreveu que um único DNA satélite representava 25% do genoma de citros e Barros e Silva *et al.* (em prep.) demonstraram que uma única sequência de DNA satélite (CsSat181) é responsável pela formação de todos os blocos CMA⁺ em espécies de *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, à exceção das bandas co-localizadas com sítios de DNAr 45S, que são formadas pelas unidades de repetição 18S-5,8S-28S. Esses blocos heterocromáticos CMA⁺ chegam a compreender, em algumas espécies cítricas, quase metade do genoma. Outra fração de DNA repetitivo está presente, porém dispersa ao longo do genoma. Esta fração foi detectada nos dois BACs (07A09 e 18C13) que marcaram todo o complemento cromossômico de *P. trifoliata*, à exceção das bandas CMA⁺, ocupadas por DNA satélite, e sítios de DNAr 45S, ocupados pelas unidades de repetição.

A FISH de BACs sem a seleção prévia dos clones que possuem DNA repetitivo no inserto pode resultar em um grande número de marcas dispersas. Suzuki *et al.* (2001) hibridizaram 91 BACs selecionados aleatoriamente em *Allium cepa* e sem a utilização de DNA bloqueador. Destes, somente quatro geraram sinais únicos, sendo que a grande maioria (68 BACs) hibridizou ao longo de todos os cromossomos. Janda *et al.* (2006) observaram em trigo uma alta frequência de BACs que hibridizaram com todo o complemento cromossômico (aproximadamente 70%) e identificaram esses BACs como contendo partes de elementos transponíveis, principalmente retrotransposons. Hanson *et al.* (1995) analisaram, em algodão, 11

BACs, dos quais 82% apresentavam DNA repetitivo. Neste trabalho, a utilização da hibridização em membrana, utilizando DNA genômico como sonda, filtrou os BACs com seqüências repetitivas no inserto, reduzindo em muito o número de BACs que apresentam marcação inespecífica (8% dos BACs hibridizados) e que necessitaram de DNA bloqueador, também 8% dos BACs.

Além dos BACs dispersos, cinco BACs apresentaram marcação pericentromérica e nenhum apresentou marcação telomérica. A região pericentromérica apresenta uma grande quantidade de DNA repetitivo, fazendo com que seja mais provável a identificação de BACs com frações de DNA repetitivos pericentroméricos do que teloméricos. Diversos trabalhos têm demonstrado que frequentemente são identificados BACs com marcação pericentromérica, porém poucos geraram sinais teloméricos (Suzuki *et al.* 2001; Khrustaleva *et al.* 2005).

Dentre os BACs hibridizados neste trabalho, 60% geraram sinais únicos. Todos os pares cromossômicos foram homomórficos, indicando um alto grau de homozigose desta espécie. Brasileiro-Vidal *et al.* (2007) analisaram seis cultivares de *P. trifoliata*, encontrando a mesma fórmula cromossômica para todos, confirmando que essa espécie apresenta uma baixa diversidade genética, como já sugerido por Fang *et al.* (1997).

Os BACs da região do gene de resistência ao VTC hibridizados neste trabalho são correspondentes a um mapa de *contig* de 1,2 Mb de *P. trifoliata*. Curiosamente, entre os cinco BACs hibridizados, um único BAC gerou sinal em outro cromossomo, separado dos outros quatro. Provavelmente, este BAC não foi corretamente posicionado e não pertence a este *contig*. O mapeamento realizado por Yang *et al.* (2003), onde o gene foi finamente mapeado em uma região de 282 kb, que está englobada pelo *contig* de 1,2 Mb, oferece maior certeza no mapeamento deste gene. O BAC 55B01 foi mapeado dentro desta região de 282 kb e foi localizado no cromossomo F, juntamente com os outros três BACs selecionados deste *contig*. Desta forma, é assumido que o gene de resistência está localizado no cromossomo F e que este cromossomo seja correspondente ao grupo de ligação I de Gmitter *et al.* (1996) e Cristofani *et al.* (1999) ou ao grupo de ligação IV de Ruiz e Asíns (2003) e Bernet *et al.* (2004).

O mapeamento físico dessa região é interessante, uma vez que a correta localização de um gene de resistência poderá indicar a posição dos outros genes de resistência, os quais normalmente encontram-se organizados em grupos ao longo do genoma e um único grupo geralmente possui genes de resistência para diferentes patógenos (Michelmore e Meyers 1998). Por exemplo, em *P. trifoliata* foi reconhecido, próximo ao gene de resistência ao VTC, o gene *Tyr1* que confere resistência ao nematóide *Tylenchuhus semipenetrans* (Deng *et al.* 2000; Bernet *et al.* 2004) e Yang *et al.* (2001), com base em análises em banco de dados indicaram a presença de vários genes candidatos a genes de resistência, como o *RPS2* de *Arabidopsis thaliana*, proximamente ligados ao gene do VTC.

As bibliotecas genômicas construídas em BACs são de grande utilidade na elaboração de mapas citogenéticos, mesmo nos casos onde o mapa de ligação não está disponível. O reconhecimento dos pares cromossômicos em *P. trifoliata* e a subsequente passagem destas marcas para *Citrus* permitirá refinar os estudos de evolução cariotípica dentro deste grupo. A hibridização de outros genes de interesse, mapeados previamente nos grupos de ligação, assim como diferentes marcas genéticas, adicionará novas marcas no mapa cromossômico e permitirá a ancoragem dos grupos de ligação nos cromossomos.

Este trabalho foi financiado pelas agências brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (n. 74589/03-0, 307916/03-0 e 140273/04-2) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia - FACEPE (Edt. 0005-05-03/04).

LITERATURA CITADA

BEFU, M., KITAJIMA, A., LING, Y. X. e K. HASEGAWA, 2000 Classification of 'Tosa-Butan' pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), 'Washington' Navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. J Japan Soc Hort Sci **69**:22-28.

- BEFU, M.; KITAJIMA, A.; K. e HASEGAWA, 2001. Chromosome composition of some *Citrus* species and cultivars based on the chromomycin A3 (CMA) banding patterns. J Japan Soc Hort Sci **70**:83-88.
- BEFU, M., KITAJIMA, A. e K. HASEGAWA, 2002 Classification of the *Citrus* chromosomes with same types of chromomycin A banding patterns. J. Hort Sci **71**:394-400.
- BERNET, G. P., BRETÓ, M. P. E ASINS, M. J., 2004 Expressed sequence enrichment for candidate gene analysis of citrus tristeza virus resistance. Theor Appl Genet **108**: 592-602.
- BRASILEIRO-VIDAL, A.C., DOS SANTOS-SEREJO, J. A., SOARES FILHO, W. S. E M. GUERRA, 2007 A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. Genetica **129**:273-279.
- CARVALHO, R., SOARES FILHO, W.S., BRASILEIRO-VIDAL, A.C. E M. GUERRA, 2005 The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. Cytogenet and Genome Res **109**:276-282.
- CHENG, Z., PRESTING, G. G., BUELL, C. R. B., WING, R. A. E J. JIANG, 2001 High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosome anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. Genetics **157**: 1749-1757.
- CORNÉLIO, M. T. M. N., FIGUEIRÔA, A. R. S., SANTOS, K. G. B., CARVALHO, R., SOARES FILHO, W. S. E M. GUERRA, 2003 Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. Plant Syst. Evol. **240**:149-161
- CRISTOFANI, M., MACHADO, M. A. E D. GRATTAPAGLIA, 1999 Genetics linkage maps of *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. Euphytica **109**: 25-32.
- DENG, Z., TAO, Q., CHANG, Y. L., HUANG, S., LING, P., YU, C., CHEN, C., GMITTER JR., F. G. E H. B. ZHANG, 2001 Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for citrus and identification of BAC contigs containing resistance gene candidates. Theor Appl Genet **102**: 1177-1184.
- FANG, D. Q. E M. L. ROOSE, 1997 Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor Appl Genet **95**:408-417.
- GARNSEY, S. M., BARRET, H. C. E D. J. HUTCHISON, 1987 Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. Phytophylactica **19**: 187-191.

- GMITTER JR, F. G., XIAO, S. Y., HUANG, S., HU, X. L., GARNSEY, S. M. E Z. DENG, 1996 A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. *Theor Appl Genet* **92**: 688-695.
- GUERRA M, 1993 Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* **71**:234-241.
- HANSON, R.E., ZWICK, M.S., CHOI, S., ISLAM-FARIDI, M.N., MCKNIGHT, T.D., WING, R.A., PRICE, H.J. E D. M. STELLY, 1995 Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome* **38**: 646-651.
- HASTEROK, R., MARASEK, A., DONNISON, I. S., ARMSTEAD, I., THOMAS, A., KING, I. P., WOLNY, E., IDZIAK, D., DRAPER, J. E G. JENKINS, 2006 Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence *in situ* hybridization. *Genetics* **173**: 349-362.
- HOWELL E.C., BARKER, G.C., JONES, G.H., KEARSEY, M.J., KING, G.J., KOP, E.P., RYDER, C.D., TEAKLE, G.R., VICENTE, J.G. E S. J. ARMSTRONG, 2002 Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. *Genetics* **161**:1225-1234.
- INGLE, J., PEARSON, G. G. E J. SINCLAIR, 1973 Species distribution and properties of nuclear satellite DNA in higher plants. *Nature New Biol* **242**: 193-197.
- ISLAM-FARIDI, M. N.; CHILDS, K. L.; KLEIN, P. E.; HODNETT, G.; MENZ, M. A.; KLEIN, R. R.; ROONEY, W.L.; MULLET, J. E.; STELLY, D. M.; H. J. PRICE, 2002. A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome 1: fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes. *Genetics* **161**:345-353.
- JANDA, J., SAFAR, J., KUBALÁKOVÁ, M., BARTOS, J., KOVÁROVÁ, P., SUCHÁNKOVÁ, P., PATEYRON, S., CÍHALÍKOVA, J., SOURDILLE, P., SIMKOVÁ, H., FAIVRE-RAMPANT, P., HTIBOVÁ, E., BERNARD, M., LUKASZEWSKI, A., DOLEZEL, J. E B. CHALHOUB, 2006 Advanced resources for plant genomics: a BAC library specific for the short arm of wheat chromosome 1B. *Plant J* **47**:977-986.
- JIANG, J., GILL, B. S., WANGT, G. L., RONALD, P. C. E D. C. WARDT, 1995 Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *PNAS* **92**:4487-4491.
- KULIKOVA, O., GUALTIERI, G., GEURTS, R. A., KIM, D. J., COOK, D., HUGUET, T., DE JONG, J. H., FRANSZ, P.F. E T. BISSELING, 2001 Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *Plant J* **27**:49-58.

- KHRUSTALEVA, L. I., DE MELO, P. E. E A. W. VAN HEUSDEN, 2005 The integration of recombination and physical maps in a large-genome monocot using haploid genome analysis in a trihybrid *Allium* population. *Genetics* **169**: 1673-1685.
- MACHADO, M. A., CRISTOFANI, M., AMARAL, A.M., E A. C. OLIVEIRA, 2005 Genética, melhoramento e biotecnologia de citros, pp. 221-227 em *Citros*, editado por D. MATTOS JÚNIOR, J. D. NEGRI, R. M. PIO, e J. POMPEU JÚNIOR. IAC/Campinas.
- MEISSNER FILHO, P.E., SOARES FILHO, W. DOS S., VELAME, K.V.C., DIAMANTINO, E.P. & DIAMANTINO, M.S.A.S. Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*. *Fitopat Brasil* **27**: 312-315. 2002.
- MICHELMORE, R. W. E B. C. MEYERS, 1998 Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res* **8**: 1113-1130.
- MIRANDA M, IKEDA F, ENDO T, MORIGUCHI T E M. OMURA, 1997b rDNA sites and heterochromatin in Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swing.) chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI staining. *Caryologia* **50**: 333-340.
- MIRANDA M, IKEDA F, ENDO T, MORIGUCHI T, OMURA M, 1997a Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chromosome Res* **5**: 86-92.
- MORAES, A. P., SOARES FILHO, W. S. E M. GUERRA, 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res* **15**: 115–121.
- MORAES, A. P., LEMOS, R. R., BRASILEIRO-VIDAL, A. C., SOARES FILHO, W. S. E M. GUERRA, NO PRELO Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrids accessions of mandarin. *Cytogenet and Genome Res*.
- PEDROSA, A., SCHWEIZER, D. E M. GUERRA, 2000 Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor Appl Genet* **100**:361-367
- PEDROSA, A., VALLEJOS, C. E., BACHMAIR, A. E D. SCHWEIZER, 2003 Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theor Appl Genet* **106**: 205–212.
- RUIZ, C. E M. J. ASINS, 2003 Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. *Theor Appl Genet* **106**: 826-836.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. E T. MANIATIS, 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. 2º ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, NY.
- SHARMA, S. E S. N. RAINA, 2005 Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenet and Genome Res* **109**:15-23.

- SUZUKI, G., URA, A., SAITO, N., DO, G. S., SEO, B. B., YAMAMOTO, M. E Y. MUKAI, 2001 BAC FISH analysis in *Allium cepa*. Genes Genet Syst **76**: 251-255.
- YAMAMOTO, M. E S. TOMINAGA, 2003 High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. Euphytica **129**: 267-274.
- YAMAMOTO, M., ABKENAR, A. A., MATSUMOTO, R., NESUMI, H., YOSHIDA, T., KUNIGA, T., KUBO, T. E S. TOMINAGA, 2007 CMA Banding Patterns of Chromosomes in Major *Citrus* Species. J. Japan. Soc. Hort. Sci. **76**: 36–40
- YAMAMOTO, M., KUBO, T. E S. TOMINAGA, 2005 CMA banding patterns of chromosome of Mid – and Late – maturing *Citrus* and Acid *Citrus* grown in Japan. J. Japan. Soc. Hort. Sci **6**:476-478.
- YANG, X., KITAJIMA, A. E K. HASEGAWA, 2002 Chromosome pairing set and the presence of unreduced gametes explain the possible origin of polyploid progenies from the diploids ‘Tosa-Butan’ X ‘Suisho-Butan’ pummelo. J Japan Soc Hort Sci **71**:538-543.
- YANG, Z. N., YE, X. R., CHOI, S., MOLINA, J., MOONAN, F., WING, R. A., ROOSE, M. L. E T. E. MIRKOV, 2001 Construction of a 1.2 Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Genome **44**: 382-393.
- YANG, Z. N., YE, X. R., MOLINA, J., ROOSE, M. L. E T. E. MIRKOV, 2003 Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) locus in *Poncirus trifoliata* L. Raf. Plant Physiol **131**: 482-492.
- ZWICK, M. S., HANSON, R. E., MCKNIGHT, T. D., ISLAM-FARIDI, M. H., STELLY, D. M., WING, R. A. E H. J. PRICE, 1997 A rapid procedure for the isolation of *Cot*-1 DNA from plants. Genome **40**: 138-142.

Tabela 01: BACs hibridizados, com as suas respectivas posições e utilização de DNA bloqueador *C_{ot}-1*.

BAC	Cromossomo	Região	Bloqueio com <i>C_{ot}-1</i>
06I11	B	Intersticial braço longo	10x
14A12	B	Intersticial braço longo	
21L13	B	Terminal braço curto	
27P09	B	Terminal braço curto	
28A07	B	Terminal braço curto	
02C12	D	Subterminal braço curto	
28A05	D	Terminal braço curto	
01B09	F	Terminal	
02G12	F	Intersticial	10x
24E07	F	Intersticial	
55B01	F	Terminal	
24C13	F _L	Sub terminal	
59C23	F _L	Intersticial	
07A09	Todos	Disperso	
18C13	Todos	Disperso	
02B10	Todos	Pericentromérico	
03K13	Todos	Pericentromérico	
03N09	Todos	Pericentromérico	
07F02	Todos	Pericentromérico	
08C13	Todos	Pericentromérico	
08B11	Não teve sinal		
13G02	Não teve sinal		
14B12	Não teve sinal		
48B13	Não teve sinal		

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 1. — Tipos cromossômicos descritos para *Poncirus* e gêneros relacionados. (A) Tipos cromossômicos baseados em bandeamento CMA/DAPI. (B) Tipos cromossômicos reconhecidos após FISH de DNAr 5S-45S. Blocos amarelos = bandas CMA⁺, regiões azuis = contracoloração com DAPI.

FIGURA 2. — BACs dispersos e pericentroméricos em cromossomos de *Poncirus trifoliata*. (A) Metáfase corada com CMA/DAPI hibridizada com BAC 18C13 (sinais em laranja), representando BACs com marcação dispersa. (B) Metáfase corada com CMA/DAPI hibridizada com BAC 02B10 (sinais em laranja), representando BACs com marcação pericentromérica. Barra = 10 µm.

FIGURA 3. — Identificação dos nove pares cromossômicos de *P. trifoliata* por FISH de BAC, DNAr 45S e bandeamento CMA/DAPI. (A) Metáfase corada com CMA; (B) Metáfase hibridizada com os BACs dos cromossomos B – par 1: 27P09 (vermelho, terminal do braço curto), 28A07 (verde, terminal do braço curto), 14A12 (vermelho, intersticial braço longo) e par 2: BAC 21L13 (azul, terminal do braço curto), 06I11 (verde, intersticial do braço longo); (C) Metáfase corada com CMA e DAPI; (D) Metáfase hibridizada com os BACs dos cromossomos D e DNAr 45S – par 1: 02C12 (vermelho, sub-terminal no braço curto), par 2: 28A05 (vermelho, terminal do braço curto), par 3: sítio de DNAr 45S (verde, terminal no braço longo); (E) Metáfase corada com CMA; (F) Metáfase hibridizada com os BACs dos cromossomos F – par 1: 01B09 (vermelho, terminal), par 2: 02G12 (azul), 24E07 (rosa), 36A15 (vermelho) e 55B01 (verde), todos co-localizados na região intersticial de um dos braços, par 3-F_L: 24C13 (rosa, terminal), 59C23 (intersticial). Os pares cromossômicos estão indicados nas metáfases em A, C e E, seguindo a ordem, par 1: vermelho, par 2: azul, par 3: verde. Setas em (B) indicam o BAC 14A12 e cabeças de seta, o BAC 06I11. Setas em (D) indicam o BAC 28A05 e cabeças de setas, o BAC 02C12. Setas em (F) indicam o BAC 59C23. Detalhe em (B) mostra cromossomo B, de outra metáfase mais distendida, corado com CMA/DAPI e hibridizado com os BACs 28A07,

27P09 e 14A12. Notar que o BAC 14A12 está localizado ao lado da banda CMA⁺ terminal do braço longo. Detalhes em (F) mostram os cromossomos do par dois com apenas um BAC hibridizado por vez. O DAPI, utilizado como contra corante foi pseudocolorido em cinza. Barra = 10 µm.

FIGURA 4. — Idiograma de *Poncirus trifoliata* representando o padrão de bandas CMA⁺, localização dos sítios de DNAr 45S e BACs de cópia simples. Os cromossomos estão ordenados de acordo com o tipo cromossômico. As cores dos sinais, dentro de cada tipo cromossômico, representam os diferentes BACs listados abaixo dos cromossomos. Blocos amarelos representam as bandas CMA⁺ e os círculos verdes co-localizados com bandas CMA⁺, os sítios de DNAr 45S.

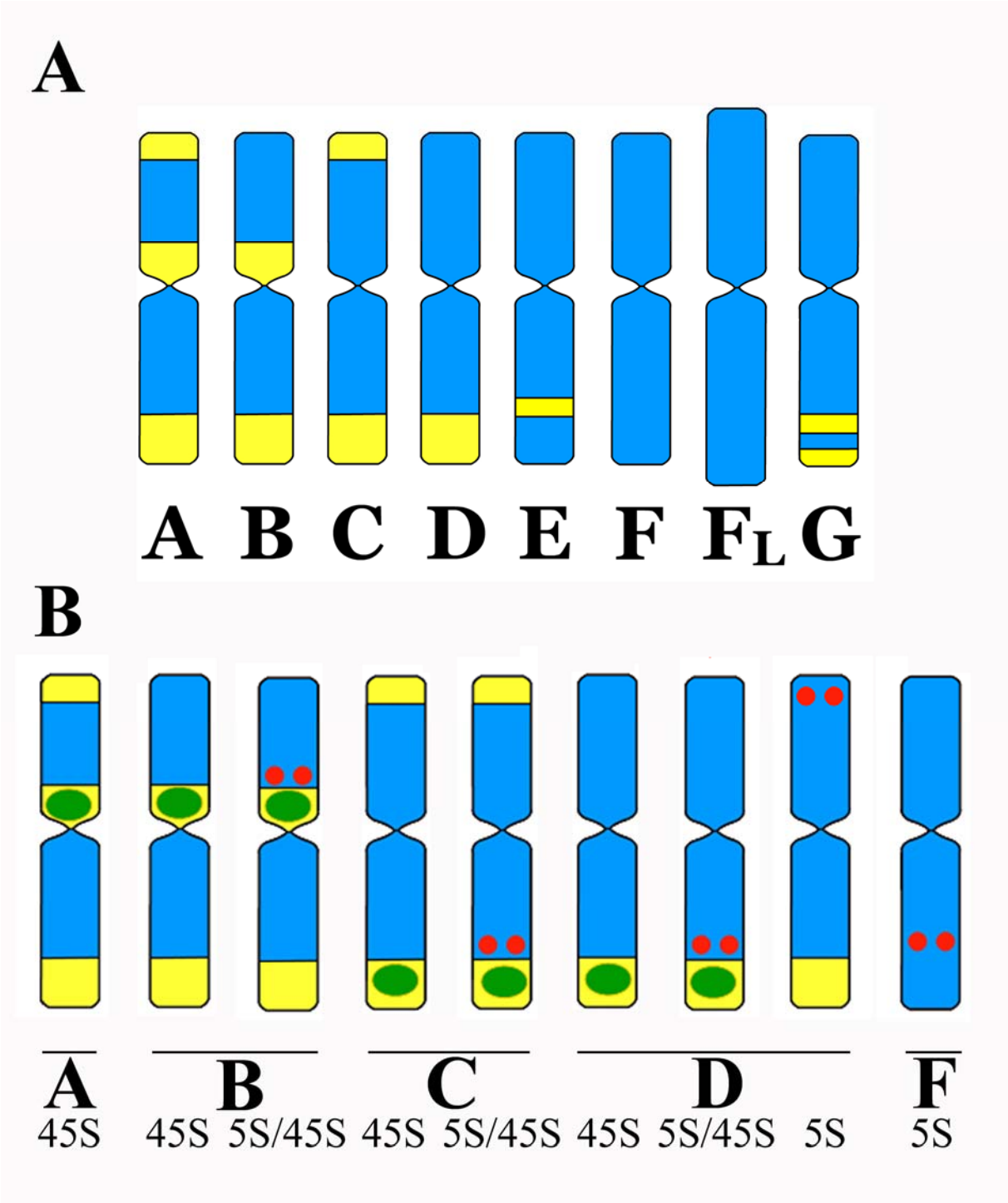


Figura 1.

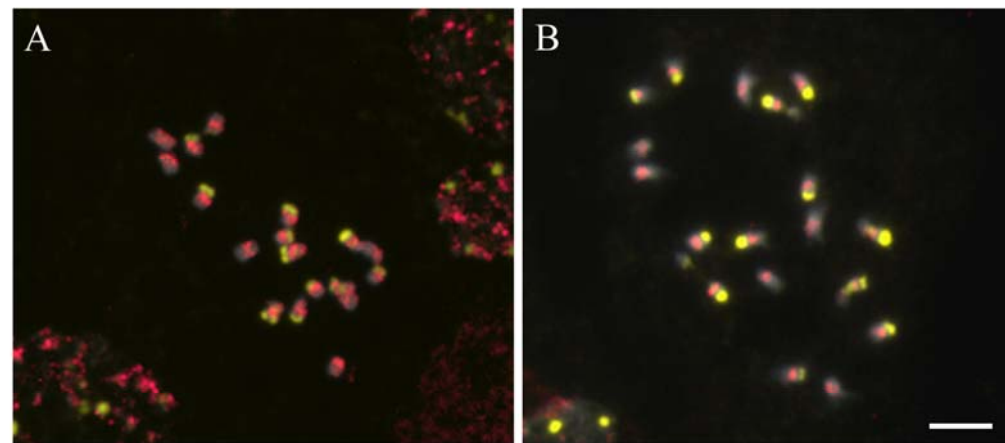


Figura 2.

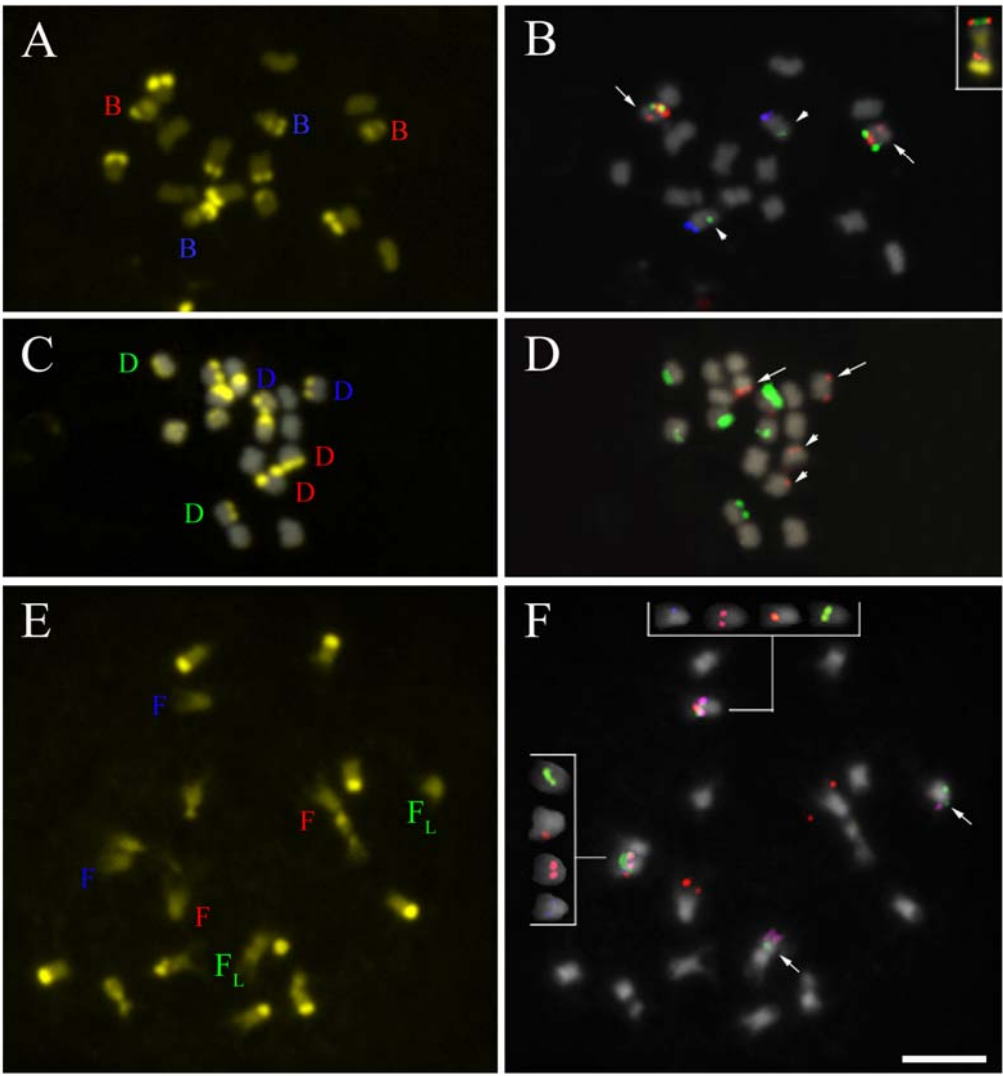


Figura 3.

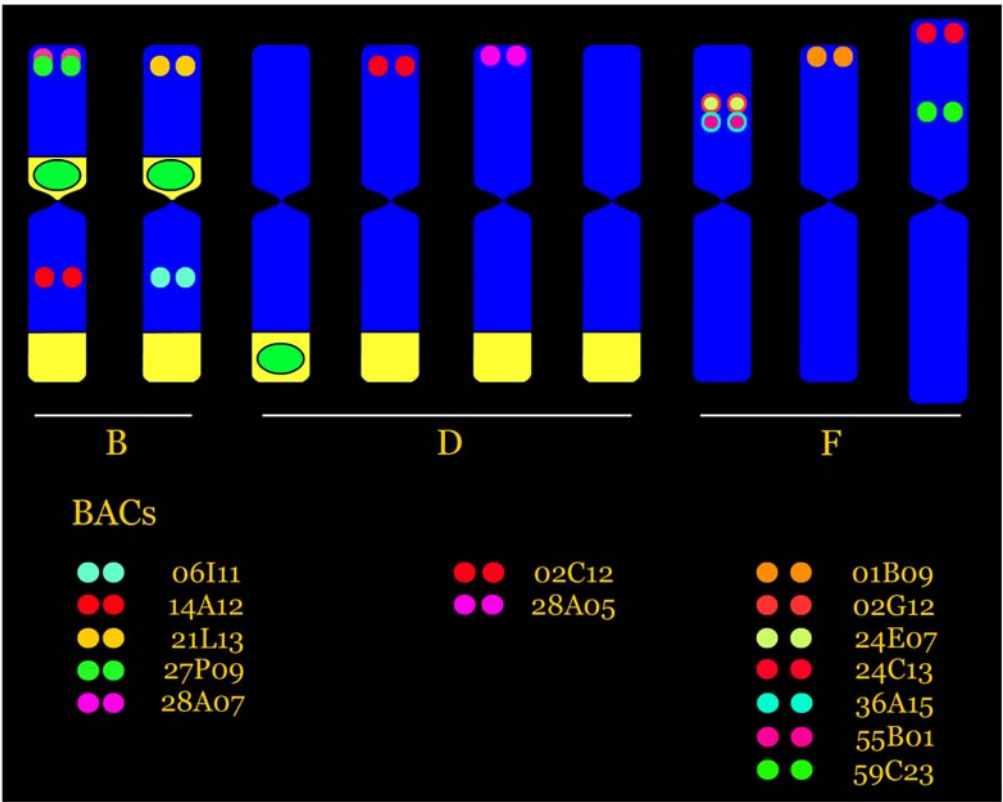


Figura 4.

5 CONCLUSÕES

5.1 – A técnica de bandeamento CMA/DAPI representa uma abordagem informativa para estudos de sistemática. O grupo das espécies cítricas tem sido bastante beneficiado, devido à presença de grandes blocos de heterocromatina rica em GC nos seus cromossomos, revelados como bandas CMA⁺. A presença dessas bandas em diferentes posições nos cromossomos permitiu classificar e diferenciar os cromossomos em diferentes tipos cromossômicos que se combinam diferentemente entre as espécies. Em alguns casos, foi possível diferenciar inclusive acessos de uma mesma espécie. Os dados de FISH com DNAr 5S e 45S refinaram essas análises, permitindo relacionar as espécies com maior segurança.

5.2 – Os tipos cromossômicos permitiram, além de agrupar ou separar espécies, ampliar o entendimento da evolução do grupo. As análises citogenéticas, baseadas em bandeamento CMA/DAPI e FISH, indicam que há cinco espécies puras: cidra (*C. medica*), toranja (*C. grandis*) e três tangerinas (*C. sunki*, *C. reshni* e *C. deliciosa*). Essas cinco espécies puras apresentam cariótipos homomórficos e tipos cromossômicos característicos, que podem traçar a relação destas espécies com as de origem híbrida. Neste trabalho foram encontrados tipos cromossômicos para quatro espécies básicas: F/5S para a toranja e D/5S-45S para o grupo das tangerinas. Estes tipos são encontrados em homozigose nestas espécies e em heterozigose em supostos híbridos.

5.3 – Os cromossomos marcadores são de grande valia principalmente no caso de um gênero com tantos híbridos interespecíficos. Por exemplo, a origem dos pomelos é atribuída a um evento de hibridação entre a toranja e a laranja-doce. A análise citogenética confirmou esta suposição e indicou que os acessos de pomelos não são tão uniformes como se acreditava. Como a formação de cultivares em pomelos deve-se à mutação somática, o que geralmente não gera polimorfismos cromossômicos, a presença de diferentes fórmulas cromossômicas entre as cultivares sugere que o estoque inicial de pomelo cultivado era heterogêneo. Possivelmente diferentes eventos de hibridação ocorreram entre a laranja-doce e a toranja, formando pomelos com diferentes fórmulas cromossômicas.

5.4 – As tangerinas constituem um grupo ora considerado como natural, ora como uma associação artificial de espécies relacionadas. As análises moleculares são relativamente consistentes no agrupamento de *C. tangerina* cv. Dancy com *C. deliciosa* e no posicionamento mais externo de *C. tachibana*. Os cromossomos marcadores não separaram claramente *C. tachibana* das demais tangerinas, mas separou as tangerinas em quatro subgrupos. Os dois primeiros grupos estão relacionados entre si, ficando *C. sunki* e *C. reshni* em um grupo e *C.*

deliciosa e *C. tangerina* cv. Dancy em outro. Ambos os grupos apresentam a mesma distribuição de sítios de DNAr, porém diferenciam-se pelas fórmulas cromossômicas, homomórficas. Esses dois grupos também se diferenciam pela sua distribuição geográfica e por caracteres morfológicos. O terceiro grupo é composto pelos híbridos intraespecíficos de tangerina, apresentando fórmulas cromossômicas diversas, mas com posição dos sítios de DNAr idêntica. O quarto grupo apresentou alta diversidade em relação à fórmula cromossômica, o que era esperado para um híbrido interespecífico. O cromossomo marcador de tangerina (D/5S-45S) foi encontrado em heterozigose neste último grupo.

5.5 – Dentre os 23 clones de BACs, 13 mostraram-se úteis no mapeamento cromossômico de *Poncirus trifoliata*, permitindo reconhecer cada par cromossômico individualmente. Neste trabalho foram utilizados BACs não localizados no mapa genético, como geralmente se utiliza. Estes BACs foram selecionados por hibridização em membrana, utilizando DNA genômico como sonda. Dessa maneira, foi possível reconhecer os clones com pouco ou sem DNA repetitivo da biblioteca genômica, auxiliando no processo de mapeamento cromossômico.

5.6 – O genoma de *P. trifoliata*, avaliado previamente pelo bandejamento CMA/DAPI e localização de sítios de DNAr 5S e 45S, pareceu citologicamente homomórfico. Os dados obtidos com BACs de cópia única reforçam essa observação, uma vez que todos os BACs geraram sinais em um par de cromossomos do mesmo tipo, sempre em posições equivalentes nos dois cromossomos.

5.7 – O mapeamento cromossômico com BACs em uma espécie cítrica está sendo reportado pela primeira vez neste trabalho, demonstrando que a FISH com BACs pode abrir caminhos para análises mais refinadas da evolução cromossômica dessas espécies, permitindo inferir sobre a conservação, sentença e colinearidade dos cromossomos ao longo da evolução do grupo.

6. RESUMO

A definição das espécies dentro dos gêneros pode ser problemática e as espécies de *Citrus* configuram um exemplo clássico de classificação conflitante. O presente estudo visou auxiliar na compreensão da sistemática deste grupo, ampliando a análise citogenética dos gêneros *Citrus* e *Poncirus*. Inicialmente foi analisada a variabilidade cariotípica dos pomelos (toranja × laranja-doce), indicando diferentes cariótipos entre as cultivares. Provavelmente, os diferentes cariótipos são resultantes de eventos de hibridação independentes, envolvendo diversos acessos de toranja. No entanto, as toranjas analisadas mostraram cariótipos idênticos e homozigotos, corroborando sua classificação como espécie pura. O segundo estudo dedicou-se à análise de 13 acessos de tangerinas. Em todos os acessos, o cromossomo D/5S-45S foi observado em homozigose e considerado um bom marcador para este grupo. A tangerina é classificada com uma das espécies puras, porém os dados obtidos sugerem que compreendam três espécies básicas: *C. sunki*, *C. reshni* e *C. deliciosa*, todas com cariótipos homomórficos, sendo que as duas primeiras foram idênticas. O terceiro trabalho visou refinar a análise cromossômica a partir da FISH de seqüências de cópia única. A espécie utilizada foi *P. trifoliata*, importante fonte de genes de resistência para *Citrus*. A análise da hibridização foi realizada comparativamente ao padrão de bandeamento CMA/DAPI e localização de sítio de DNAr 45S, permitindo reconhecer os nove pares cromossômicos, além de mapear a região de resistência ao VTC.

Palavras chaves: *Citrus*, *Poncirus*, CMA/DAPI, BAC, FISH

7. ABSTRACT

The species definition within a genus could be problematic and *Citrus* species are a good example of conflicting classifications. The present study aimed to help *Citrus* systematic understanding, improving the cytogenetic analysis of the genera *Citrus* and *Poncirus*. First, the grapefruit (pummelo × sweet orange) karyotype variability was analyzed, indicating different karyotypes among cultivars. Possibly, different karyotypes resulted from independent hybridization events, involving diverse pummelo accessions. However, the studied pummelos showed identical homozygote karyotypes, confirming its classification as a pure species. The second study was dedicated to analyse 13 mandarin accessions. In all accessions, the D/5S-45S chromosome was observed in homozigosity and, therefore, considered a good mandarin chromosome marker. The mandarin is classified as one of the three *Citrus* pure species; nevertheless, the obtained data suggest, that mandarin comprise three pure species: *C. sunki*, *C. reshni* and *C. deliciosa*, all of them with homomorphic karyotypes. The former two showed identical karyotypes. The third study proposed to refine the chromosomal analysis using FISH with single copy sequence as a probe. The analyzed species was *Poncirus trifoliata*, an important source of resistance genes to *Citrus*. The hybridization analysis was realized comparatively to CMA/DAPI banding pattern and DNAr 45S sites position, allowing recognizing the nine chromosome pairs, besides mapping the CTV region.

Key words: *Citrus*, *Poncirus*, CMA/DAPI, BAC, FISH

8 ANEXOS

8.1 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). 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.

How to Submit your Manuscript

There are no page charges or administration charges for papers published in Chromosome Research.

Submission by E-mail

Manuscripts may be submitted as e-mail attachments either as Word files for the text and compressed JPEG or TIFF files for the illustrations or as PDF files with the illustrations integrated into the text. Never send files larger than 0.5MB: they may not be accepted by the editors' and reviewers' Web servers or they may take a very long time to download.

Submission as hard copy

Manuscripts may also be submitted as hard copy, in which case 3 copies should be supplied. They may also be submitted on floppy disk or CD ROM (PC formatted please) accompanied by one hard copy.

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 (if no email address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by mail). Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours. Please do not make any changes to the PDF file. Minor corrections (+/- 10) should be sent by email; extensive corrections must be clearly marked on a printout of the PDF file and should be sent by fax. Details will be given in the instructions which accompany the proofs. Always quote the four-letter journal code (CHRO) and article number in correspondence.

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/

8.2 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Cytogenetic and Genome Research

Guidelines	for	Authors
www.karger.com/cgr_guidelines		
▼ Introduction		
▼ Categories of Manuscripts		
▼ Single Topic Issues		
▼ Submission		
▼ Arrangement		
▼ Literature Cited		
▼ Gene Symbols		
▼ Cell Lines in Cancer Research		
▼ <i>Author's Choice</i> [™]		
▼ Page Charges, Color Reproductions		
▼ Electronic Galley Proofs		
▼ Reprints		
▼ Requirements for Gene Mapping Reports		

Introduction

‘Cytogenetic and Genome Research’ publishes high quality original reports and reviews covering all aspects of chromosomes, genes and genomes in man, animals and plants.

Categories of Manuscripts for Conventional Issues

Original Articles are reports on

- Human, Animal and Plant Cytogenetics
- Cancer Cytogenetics
- Molecular Cytogenetics
- Gene Mapping, Cloning and Sequencing
- Gene Characterization
- Comparative Gene Mapping
- Somatic Cell Genetics
- Genes and Diseases
- Developmental Genetics
- Epigenetics.

Other categories closely related to the above topics could be considered by contacting the Editors.

Reviews covering a timely topic by experts in the field are either invited by the Editors or may be submitted for consideration.

Short Reports must present results of sufficient importance to justify accelerated acceptance. They should not be longer than 4 printed pages, including figures, tables and references.

Human Cytogenetics Case Reports are for de novo observations, particularly such which apply the use of HGMP (Human Genome Mapping Project) resources to the detailed characterization of chromosome rearrangements thereby further highlighting the nature of the abnormalities being described.

Cytogenetics of Rare or Endangered Species with straightforward karyotype descriptions of animals or plants should not be longer than 3 printed pages, including figures, tables and references.

Chromosome and Gene Workshops or Reports compile data that have been collected for single chromosomes, genes or genomes, hereditary diseases and gene-phenotype correlations in man, animals and plants. Illustrations and tables may be included.

Collaborative and Interactive Research Projects are contributions from investigators who are in need of research materials, or need the assistance of colleagues with specialized expertise, or who have data that is inadequate for a full report but which could be published when combined with data of others.

Commentaries are a forum for observations, opinions, and comments outside the realm of conventional scientific papers. Original data, illustrations and tables may be included.

Single Topic Issues

The journal has a tradition in publishing a series of themed issues. For these volumes we are soliciting the assistance of one or more expert investigators to act as Guest Editors in the area that is particularly interesting and/or one in which there is a need for a thorough overview. The Guest Editors invite top researchers to contribute original research reports or reviews of a topic that is in their main area of interest. These manuscripts are peer reviewed the same way as the papers received for the conventional issues. Proposals clearly outlining a theme and nominating potential Guest Editors are welcome.

Submission

Manuscripts should be submitted as pdf file attachments via e-mail to [**m.schmid@biozentrum.uni-wuerzburg.de**](mailto:m.schmid@biozentrum.uni-wuerzburg.de).

Authors should indicate which of the Executive or Associate Editors they feel would be most appropriate for their report.

All manuscripts are subject to editorial review. The editors reserve the right to improve style and, if necessary, return the manuscript for rewriting to the authors. The editorial office reserves rights to reject manuscripts based on priorities and space availability in the journal.

Arrangement

Manuscripts must be prepared strictly in accordance with the style of this journal.

Title page: The first page should give the full names of the authors and their affiliations, the full postal address, telephone and fax numbers, as well as the e-mail address of the corresponding author.

Abstracts should be provided for all Original Articles, Reviews, Human Cytogenetics Case Reports, and Cytogenetics of Rare or Endangered Species.

Figures: Digital illustrations should be sharp with good contrast and color rendition. Resolution for all graphics should be at least 300 dots per inch. We request that all illustrations be in a common format such as .jpg (.jpeg, .jpe), .tif (.tiff), .eps or .ppt.

Tables must be in Word format. Please use MS WORD Table > Insert > Table command from the menu bar to make tables.

Literature

Cited

References should be quoted in the text as follows:

Single author: Jones (1999)

Two authors: Jones and Smith (2000)

More than two authors: Jones et al. (2001)

The reference list should be arranged alphabetically according to the first author's surname. Titles should be given in full.

Papers published in electronic format should list authors, title and journal as above followed by the journal's URL, eg:

Chinnappan D, Zhang Y, Ravid K:

AIM-1 Transgenic mice with a curly tail phenotype and its chromosome location.

Cytogenet Genome Res 98:231A (2002)

<http://karger.com/doi/10.1159/000069799>

Book references must include the book title, editor(s), publisher, and city of publication. Recent issues of the journal should be carefully consulted for reference list style. Agreement between text citations and the reference list should be checked carefully, and the latter checked for accuracy. If many errors are found, the manuscript will be returned for corrections which may cause considerable publication delay.

Gene Symbols

Human gene symbols: Only official gene symbols of the International System for Gene Nomenclature (ISGN) are accepted. Authors must obtain or verify the official gene symbol of the gene(s) mapped and indicate that they have done so in the manuscript submitted. This can be accomplished for human genes by contacting

Dr. Sue Povey

HUGO Gene Nomenclature Committee

Department of Biology

University College London

Wolfson House

4 Stephenson Way

London NW1 2HE (UK)

Tel.: +44 20 7679 7410

Fax: +44 20 7387 3496

E-Mail nome@galton.ucl.ac.uk

website: www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/

Animal gene symbols: Authors submitting material on mouse and rat genetics should obtain correct genetic nomenclature before publication. Contact Dr. Lois Maltais

MGD Nomenclature Coordinator

The Jackson Laboratory

600 Main Street

Bar Harbour ME 04609 (USA)

Tel. +1 (207) 288 6429

Fax +1 (207) 288 6132

E-mail nomen@informatics.jax.org

MGD home page: www.informatics.jax.org

Guidelines set forth by the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice are available at www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/table.shtml
New symbols and names for genes can be requested electronically through the online symbol registry form at www.informatics.jax.org/mgihome/nomen

Gene mapping data for the mouse should also be submitted to the Mouse Genome Database (MGD) following the guidelines at www.informatics.jax.org/mgihome/submissions/submit.shtml.

The assigned MDG accession numbers should be included in the manuscript for publication. Assistance with submissions can be obtained by sending an e-mail to

submissions@informatics.jax.org.

Guidelines for the Use of Cell Lines in Cancer Research

Guidelines published by the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research may be downloaded from the NCRN website: <http://www.ncrn.org.uk/csg/publications.htm>.

*Author's Choice*TM

With this option the author can choose to make his article freely available online against a one-time fee of USD 2'500.00. This fee is independent of any standard charges for supplementary pages, color images etc. which may apply. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

Page Charges, Color Reproductions

The journal will defray the costs of the first eight printed pages (a total of about 8,000 words minus any tables or figures). Any additional pages will be defrayed on a cost-sharing basis by the authors at the rate of USD/CHF 290.00 per page.

There are no charges for illustrations and color reproductions.

Electronic Galley Proofs

Unless otherwise indicated, proofs are e-mailed to the corresponding author.

Reprints

Reprints are available against payment.

Order forms listing prices are provided with the galley proofs. If no reprints are desired this should be indicated on the form.

Orders submitted after the issue has gone to press are subject to considerably higher prices.

Requirements for Gene Mapping Reports

1. **The gene must not have been previously mapped by any technique.** Authors should check the above listed databases to determine if this is true. This means that mapping confirmations will not be accepted. Relocations of genes incorrectly mapped within a major chromosome band, i.e., to a different subband, will not be accepted. However, genes that are relocated a significant distance from the one to which it had been assigned, or to another chromosome, will be accepted. The evidence for the new assignment must be obtained with two different methods.

2. Well-described flanking markers must be given for all mapping assignments.

The relative location of the flanking markers can be established by standard radiation hybrid or mouse backcross panels. For mapping by fluorescence in situ hybridization (FISH), the markers must be within 5 cM or 5 Mb of the gene or genes that have been mapped.

3. The results from DNA sequence database searches must be given for the mapped gene(s).

The entire sequences should not be given, just the size, degree of the matches and their significance. If several sequences are involved, this should be presented in a concise table listing the standardized gene names as established by the HUGO Gene Nomenclature Committee (see above) and accession numbers of the matching sequences. The human chromosome reference sequences nucleotide position of mapped genes should also be given as they become available.

The following categories must be collected into a single publication if submitted from one group of investigators:

(a) All cDNAs representing a single multigene family

(b) Genes located within a single chromosome band

(c) A series of orthologous genes when the results of comparative mapping studies in the mouse (or some other species) and human genes are reported.

Authors of both accepted and not accepted papers are encouraged to submit their data to mapping databases. The mirror sites of the Genome Database (www.gdb.org) are prepared to accept the data if presented in the short report format.

8.3 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Genetics

Preparation of Research Articles

Manuscripts must be

- * written in English with American spelling and correct grammar and punctuation
- * in double-spaced, 12-point type throughout, including the Literature Cited section, appendices, tables, and legends
- * marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

Do not number lines in the margins.

Start each of the following numbered elements on a new page

1. The title page must contain

- * a concise and informative title that includes the organism under study
- * the authors' names
- * the authors' institutional affiliations, including department; institution; and city, state or province, country if outside the United States, and postal code. Do not include districts or street addresses.

Indicate different affiliations with the superscript symbols *, dagger, double dagger, §, **, dagger dagger, double dagger double dagger, §§

Indicate an author's present address with a numbered footnote.

Indicate a dedicatory footnote (if desired) with boldfaced type.

List sequence accession numbers in an unnumbered footnote on page 1 using the following wording:

Sequence data from this article have been deposited with the EMBL/GenBank Data Libraries under accession nos. XXXXXX-XXXXXX.

A paper otherwise found acceptable will not be published until accession numbers are provided.

See the section below, Sequences, for more information on obtaining accession numbers.

2. Page 2 must contain

- * a short running head of about 35 characters, including spaces,
- * up to five key words or phrases, and
- * the corresponding author's name, mailing address including street name and number, phone and fax numbers, and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, ordering offprints, and arranging for the payment of page and author alteration charges.

3. The Abstract must be a single paragraph that

- * does not exceed 200 words and
- * does not contain references.

4. The text must be as succinct as possible. Present and discuss results just once, not in both the Results and Discussion sections. Discuss a possible explanation only if the results presented

make a difference by allowing a resolution or posing a conundrum or paradox; ideas should not be discussed solely for the sake of completeness.

Manuscripts should conform to the style in recent issues of GENETICS, with particular attention to genetic symbols, in-text references, and the Literature Cited section. Differentiate between letters and numbers where they might be easily misrepresented, as with the typed letter l and the number 1 or the letter O and the number 0, by making penciled notations in the margins.

Text citations: In citations with two authors, include both names. In citations with three or more authors, name the first author and use "et al." Cite only articles that are published or in press. When citing personal communications or unpublished results, list all contributors by initials and last name; do not use "et al."

Numbers: In the text, write out numbers nine or less except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numbers for those larger than nine, except as the first word of a sentence; however, try to avoid starting a sentence with such a number.

Abbreviations: : Use abbreviations of the customary units of measurement only when they are preceded by a number: "3 min" but "several minutes." Write "percent" as one word, except when used with a number: "several percent" but "75%." To indicate temperature in centigrade, use ° (for example, 37°); include a letter after the degree symbol only when some other scale is intended (for example, 45°K).

Binomial names: Italicize names of organisms only when the species is indicated: *Neurospora*, but *Neurospora crassa* or *N. crassa*. Italicize the first three letters of the names of restriction sites, as in *HindIII*. Write the names of strains in roman except when incorporating specific genotypic designations.

Genotypes: Italicize genotype names and symbols, including all components of alleles, but not "+" indicating wild type and not when the name of a gene is the same as the name of an enzyme.

Carefully distinguish between genotype and phenotype in both the writing and the symbolism.

Headings: To divide text into sections, use only these levels of headings:

- * Level 1: Centered, all capital letters

Example:

DISCUSSION

Use this level only for major sections of text, such as Materials and Methods and the Discussion.

- * Level 2: Freestanding flush-left boldface

Example:

Background and Analysis

Use this level only to group two or more closely related level 3 headings in long articles.

- * Level 3: Paragraph-initiating boldface, followed by a colon

Example:

Text: Manuscripts must be as succinct as....

This is the most frequently used subheading.

- * Level 4: Paragraph-initiating italic

Example:

Binomial names: Italicize names of organisms...

Only level 4 headings may be numbered, but only when the numbers must be cited in the text.

5. The acknowledgments(optional) must be a single paragraph that

- * immediately follows the discussion
- * includes all references to grant support and institutional publication codes
- * includes the full names (not abbreviations) of all granting agencies (example: National Institutes of Health).

6. The Literature Cited section lists only articles that are published or in press.

- * Format citations as in a recent issue of GENETICS; cite parenthetical references in text chronologically
- * Insert a space between an author's initials.
- * Order citations alphabetically by first author.
- * For multiple citations with the same first author, first list single-author entries by year using 1996a, 1996b, etc., as needed. Then list two-author entries alphabetically by second author. Finally, list entries by three or more authors (cited in the text as "FIRST et al. 1996") only by year and without regard to number of authors or alphabetical rank of authors beyond the first.
- * For articles with more than five authors, list the first five names and then "et al."

Sample journal article citation:

Bridges, C. B., and E. G. Anderson, 1925 Crossing over in the X chromosomes of triploid females of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 10: 418–441.

(Note spaces between authors' initials and after the boldface colon.)

Sample book citation:

Sturtevant, A. H., and G. W. Beadle, 1939 *An Introduction to Genetics*. W. B. Saunders, Philadelphia.

Sample chapter-in-book citation:

Beadle, G. W., 1957 The role of the nucleus in heredity, pp. 3–22 in *The Chemical Basis of Heredity*, edited by W. D. McElroy and B. Glass. Johns Hopkins Press, Baltimore.

7. Appendices should be reserved for large bodies of data or arcane mathematical derivations that would disrupt the main text. Do not use appendices for briefer items requiring, for example, fewer than two typed pages.

8. The tables must each start on a new page.

- * Give each a concise title.
 - * Double space all parts.
 - * Number each consecutively using Arabic numerals. Do not number consecutive tables 1A, 1B, etc., although interior parts of a table can be labeled A, B, etc., if necessary for easy reference in the text (but avoid this whenever possible).
 - * Define the boxhead and the bottom of the table with horizontal rules. Use shorter horizontal rules within the boxhead to indicate unambiguously which subheadings are subordinate to a higher-level heading. Use no vertical or diagonal rules. Use no horizontal rules between the boxhead and the closing rule. Give each column a title in the boxhead. Except in unusual circumstances, each boxhead entry should refer to material beneath it and not to material to the right.
 - * A table legend, if any, should precede footnotes. This legend should be separate from the table title.
 - * Indicate footnotes, typed directly below the table, with lowercase, superscript italic letters. Use *, **, and *** to indicate conventional levels of statistical significance, explained below the table.
 - * Do not include shading, color type, line drawings, graphics, or other illustrations within tables. Instead, prepare a separate, numbered figure to accompany the table.
 - * Table files must be Word documents and not in Picture Format.
9. The figure legends must each begin with a brief title leading into text. All conventional symbols used to indicate figure data points are available for typesetting; unconventional symbols should not be used.
10. The figures must be numbered consecutively using Arabic numerals.
- * Size and proportion each to be reproduced or reduced to 3.25 or 7 inches wide.
 - * Do not number consecutive figures 1A, 1B, etc. Parts of a figure can be labeled A, B, etc., if necessary for easy reference in the text.
 - * If a figure is submitted in unattached parts, include a diagram of how these should be arranged in the printed version.
 - * Indicate important aspects of photographs with arrows or numbers.
 - * Halftones should be high-contrast, glossy prints with sharp detail, because some loss of detail and contrast is inevitable in the printing process. Good contrast is particularly important for chromatographs, such as gel separations.
 - * Make the size and proportion of each group of figures suitable for reproduction at, or reduction to, 3¼ or 7 inches wide.

* Drawings, graphs, mating-type charts, complex chemical formulas, and other sketches should be treated as numbered figures.

* Histograms should not be used to present data that can be captured easily in text or small tables, as they take up much more space

* When using symbols that are normally italicized, such as genotypes, use italic rather than underlined Roman characters.

* Italicize all mathematical variables.

* Do not use boldface labels.

* Be sure to distinguish between similar characters, such as the letter l and the number 1 or the letter O and the number 0.

* Be sure that the axes of graphs are exactly perpendicular and that all lines are of equal density.

* The size of numbers and letters in a figure should be suitable for reduction to no greater than 10 points and no less than 6 points. Use similar size lettering throughout a figure and in similar figures.

* Some figures, like genetic maps based on DNA polymorphisms, summarize large data sets of interest to other investigators. The data sets supporting such figures should be placed on the journal's web site (<http://www.genetics.org>) so that future researchers can build upon these studies.

11. Sequences may appear in text or in figures.

* For regions that have never been sequenced, DNA must be sequenced on both strands.

* New nucleotide data must be submitted and deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission into any one of the three collaborating databanks ensures data entry in all. Sequence data may be submitted on the World Wide Web:

DDBJ via SAKURA at <http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>

EMBL via WEBIN at <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html>

GenBank via BankIt at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>

Or via Sequin at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>

* DNA, RNA, or protein sequences corresponding to equal or greater than 50 nucleotides must be entered into an appropriate data bank and the accession number must be provided before an article will be published. If a proof is found to lack an accession number, the article will be held back from publication until the number is provided.

* Long sequences, such as those requiring more than about two pages to reproduce, will not be published unless the reviewers and the Associate Editor agree that publication is necessary. An

author wishing to include a long sequence not recommended for publication must agree to pay increased (unsubsidized) page charges for the extra pages.

* Complete mtDNA sequences will no longer be published in GENETICS. Relevant comparisons will be published if an accession number for the sequence in question is supplied.

* Authors must indicate that an unpublished sequence will be made available on disk or as hard copy to anyone requesting it.