

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“VARIABILIDADE CROMOSSÔMICA E RELAÇÃO  
ENTRE ESPÉCIES E CULTIVARES DE *Citrus* L.”**

REGINALDO DE CARVALHO

**Recife**

**Fevereiro 2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“VARIABILIDADE CROMOSSÔMICA E RELAÇÃO  
ENTRE ESPÉCIES E CULTIVARES DE *Citrus* L.”**

Tese apresentada por Reginaldo de Carvalho ao curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Guerra  
(Depto. Botânica, UFPE)

**Recife**

**Fevereiro 2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“VARIABILIDADE CROMOSSÔMICA E RELAÇÃO  
ENTRE ESPÉCIES E CULTIVARES DE *Citrus*”**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**MEMBROS TITULARES:**

---

Prof. Dr. Marcelo Guerra (orientador), Depto. de Botânica, CCB, UFPE

---

Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon, Depto. de Genética, CCB, UFPE

---

Profa. Dra. Andrea de Carvalho Pedrosa, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

---

Prof. Dr. Leonardo Pessoa Félix, Depto. de Fitotecnia, CCA, UFPB

---

Dr. Walter dos Santos Soares Filho, Embrapa Mandioca e Fruticultura

**MEMBROS SUPLENTE:**

---

Profa. Dra. Maria José de Souza Lopes, Depto. de Genética, CCB UFPE

---

Dr. Nataniel Franklin de Melo, Embrapa Semi-Árido

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos e à minha  
noiva Sheyla Ribeiro

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio recebido durante este trabalho;

À coordenadora do Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Profa. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Celho, pelo apoio prestado;

Ao grande pesquisador e Prof. Marcelo Guerra, pela orientação, confiança, incentivo e profissionalismo durante a realização de todas as etapas desse trabalho;

Ao pesquisador da Embrapa-Mandioca e Fruticultura, Dr. Walter dos Santos Soares Filho, pelo total apoio, cordialidade, colaboração e amizade e pela liberação do material botânico do Banco ativo de Germoplasmas de Citros utilizado neste trabalho;

Aos Pesquisadores do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Dr. Osvaldo Pompílio Neto, Constância Ayres e Wagner Alexandre, pela concessão de uso do laboratório de Microbiologia e Entomologia e pelos esclarecimentos dispensados nas preparações moleculares;

Ao Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho da Embrapa Meio-Norte, por ter me conduzido de forma brilhante na área da pesquisa e pela amizade e orientação dispensada até hoje;

Às funcionárias do Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da UFPE, Adenilda, Liane e Jaci, pelo grande apoio prestado;

Aos meus amigos da Embrapa Meio-Norte, Aécio, Ângela, Carlota, Maurisrael e Virgínia, Rosa Lúcia, Manoel, Agripino, Duarte, Marcos Jacob, João da Cruz, pelo agradável convívio e amizade que perduram até hoje;

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Citogenética Vegetal da UFPE, Adriana Buarque, Ana Emília, Ana Christina, André Ferraz, André Laforga, Andrea Pedrosa, Aguaracy Figuerôa, Gianna Carvalheira, Juliano Cabral, Jaílson Gitaí, Ivan Souza, Leonardo Félix, Loiva Karnopp, Luzia Bonfim, Maria Betânea, Maria Cristina, Maria José, Nataniel Franklin de Melo, Paulo Petrônio, Silvia Pitrez e Cheila Sbalcheiro, pelo ótimo convívio e apoio durante todos os momentos que passei no laboratório.

Aos Amigos da Embrapa-Mandioca e Fruticultura, Janay, Getúlio, Dr. Antônio, Dr. Orlando, Kilder, Fiúza, Tânia, Onorato, Ocimar, Chico.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho,

Muito obrigado.

**SUMÁRIO**

Pág.

**AGRADECIMENTOS****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****RESUMO****ABSTRACT****1. INTRODUÇÃO** 15**2. REVISÃO DA LITERATURA** 18**3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 39**4. CAPÍTULO 1 – Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species.** 48**Abstract** 50**Introduction** 51**Material and methods** 53**Results** 54

Chromosome types 54

Chromosomal heterozigosity 56

CMA banding pattern of each accession 57

**Discussion** 59

Chromosome banding variability among mandarins 60

Karyotype similarity in accessions with low heterozigosity 61

High heterozygosity in accessions of hybrid origin 62

The putative ancestral karyotype of mandarins 64

<b>Acknowledgements</b>	65
<b>References</b>	65
<b>5. CAPÍTULO 2 - Evidências citológicas da origem híbrida das limas e limões diplóides e suas relações com cidras e pomelos</b>	76
<b>Resumo</b>	77
<b>Introdução</b>	78
<b>Materiais e Métodos</b>	81
<b>Resultados</b>	83
Características gerais das bandas CMA <sup>+</sup> e sítios ribossomais	83
Caracterização cariotípica dos acessos	85
<b>Discussão</b>	86
Características estruturais dos cariótipos do grupo	86
O cariótipo dos limões	89
O cariótipo de <i>Citrus grandis</i> e seus híbridos	91
O cariótipo de <i>C. medica</i> e das limas	92
<b>Agradecimentos</b>	93
<b>Referências</b>	94
<b>6. CAPÍTULO 3 - Padrão de bandas CMA e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S na lima ácida ‘Tahiti’ uma seleção derivada por semente</b>	103
<b>Resumo</b>	104
<b>Introdução</b>	105
<b>Material e Métodos</b>	107
<b>Resultados</b>	109



<b>Discussão</b>	111
Origem da lima ácida ‘Tahiti’	111
A origem da seleção ‘Tahiti-CNPMF 2000’	113
<b>Agradecimentos</b>	114
<b>Referências</b>	115
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS</b>	122
<b>8. ANEXOS</b>	124

## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo 1</b>	Pág.
Figura 1	72
Chromosome types found in <i>Citrus</i> species, according to the position of CMA <sup>+</sup> bands.	
Figura 2	73
Chromosome complements of mandarin and hybrid cultivars stained with CMA ( <b>a, c-e, g-j, l, m e o</b> ); DAPI ( <b>b, f, n</b> ) and Giemsa ( <b>k</b> ). <b>a</b> and <b>b</b> ‘Sunki’; <b>c</b> ‘Cleopatra’; <b>d</b> ‘Montenegrina’; <b>e</b> and <b>f</b> ‘Comum’; <b>g</b> ‘Cravo’; <b>h</b> ‘Dancy’; <b>i</b> ‘Oneco’; <b>j</b> and <b>k</b> ‘Clementina’; <b>l</b> ‘Batangas’; <b>m</b> and <b>n</b> ‘Shiikuwashá’; <b>o</b> ‘Ponkan’. Arrows point large CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup> bands <b>d, m</b> and <b>n</b> or satellites <b>e, g, h, k</b> and <b>o</b> . Arrowheads in <b>m</b> and <b>n</b> point CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup> interstitial regions in E chromosomes. Chromosome types A, B, and C are indicated by letters. F <sub>L</sub> type chromosomes are marked by asterisks. The bar in <b>o</b> corresponds to 5 μm.	
Figura 3	74
Chromosome complements of some mandarins and related species stained with CMA ( <b>a, c-g</b> and <b>i</b> ) and DAPI ( <b>b</b> and <b>h</b> ). <b>a</b> and <b>b</b> ‘Orlando’; <b>c</b> ‘Page’; <b>d</b> ‘Murcott’; <b>e</b> and <b>f</b> ‘King’; <b>g</b> and <b>h</b> <i>C. aurantium</i> ; <b>i</b> <i>C. sinensis</i> ‘Pêra Vacinada’. Arrow and dots in <b>e</b> show one satellite and two secondary constrictions, respectively. Arrows in <b>b</b> and <b>h</b> indicate DAPI <sup>-</sup> proximal bands. Chromosome types A, B, and C are indicated by letters. F <sub>L</sub> type chromosomes are marked by asterisks. The bar in <b>i</b> corresponds to 5 μm	
Figura 4	
Idiograms with banding patterns of all accessions analysed. The mandarins and hybrids were grouped according to their banding patterns. Group I: <b>a</b> ‘Sunki’ and <b>b</b> ‘Cleopatra’. Group II: <b>c</b> ‘Montenegrina’; ‘do Rio’ and ‘Cravo’; <b>d</b> ‘Comum’ and <b>e</b> ‘Dancy’. Group III: <b>f</b> ‘Clementine de Nules’; <b>g</b> ‘Oneco’; <b>h</b> ‘Batangas’; <b>i</b>	

‘Shiikuwashá’; **j** ‘Ponkan’; **k** ‘Orlando’ and **l** ‘Page’. Group IV: **m** ‘Murcott’ and **n** ‘King’. **o** *C. aurantium* and **p** *C. sinensis* cv. Pêra Vacinada. Homomorphic homologous chromosomes are represented by a single chromosome, heteromorphic homologous chromosomes are represented as a pair.

75

## Capítulo 2

Pág.

- Figura 1 Tipos cromossômicos encontrados nos acessos do grupo lima-limão-cidra-pomelo de acordo com a localização das bandas CMA<sup>+</sup>. 99
- Figura 2 Idiograma representando o padrão de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, fórmula cariotípica e a localização dos sítios de DNAr 5S (◀, em um dos homólogos e ▶ ◀, em ambos homólogos) e 45S (●). **a** *C. jambhiri*, **b** *C. limonia*, **c** *C. volkameriana*, **d** *C. limon*, **e** *C. aurantifolia*, **f** *C. limettioides*, **g** *C. medica*, **h** *C. grandis*, **i** *C. paradisi*, **j** ‘Ponderosa’. Os cromossomos foram organizados do tipo A ao F, do maior para o menor. O cromossomo G foi agrupado com um dos F. No caso de heteromorfismo, os cromossomos foram representados aos pares, e nos homomórficos apenas um. 100
- Figura 3 Complementos cromossômicos do grupo lima-limão-cidra-pomelo corados com CMA (**a, c, e, g, h, j, k, l, n e p**) e DAPI (**b, d, f, i, m e o**). (**a-b**) *Citrus jambhiri*, (**c-d**) *C. limonia*, (**e-f**) *C. volkameriana*, (**g**) *C. limon*, (**h-i**) *C. aurantifolia*, (**j**) *C. limettioides*, (**k**) *C. medica*, (**l-m**) *C. grandis*, (**n-o**) *C. paradisi* e (**p**) ‘Ponderosa’. Asteriscos indicam cromossomos do tipo F<sub>L</sub>. Setas apontam bandas subterminais. Os tipos cromossômicos são indicados por letras. Barra corresponde a 5 μm. 101
- Figura 4 Complementos cromossômicos dos acessos do grupo lima-limão-cidra-pomelo corados com CMA (**a, c, e, g, i, k e m**) e hibridizados com sonda de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho) (**b, d, f, h, j, l, n-p**). (**a-b**) *Citrus jambhiri*, (**c-d**) *C.*

*limonia*, (**e-f**) *C. volkameriana*, (**g-h**) *C. limon*, (**i-j**) *C. aurantifolia*, (**k-l**) *C. limettioides*, (**m-n**) *C. medica*, (**o**) *C. paradisi* e (**p**) ‘Ponderosa’. Setas apontam sítios pequenos de DNAr 45S em **b** e **f**. Cabeças de seta mostram regiões de DNAr 5S em cromossomos D/5S e D/5S-45S. Barra corresponde a 5µm.

102

### Capítulo 3

Pág.

- Figura 1 Representação diagramática da distribuição das bandas CMA<sup>+</sup>, fórmula cariotípica e dos sítios de DNAr 5S (▶) e 45S (●) nas seleções investigadas de lima ácida ‘Tahiti’ (120  
(*C. latifolia* Tan.).
- Figura 2 Complementos cromossômicos dos acessos Tahiti ‘IAC 05’ (**b, d-f**) e ‘Tahiti  
CNPMF 2000’ (*C. latifolia* Tan.) (**a, g-i**). (**a, b, e, e h**) corados com CMA, (**d e g**)  
com DAPI e (**f e i**) hibridizados com sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho).  
A figura (**c**) mostra uma célula meiótica em metáfase-anáfase I irregular de ‘Tahiti  
CNPMF 2000’, corada com Giemsa. Cabeças de seta apontam os sítios de DNAr 5S.  
Tipos cromossômicos mais característicos são representados por letras. Barra  
corresponde a 5 µm. 121

## LISTA DE TABELAS

<b>Capítulo 1</b>	Pág.
Tabela 1	<b>Table 1.</b> List of accessions analysed of mandarins, mandarin hybrids and related species. Species names according to Tanaka (1969). 70

## RESUMO

Foi realizada a análise citogenética em 32 acessos diplóides, com  $2n = 18$ , e dois triplóides, com  $2n = 27$ , de citros através da coloração CMA/DAPI. Adicionalmente, foi realizada a hibridização *in situ* em cultivares de lima, limão, cidra e pomelo. A maioria dos cromossomos apresentou regiões heterocromáticas principalmente nos telômeros dos braços longos. Dois tipos cromossômicos novos foram encontrados em *Citrus depressa* (tipo E) e em *C. aurantifolia* (tipo G). As tangerinas apresentaram alta variabilidade no padrão de bandas e foram divididas em quatro grupos distintos de acordo com os tipos cromossômicos encontrados. Apenas as tangerinas do grupo I e algumas do grupo II foram homozigotas para todos os pares cromossômicos, sendo indicadas como prováveis espécies básicas do gênero. As quatro cultivares de *C. limon* e duas de *C. paradisi* analisadas apresentaram a mesma fórmula cariotípica, sugerindo diversificação por mutações somáticas espontâneas. Similarmente, os limões ‘Cravo’ (*C. limonia*), ‘Rugoso’ (*C. jambhiri*) e ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana*) mostraram cariótipo muito similar, diferindo dos limões verdadeiros (*C. limon*) pela presença de um cromossomo C neste último. A cultivar limão Ponderosa mostrou-se relacionada ao grupo pomelo-toranja e não ao grupo dos limão-lima. Dentro desses grupos, *C. medica* e *C. grandis* foram as únicas espécies homozigotas, reforçando a hipótese de que representam duas das três espécies básicas de *Citrus*. A origem mais provável para a lima ácida ‘Tahiti’ seria pela fecundação de um gameta diplóide de *C. aurantifolia* por um gameta haplóide de *C. limon*. As duas seleções estudadas dessa lima ácida divergiram principalmente pela localização dos sítios de DNAr 5S e 45S. A análise das anteras mostrou total esterilidade masculina na seleção ‘Tahiti IAC 05’, enquanto em ‘Tahiti CNPMF 2000’ a meiose é irregular.

## ABSTRACT

Thirty two diploid ( $2n = 18$ ) and two triploid ( $2n = 27$ ) citrus accessions were characterised by CMA/DAPI staining. In addition, *in situ* hybridization was used to localise the rDNA genes in cultivars of lime, lemon, citron and grapefruit. Heterochromatic blocks were terminally located in the long arm of most chromosomes. Beside the five chromosome types described previously, two new chromosome types were included. Mandarin cultivars showed a high variability in their banding patterns and have been divided into four groups, according to the chromosome types observed. Only group I and few accessions of group II were homozygous for all chromosome pairs in mandarins, and these species have been considered probable basic species in the genus. Four cultivars of *Citrus limon* and two of *C. paradisi*, presented the same karyotype formula, suggesting that they have differentiated by spontaneous somatic mutations. ‘Rangpur lime’ (*C. limonia*), ‘Rough lemon’ (*C. jambhiri*) and ‘Volkamer lemon’ (*C. volkameriana*) also showed similar karyotypes, which were slightly different from the true lemons (*C. limon*). ‘Ponderosa’ lemon appeared to be related to the grapefruit-pummelo group instead of the lemon-lime group. Within these groups, *Citrus medica* and *C. grandis* were the only homozygous species, reinforcing the hypothesis that these two species belong to the group of the three basic citrus species. The ‘Tahiti’ lime was probably originated by the fertilisation of a diploid *C. aurantifolia* and a haploid *C. limon* gamete. Two selections of this lime were different regarding the position of the 5S and the 45S rDNA sites. Another analysis revealed that ‘Tahiti IAC 05’ is sterile, while meiosis in ‘Tahiti CNPMF 2000’ is irregular.

## **1. Introdução**

---

---



## 1. Introdução

O gênero *Citrus* L. está representado por diversas espécies de importância econômica como as laranjas doces [*C. sinensis* (L.) Osb.], os limões (diversas espécies) e as tangerinas (diversas espécies), sendo um dos gêneros de plantas mais cultivado do mundo. Muitas cultivares de citros, entretanto, possuem características de híbridos, que dificultam sua classificação taxonômica. Os dois sistemas de classificação mais utilizados são o de Swingle (1967) com 16 espécies reconhecidas e o de Tanaka (1977), com 162 espécies. Outros autores, com base em caracteres morfológicos, bioquímicos e moleculares, reconhecem apenas três espécies básicas para o gênero: cidra ou *C. medica* L., tangerina ou *C. reticulata* Blanco e toranja ou *C. grandis* Osbeck.

As demais cultivares são consideradas de origem híbrida (Scora 1975; Barrett e Rhodes 1976; Moore 2001). Essa divergência nos sistemas de classificação se deve, principalmente, à poliembrionia nucelar, que forma embriões de origem assexual geneticamente idênticos à planta-mãe, à facilidade na produção de híbridos interespecíficos e intergenéricos férteis, ou parcialmente férteis, e ao surgimento de novas cultivares através de mutações somáticas espontâneas, mantidas por enxertia.

O estudo de diversas isoenzimas, em *Citrus* e gêneros próximos (Asíns *et al.* 1998), revelou duas linhas evolutivas entre os citros de importância econômica, uma constituída pelas laranjas e tangerinas e outra formada pelas limas [doces (*C. limettioides* Tan.) e doces (*C. aurantifolia* Christm.), limões, cidras (*C. medica* L.) e pomelos (*C. paradisi* Macf).

O gênero é constituído basicamente por espécies diplóides, havendo uns raros poliplóides, como a lima ácida 'Tahiti' (*C. latifolia* Tan.), de constituição triplóide e origem desconhecida. As espécies de *Citrus* apresentam número cromossômico estável, com  $2n=18$ , cromossomos pequenos e de morfologia muito semelhante, havendo poucos marcadores

citológicos que podem ser evidenciados por técnicas convencionais (Guerra *et al.* 1997). A técnica de bandeamento cromossômico com os corantes fluorescentes cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) parece ser a mais informativa em *Citrus*, revelando alta variabilidade e heterozigosidade de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Com isso foi possível reconhecer cinco tipos cromossômicos diferentes, caracterizados pelo número e posição das bandas. Combinações diferentes desses tipos cromossômicos permitem caracterizar a maioria dos acessos de *Citrus* estudados e, em alguns casos, permitem avaliar a origem dos híbridos (Guerra 1993). Esta técnica tem sido complementada com a técnica de hibridização *in situ* de genes ribossomais 5S e 45S (Matsuyama *et al.* 1996; Roose *et al.* 1998; Pedrosa *et al.* 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as relações entre acessos diplóides pertencentes aos grupos laranja-tangerina e lima-limão-cidra-pomelo, principalmente, através do padrão de bandas CMA/DAPI, procurando identificar marcadores cromossômicos nesses acessos. Além dos diplóides, duas seleções triplóides de lima ácida 'Tahiti' também foram investigadas. Adicionalmente, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi utilizada no grupo de lima-limão-cidra-pomelo, incluindo a lima ácida 'Tahiti'. Os resultados da análise citológica foram comparados com os dados da literatura, relacionados à diversidade morfológica, bioquímica e molecular, procurando compreender a origem desses acessos e a diversidade do gênero.

## **2. Revisão da Literatura**

---

---

## 2.1 – O gênero *Citrus*

### 2.1.1 – Origem e distribuição geográfica

O gênero *Citrus* encontra-se no patamar mais elevado de um longo período evolutivo, cujo início remonta a mais de 20 milhões de anos, na Austrália, quando esta ainda tinha conexões com a Ásia e Nova Guiné, antes da separação das placas continentais (Swingle, 1967). Sua origem, entretanto, é atribuída ao sudeste da Ásia, particularmente ao leste da Índia, norte de Myanmar, antiga Birmânia, e sudeste da China, apresentando relações filogenéticas que se estendem pelas Índias Orientais, Austrália, Centro da China, Japão e mesmo África (Soost e Cameron 1975; Soost e Roose 1996). Somente os *grapefruits* ou pomelos originaram-se mais recentemente no Novo Mundo (Cameron e Soost 1986; Moore 2001).

Relatos da influência dos citros, especialmente das cidras, na cultura chinesa e indiana datam de aproximadamente 800 a.C. As cidras foram descritas na Pérsia pelos Macedônios como ‘a maçã das ilhas Medes’ e, por apresentar odor agradável, boa aparência e resistência no período pós-colheita (ideal para viagens prolongadas), tornaram-se as precursoras dos citros no ocidente. Por volta de 1.150 d.C. houve um avanço considerável na citricultura ocidental com a introdução de várias espécies de *Citrus*, como laranjas azeda (*C. aurantium* L.) e doce e dos limões, na Europa e na África (Scora 1975). A partir do bloqueio do mar Mediterrâneo pelos turcos no século XVI, os portugueses iniciaram expedições à Índia, de onde trouxeram principalmente a laranja doce. A partir daí, os citros tornaram-se um importante produto comercial na Europa. A tangerina, embora já cultivada na China e no Japão ainda na antiguidade, só foi introduzida na Europa em 1805, primeiramente na Inglaterra e depois em toda região do Mediterrâneo.

A transferência das espécies para o continente americano ocorreu durante as grandes navegações exploradoras, principalmente por portugueses, os quais retornavam da Ásia com sementes ou partes de plantas para propagação (Scora 1975; Moore 2001). No Brasil, os citros foram provavelmente introduzidos pelas primeiras expedições colonizadoras em meados do século XVI, com plantações estendendo-se de norte a sul do país (Moreira e Moreira 1991). O cultivo na América e na Europa permitiu que os citros se adaptassem a diferentes condições climáticas. Atualmente os citros são cultivados principalmente nas regiões tropicais e subtropicais a 35° de latitude norte e sul do equador (Cameron e Soost 1986).

#### 2.1.2 – Importância econômica

Os citros estão representados por diversas espécies de importância econômica, sendo as mais conhecidas as laranjas doces, os limões, as tangerinas e os pomelos. Seus frutos podem ser consumidos *in natura* ou como produtos industrializados.

A citricultura brasileira é considerada atualmente uma das mais competitivas atividades agroindustriais do país. O Brasil é o maior produtor mundial de citros e exporta mais da metade (1.146,9 mil toneladas) do volume mundial de suco concentrado de laranja. O principal fator de crescimento da produção brasileira de citros foi o aumento das áreas de cultivo, uma vez que a produtividade brasileira é considerada baixa, estando em torno de duas caixas/planta/ano. Os Estados Unidos da América do Norte representam o segundo maior país produtor, com concentração na Flórida onde a produtividade média alcança seis caixas/planta/ano.

A maior área produtora do Brasil é a região Sudeste, sendo o Estado de São Paulo responsável por 95% das exportações do país. O faturamento com exportação de suco concentrado e subprodutos é de cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais (Fundecitrus 2002).

Os avanços da citricultura brasileira sempre estiveram voltados ao incremento da produção do suco concentrado de laranja. Com isso, apenas nas últimas décadas as tangerinas e os limões têm sido direcionados ao mercado externo, embora de forma ainda lenta. As principais cultivares do tipo tangerina produzidas no Brasil são ‘Ponkan’ (*C. reticulata*), ‘Tangor Murcott’ [suposto híbrido natural de tangerina (*C. reticulata*) com laranja doce] e mexericas (*C. deliciosa* Tan.). A área plantada em 1995 foi de 50.000 ha, com uma produção de 693 mil toneladas e um rendimento médio de 13,308 kg/ha. Novamente, o Estado de São Paulo destaca-se como o principal pólo produtor, concentrando 30.000 ha de área plantada e um rendimento médio de 17,419 kg/ha. O Rio Grande do Sul e o Paraná aparecem como segundo e terceiro maiores produtores, respectivamente. O volume de exportações de tangerina é considerado muito pequeno, sendo que o maior valor negociado, US\$ 4,6 milhões (9,3 mil toneladas), em 1997, decaiu nos anos seguintes. Nos últimos anos, vários programas de melhoramento genético vêm sendo desenvolvidos no sentido de melhorar as variedades comuns e/ou introduzir novas variedades com características favoráveis à comercialização, como frutos com poucas sementes e casca menos solta, o que ocasionaria melhor aceitação no mercado europeu e mais fácil manuseio no armazenamento dos frutos, respectivamente (Machado 2001).

Os principais limões produzidos no Brasil são a lima ácida ‘Tahiti’ e, em menor escala, os limões ‘Siciliano’ [*C. limon* (L.) Burm. f.], ‘Galego’ (*C. aurantifolia* Swing.) e ‘Cravo’ (*C. limonia* Osb.). Em decorrência da suscetibilidade ao cancro cítrico, esses limões, exceto o limão Tahiti, tiveram sua área de plantio reduzida desde a década de 60. Segundo a FAO (2002), de 1995 a 2000 o Brasil reduziu sua produção de limões em 29%, colhendo no

ano de 2000 uma safra de 520 mil toneladas numa área de 46 mil hectares. O Brasil ocupa o quinto lugar entre os principais produtores mundiais de limas e limões, contribuindo com 8,8% da produção mundial. O México é o maior produtor com 12,7% do total e uma produção de 1,3 milhão de toneladas em 2000 (FAO 2002). A região Sudeste do Brasil é líder absoluta na produção de limão, produzindo 87,6% do total de 7.875 mil frutos colhidos em 1999. O Estado de São Paulo é o maior produtor (81,3%), seguido pelo Rio de Janeiro (3,9%), Bahia (2,7%) e Rio Grande do Sul (2,6%). A principal cultivar é o clone nucelar limão ‘Tahiti IAC 5’, propagada sobre o porta-enxerto limão ‘Cravo’ (FAO 2002).

No Nordeste, o vale do rio São Francisco é a principal região produtora de citros, destacando-se o limão ‘Tahiti’. As condições climáticas dessa região são favoráveis à prática da indução floral através do estresse hídrico, tornando possível aumentar a produção mesmo na época da entressafra e durante o ano todo. Os frutos cítricos dessa região são considerados de boa qualidade, apresentando grande quantidade de suco, casca fina, além de estarem livres das doenças típicas de regiões frias (Sobrinho 1980; Coelho e Mascarenhas 1990).

### 2.1.3 – Taxonomia

O gênero *Citrus* L. à divisão Magnoliophyta, subdivisão Magnoliophytina, classe Magnoliopsida, subclase Rosidae, ordem Sapindales (Cronquist 1988), subordem Geraninae, família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Citrineae, sendo estreitamente relacionado aos demais gêneros de sua tribo, a saber: *Severinia* Ten., *Pteiospermium* (Engl.) Swing., *Burkillantnus* Swing., *Limnocitrus* Swing. e *Hesperethusa* Ruem, que são mais primitivos; *Citropsis* (Engl.) Swing., *Atalantia* Corrêa, mais evoluídos que os anteriores; *Poncitrus* Raf., *Fortunella* Swing., *Microcitrus* Swing., *Eremocitrus*

Swing., e *Clymenia* Swing., constituindo estes últimos, juntamente com *Citrus*, o grupo dos cítricos verdadeiros, por produzirem frutos semelhantes à laranjas ou ao limão (Swingle 1967; Ortiz Marcide 1985). Das sete subfamílias descritas para Rutaceae, Aurantioideae é a mais bem estudada sob os mais diversos aspectos, devido à importância econômica de muitas de suas espécies. A taxonomia de *Citrus*, entretanto, é bastante complexa havendo diferenças extremas no número de espécies consideradas a depender do sistema de classificação adotado. Os principais sistemas utilizados atualmente são os de Swingle (1967) e Tanaka (1977). Swingle subdividiu o gênero, totalizando 16 espécies, em dois subgêneros: *Papeda*, constituído por espécies mais primitivas e sem valor comercial, e *Citrus*, constituído pelas espécies de importância econômica. O sistema de Tanaka (1977) subdividiu *Citrus* nos subgêneros *Archicitrus* e *Metacitrus*, reconhecendo 162 espécies. A maior diferença entre esses dois sistemas diz respeito à classificação das tangerinas. Swingle posicionou a maioria delas dentro de *C. reticulata*, enquanto Tanaka separou as tangerinas em 36 espécies independentes. As espécies do subgênero *Papeda*, como *C. hystrix* D.C., *C. macroptera* Montr. e *C. micrantha* West., apresentam pecíolo alado, pequenas inflorescências e tecido com vesículas de óleo de sabor amargo, tornando os frutos impróprios para o consumo. Todas as espécies são sensíveis ao frio e monoembriônicas. Duas outras espécies, *C. latipes* (Swing.) Tan. e *C. ichangensis* Swing., apresentam características intermediárias, com flores características de *Citrus* e folhas semelhantes às espécies de *Papeda*, além de serem resistentes ao frio e poliembrionicas (Scora 1975).

A causa da grande diferença existente entre esses principais sistemas de classificação em relação ao número de espécies foi atribuída a duas características principais do gênero. Primeiramente, a maioria das espécies de *Citrus* e gêneros próximos possui alta capacidade de intercruzamento com produção de híbridos férteis. Segundo, suas espécies podem apresentar o fenômeno da poliembrionia nucelar, ou seja, vários embriões sendo produzidos a partir de



uma única semente. Com isso, muitas espécies de *Citrus* podem ser na verdade apenas híbridos propagados por apomixia (Barrett e Rhodes 1976; Herrero *et al.* 1996). Além disso, muitas “espécies” podem ter surgido a partir da expansão dos cultivos através da seleção de mutantes somáticos ou pela produção de híbridos artificiais. Tanto a hibridização interespecífica como a intergenérica, além da poliembrionia, são consideradas responsáveis pela alta variabilidade genética encontrada na maioria das espécies de *Citrus* (Davies e Albrigo 1994). Atualmente, acredita-se que a maioria das espécies de *Citrus* sejam híbridos derivados de cruzamentos a partir das três espécies básicas *C. medica*, *C. reticulata* e *C. grandis*, ou de cruzamentos entre essas e espécies do subgênero *Papeda* (revisado por Moore 2001).

#### 2.1.4 – Embriogênese nucelar ou poliembrionia

A embriogênese nucelar é um importante fenômeno para a biologia reprodutiva dos citros. Consiste na formação de dois ou mais embriões a partir de uma única semente e ocorre em várias espécies cítricas. Nesse caso, além do embrião zigótico, originado da fecundação entre um gameta masculino e um feminino, um ou mais embriões são formados a partir de células do tecido nucelar. O nucelo é um tecido diplóide do óvulo, de origem exclusivamente materna e envolvido na nutrição do embrião. Embriões formados a partir do nucelo são, portanto, geneticamente idênticos à planta-mãe. Embriões extras podem surgir ainda, em menor frequência, por duplicação do saco embrionário ou por divisão do embrião zigótico, originando indivíduos geneticamente idênticos (Frost 1938; Bacchi 1944; Medina Filho *et al.* 1993).

Muitos embriões nucelares podem ser formados, embora geralmente apenas dois ou três se desenvolvam até a maturidade. As espécies que apresentam essa característica são chamadas poliembriônicas. Durante a germinação da semente, os embriões nucelares competem com o geralmente único embrião zigótico por espaço e nutrientes. Assim, quando essas sementes são plantadas, muitas vezes se desenvolve uma planta com a mesma composição genética da planta da qual ela se originou. Isso explica porque muitas espécies de *Citrus* são, na verdade, de origem assexuada (Frost e Soost 1968; Soost e Cameron 1975).

Aparentemente, o embrião zigótico, situado próximo ao ápice do saco embrionário, ocupa posição desfavorável em relação aos embriões nucelares, principalmente quanto à captação de nutrientes no interior do saco embrionário. Os embriões podem ser encontrados em diferentes estádios de desenvolvimento, pois não há sincronismo no desenvolvimento dos nucelares e estes não dependem do início do desenvolvimento do embrião zigótico. Desta maneira, pode ocorrer ainda, em algumas cultivares, sementes com uma ou mais plântulas nucelares e nenhuma de origem zigótica. É bastante freqüente a presença de plântulas de diferentes tamanhos em sementes germinadas de citros.

#### 2.1.5 – A poliembrionia e o melhoramento genético

A poliembrionia, associada à facilidade de cruzamentos interespecíficos em espécies de *Citrus* e deste com gêneros proximamente relacionados, apresenta-se como um grande obstáculo a estudos taxonômicos, uma vez que muitas das “espécies” identificadas para o

gênero não passam de híbridos naturais propagados apomiticamente. Entretanto, em relação aos trabalhos de melhoramento genético, a poliembrionia pode ser analisada de duas maneiras. Por um lado, tem sido de grande interesse para os melhoristas, uma vez que a propagação de plantas por meio de embriões nucelares proporciona a renovação dos bancos de germoplasma por conservar as características da planta mãe, além de estarem esses livres de pragas e doenças (Cameron e Soost 1968). Por outro lado, a poliembrionia representa um empecilho às práticas de hibridização. Em alguns materiais, o embrião zigótico pode ser eliminado totalmente, reduzindo a frequência de genótipos recombinantes e impossibilitando a obtenção de novas cultivares com constituição genética distinta. Além disso, naqueles cruzamentos em que o embrião zigótico consegue sobreviver, é difícil distinguí-lo dos embriões nucelares nos estágios iniciais de desenvolvimento.

A utilização de métodos para se distinguir os embriões zigóticos dos nucelares foi realizada primeiramente com base em um gene marcador dominante, codificador da característica 'trifoliada', expressa na espécie *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., proximamente relacionada a *Citrus*. Assim, em cruzamentos de *Citrus* spp. Com *P. trifoliata* os indivíduos zigóticos deverão ser trifoliados. Esse é um método bastante utilizado, entretanto pode haver a transferência de genes indesejáveis de *P. trifoliata* para os híbridos, além de ser um método muito demorado (Cameron e Frost 1968).

A partir do emprego de marcadores enzimáticos identificou-se o chamado método "browning", que é baseado no fato algumas espécies e cultivares de *Citrus* apresentarem coloração marrom no macerado de seus brotos foliares, possibilitando o reconhecimento de embriões zigóticos se um de seus parentais apresentar essa característica. Essa coloração marrom é provocada pela oxidação produzida pela enzima polifenol oxidase. Contudo, foi observado que no macerado de brotos foliares em algumas cultivares a cor permanecia verde (*nonbrowning*) indicando que, nesse caso, as plantas eram deficientes para essa enzima. A

característica “*browning*” é dominante sobre a “*nonbrowning*”. Esse método possui a desvantagem de não poder ser aplicado a pais com o mesmo fenótipo, relativamente a este caráter, a uma vez que a reação de escurecimento depende também de outros fatores ainda não identificados (Esen e Scora 1975; Esen e Soost 1977). Além disso, essa técnica só se aplica a plantas adultas de citros, não se manifestando em macerados de folhas oriundas de indivíduos ainda em fase juvenil (Soares Filho *et al.* 1994).

Atualmente, técnicas citogenéticas têm sido utilizadas para diferenciar os indivíduos zigóticos dos nucelares. A diferenciação citológica é feita mediante uma análise cariotípica detalhada dos parentais e na progênie obtida de cruzamentos. Em *Citrus*, o bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI tem se mostrado método mais adequado para esse tipo de análise revelando a identidade híbrida de muitas espécies, através do heteromorfismo cariotípico, alta variabilidade no padrão de bandas cromossômicas, além de tipos cromossômicos que funcionam como marcadores citológicos (Guerra 1993).

## 2.2 – Bandeamento cromossômico

O advento das técnicas de coloração diferencial, ou bandeamento cromossômico tem permitido ampliar os estudos de evolução cariotípica em diversas espécies vegetais. Essas técnicas permitem visualizar regiões cromossômicas específicas como a heterocromatina constitutiva, revelada pela técnica de bandeamento C. Esse tipo de análise fornece um maior poder de investigação, uma vez que atribui novos parâmetros para a caracterização cromossômica. O bandeamento C, a coloração com fluorocromos e a hibridização *in situ* são as técnicas citogenéticas de coloração diferencial mais amplamente utilizadas para comparar

cariótipos de híbridos intra e interespecíficos (ver, por exemplo, Seal e Bennett 1982; Friebe *et al.* 1993; Guerra 1993; D'Hont *et al.* 1996; Guerra *et al.* 2000; Pedrosa *et al.* 2000).

A heterocromatina constitutiva é vista em forma de bandas com padrão de coloração diferenciado do restante do cromossomo. Essas bandas são formadas por seqüências de DNA repetitivo e, em geral, apresentam quantidades variáveis de espécie para espécie. No bandeamento C, os cromossomos passam por processos de desnaturação e remoção da maior parte do DNA da eucromatina, enquanto que a heterocromatina permanece praticamente intacta. Quando os cromossomos são corados, a heterocromatina aparece como bandas diferencialmente coradas. A técnica de bandeamento C atualmente mais empregada na citogenética vegetal foi descrita por Schwarzacher *et al.* (1980). O bandeamento C auxiliou na identificação dos cromossomos das espécies parentais de triticales, um híbrido entre trigo e centeio, devido à variação na distribuição da heterocromatina nessa espécie (Seal e Bennett 1982). Os cromossomos de milho também foram caracterizados através da localização da heterocromatina, a qual está presente na maioria dos cromossomos nas regiões teloméricas, proximais e intersticiais (Aguiar-Perecin 1985). Divergências no padrão de bandas C entre os gêneros *Dictamnus* e *Ruta* (Rutaceae), bem como outras características citológicas, sugeriram a separação desses gêneros em tribos distintas (Guerra 1985).

As regiões heterocromáticas também podem ser detectadas pelo uso de corantes fluorescentes, uma vez que essas regiões de DNA repetitivo apresentam muitas vezes uma proporção de pares de bases guanina e citosina (GC) ou de adenina e timina (AT) diferente do resto do genoma. Os fluorocromos mais largamente utilizados em vegetais são a cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). O CMA se liga preferencialmente às regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC, enquanto o DAPI se liga preferencialmente a regiões ricas em pares de bases AT (Schweizer e Ambros 1994). Além desses, a quinacrina e o Hoechst 33258, que coram regiões ricas em AT, e a mitramicina, que

cora regiões ricas em GC, podem também ser utilizados (Friebe *et al.* 1996). Essa técnica permite analisar a heterocromatina de forma mais detalhada que o bandeamento C, em virtude da especificidade de cada fluorocromo.

Guerra (1993) encontrou uma grande quantidade de bandas heterocromáticas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> no cariótipo de seis espécies de *Citrus* e identificou heteromorfismo entre vários pares cromossômicos. Diferenças no padrão de bandas, com uso da coloração CMA/DAPI e bandeamento C foram descritas em seis espécies do gênero *Sesbania* (Forni-Martins e Guerra 1999). Por outro lado, De Carvalho e Guerra (2002) encontraram padrões de bandas semelhantes entre cultivares e espécies de *Manihot*, com o uso dos fluorocromos CMA e DAPI, sugerindo alta estabilidade cariotípica para o gênero. Além de permitir uma melhor caracterização dos cromossomos, essa técnica parece não alterar a morfologia e estrutura cromossômica, como ocorre com o bandeamento C, o que a torna mais indicada para a análise cariotípica de espécies com cromossomos pequenos (Guerra 1993).

### 2.3 – Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* é uma das técnicas citogenéticas mais recentes e tem contribuído para um detalhamento ainda maior do estudo cariotípico de diversas espécies vegetais. Esta técnica foi desenvolvida por Gall e Pardue (1969) há mais de 30 anos, para localizar ácidos nucléicos diretamente nos cromossomos (McNeil *et al.* 1991). O método consiste em desnaturar e hibridizar fragmentos de DNA ou RNA conhecidos e marcados (sondas) com o DNA ou RNA (alvo) existente nas células de um organismo em estudo. As seqüências mais comumente utilizadas no estudo cariotípico são as de DNA ribossomal 5S e 45S. A utilização desta técnica melhorou a resolução e aumentou a confiabilidade na caracterização cariotípica.

No feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], foi encontrado um número muito superior de sítios de DNAr (10 sítios) em relação ao número de regiões organizadoras de nucléolos (ca. 2) descritas anteriormente com nitrato de prata, que revelou apenas os sítios ativos (Guerra *et al.* 1996).

A hibridização *in situ* também vem sendo empregada com sucesso em estudos de caracterização cromossômica de plantas cultivadas. O número e a posição das seqüências de DNAr 5S e 45S em três espécies de cana-de-açúcar mostrou a relação entre o nível de ploidia e o número de sítios de DNAr (D'Hont *et al.* 1998). Um mapeamento físico cromossômico através da hibridização *in situ* de seqüências gênicas e de DNAr 5S e 45S foi realizado em espécies de cevada (*Hordeum vulgare*) comparativamente ao mapa genético previamente descrito (Leitch e Heslop-Harrison 1993). Outro estudo envolvendo o mapeamento físico revelou mudanças, principalmente, na posição dos sítios de DNAr 5S em diferentes espécies de *Hordeum* (Taketa *et al.* 1999). Diferenças no número, tamanho e posição dos sítios de DNAr podem ocorrer entre espécies proximamente relacionadas. Alterações estruturais por meio de rearranjos cromossômicos como, por exemplo, deleções e translocações, podem explicar esse tipo de variação (Schubert e Wobus 1985; Zurita *et al.* 1997). Por outro lado, a análise em cultivares de laranja doce (*C. sinensis*) revelou um padrão constante de bandas CMA<sup>+</sup> e sítios de DNAr 5S e 45S (Pedrosa *et al.* 2000). Estabilidade cariotípica também foi relatada em relação ao número de sítios de DNAr 5S e 45S entre cultivares de aspargo (*Asparagus officinalis* L.) por Melo e Guerra (2001) e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) por De Carvalho e Guerra (2002).

## 2.4 – Citogenética do gênero *Citrus*

### 2.4.1 – Número cromossômico, características gerais e poliploidia

Os estudos citogenéticos iniciais em *Citrus* realizados por Strassburger (1907) e Osawa (1912), citados por Krug (1943), descreveram o número cromossômico básico  $x=8$  para o gênero. O número cromossômico haplóide correto,  $n=9$ , foi descrito pela primeira vez por Frost (1925) e confirmado posteriormente por diversos autores em várias espécies do gênero (Longley 1925; Krug 1943; Krug e Bacchi 1943; Guerra *et al.* 1997). Apesar da grande diversidade morfológica, as espécies de *Citrus* e gêneros relacionados apresentam, em geral, cromossomos de tamanho pequeno (1 a 3,5  $\mu\text{m}$ ) e morfologia (meta a submetacêntricos) pouco variável (Sharma e Bal 1957; Agarwal 1987; Roose *et al.* 1998; Guerra *et al.* 1997). Isso explica o fato de que muitas informações citológicas registradas na literatura se refiram apenas ao número cromossômico ou a poucas características morfológicas.

Sharma e Bal (1957) analisaram o cariótipo de quatro espécies de *Citrus*, classificando os cromossomos em 10 diferentes tipos com base no comprimento cromossômico e na posição das constrições primárias e secundárias. Esses autores descreveram ainda cromossomos denominados marcadores, os quais possibilitaram a distinção entre as espécies de acordo com a presença ou ausência desses tipos cromossômicos. Entretanto, alguns autores contestaram os resultados de Sharma e Bal (1957) apontando falhas nos métodos de medição e identificação dos tipos cromossômicos. Posteriormente, Guerra *et al.* (1997) analisaram convencionalmente 20 espécies de *Citrus* além de híbridos interespecíficos, não encontrando nenhuma variação cromossômica numérica ou morfológica evidente. Esses autores relataram diferenças apenas em relação ao número e posição das constrições secundárias entre os acessos investigados.

Em geral, as espécies de *Citrus* são diplóides, mas raramente são encontrados indivíduos poliplóides, principalmente triplóides e tetraplóides em cultivo (Frost 1925; Krug



1943). A poliploidia pode ocorrer naturalmente devido à formação de gametas não-reduzidos, pela duplicação do conjunto cromossômico em células somáticas ou ainda por indução através de cruzamentos entre espécies diplóides ou entre diplóides divergentes e tetraplóides (Esen e Soost 1971; Lee 1988).

A triploidia, uma das formas poliplóides de maior interesse no melhoramento de *Citrus*, devido à formação de frutos sem sementes, é obtida a partir da fusão de um gameta diplóide ( $2n$ ) com um gameta haplóide ( $n$ ). Em *Citrus*, tem sido demonstrado que o gameta diplóide é fornecido preferencialmente pela planta-mãe (Esen e Soost 1971; Esen *et al.* 1979). A lima ácida 'Tahiti' é o triplóide de origem natural que melhor exemplifica uma espécie poliplóide com grande importância econômica. Além de ser altamente produtivo e apresentar apenas umas raras sementes em poucos frutos, possui ainda outras características próprias para o consumo e industrialização (Krug e Bacchi 1943; Gayet *et al.* 1995).

Os tetraplóides são, em geral, plantas apogâmicas produzidas a partir do tecido nucelar por duplicação cromossômica de suas células mitóticas (Cameron e Frost 1968). Quando adultas, as plantas tetraplóides apresentam geralmente crescimento lento, frutos de tamanho pequenos, sem valor comercial, além de uma forte redução no porte da planta com a formação de copas compactadas. Entretanto, podem ser utilizados como porta-enxertos em programas de melhoramento ou como doadores de gameta diplóide na obtenção de plantas triplóides (Starrantino e Recupero 1981). As cultivares triplóides de pomelo Oroblanco e Melogold foram obtidas a partir do cruzamento de diplóides com tetraplóides (Soost e Cameron 1980, 1985).

#### 2.4.2 – Análise meiótica

A meiose em células-mãe de pólen de *Citrus* mostra, normalmente, a ocorrência de nove cromossomos bivalentes, porém podem ocorrer algumas alterações do tipo pontes anafásicas, univalentes, além de muitos fragmentos (Raghuvanshi 1962; Selito-Boaventura e Pio 1989). Agarwal (1987) analisou o comportamento meiótico de algumas espécies e híbridos, relatando que os nove bivalentes formaram associações secundárias, arranjando-se em grupos de três na primeira divisão meiótica. Essas alterações têm sido atribuídas à heterozigidade cromossômica estrutural do tipo inversões e translocações, podendo estar relacionadas à origem híbrida da maioria das espécies de *Citrus* (Barrett e Rhodes 1976). Entretanto, muitos híbridos diplóides intergenéricos e interespecíficos apresentam meiose totalmente normal. A análise meiótica em híbridos artificiais e espécies supostamente híbridas não revelou alterações significativas, indicando alta homeologia cromossômica entre os parentais e sugerindo um parentesco comum entre as espécies analisadas (Agarwal 1987; Cornélio 1994).

Em algumas cultivares triplóides, tem sido observado que os microsporócitos e os megasporócitos degeneram num estágio inicial de desenvolvimento e, em outras, univalentes, bivalentes e trivalentes são formados durante a microsporogênese. Nesse caso, o número de cromossomos que migra para cada pólo é muito variável e os micrósporos formados apresentam tamanho e número variados, sendo os grãos de pólen freqüentemente anormais. Por esta razão, os triplóides são, em geral, estéreis produzindo, frutos com raríssimas sementes (Krug e Bacchi 1943; Frost e Soost 1968). A microsporogênese analisada em algumas cultivares tetraplóides mostrou que, assim como nos triplóides, os microsporócitos degeneram em estágios iniciais da primeira meiose ou simplesmente não são formados. Em umas poucas cultivares que chegam a formar micrósporos, observou-se em maior proporção a

presença de quadrivalentes, além de univalentes e trivalentes. Cada microsporócito forma, em geral, mais de quatro micrósporos, resultando em poucos esporos viáveis (Frost e Soost 1968; Lee 1988).

#### 2.4.3 – Técnicas de bandeamento empregadas

O bandeamento C revelou em *Citrus* numerosos blocos heterocromáticos e detectou padrões de bandas diferentes entre as espécies analisadas (Guerra 1985; Liang 1988; Wei *et al.* 1988). Entretanto, este método não se mostrou satisfatório, pois a morfologia dos cromossomos foi marcadamente afetada e o padrão de bandas apresentou algumas variações, inclusive em uma mesma lâmina.

A coloração com CMA/DAPI, por outro lado, tem sido a mais indicada no estudo citogenético dos citros, pois essas espécies apresentam grandes blocos CMA<sup>+</sup> que permitem identificar vários cromossomos do cariótipo, além disso, preserva melhor a morfologia cromossômica e apresenta alta reprodutibilidade nos resultados (Guerra 1993). Esta técnica tem revelado que as espécies de *Citrus* mais importantes (laranjas, limões e tangerinas), além de espécies afins, apresentam polimorfismo interespecífico e alto grau de heterozigosidade cromossômica em relação ao padrão de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>.

A heterocromatina é localizada principalmente nos telômeros dos braços longos, com poucas bandas terminais nos braços curtos e regiões proximais (Guerra 1993; Guerra *et al.* 2000; Pedrosa *et al.* 2000; Befu *et al.* 2001). Tem sido demonstrado que, além das diferenças na localização da heterocromatina nos cromossomos, sua quantidade é muito variável entre espécies da subfamília Aurantioideae. Miranda *et al.* (1997a) analisaram o padrão de distribuição das bandas CMA<sup>+</sup> em espécies de *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* e encontraram

um padrão de bandas semelhante entre as espécies de *Citrus* e *Poncirus*. Por outro lado, o cariótipo dos dois acessos de *Fortunella* analisados foi muito divergente em relação aos dois primeiros gêneros, mostrando alto percentual de heterocromatina. Guerra *et al.* (2000) observaram proporções ainda maiores de heterocromatina em *Murraya paniculata* (L.) Jack.

A hibridização *in situ* tem sido utilizada em *Citrus* e espécies próximas a fim de obter maior diferenciação cromossômica e aumentar o número de cromossomos marcadores descritos com a técnica de CMA/DAPI. Matsuyama *et al.* (1996) localizaram as sequências de DNAr 26S e a disposição do DNA telomérico em *C. sinensis*. Esses autores mostraram que os sítios de DNA ribossomal coincidiram com as regiões CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Pedrosa *et al.* (2000) evidenciaram igual distribuição das bandas CMA<sup>+</sup> e sítios de DNAr 45S em cultivares de *C. sinensis*, além de localizarem os sítios de DNAr 5S. O padrão cromossômico heterozigótico relatado por esses autores sugeriu uma origem híbrida para esta espécie.

Miranda *et al.* (1997b) encontraram quatro sítios de DNAr em ‘Meiwa kumquat’ (*Fortunella crassifolia* Swing.), os quais coincidiram com as regiões de heterocromatina CMA<sup>+</sup>. Esses autores identificaram novos cromossomos marcadores, além de novos locos para genes de RNAr em relação aos sítios localizados nos cromossomos tipo C e sugeriram origem híbrida para este acesso, devido a diferenças no tamanho desses sítios de DNAr entre os cromossomos homólogos. Similarmente, Roose *et al.* (1998) identificaram cromossomos marcadores extras, além de alto nível de heterozigozidade cromossômica em espécies de *Citrus*, *Poncirus* e híbridos relacionados, mediante a associação das técnicas de hibridização *in situ*, com sondas de DNAr 5S e 45S e CMA/DAPI.

#### 2.4.4 – Relação entre espécies de *Citrus* baseada em análises bioquímicas e moleculares

Até metade da década de setenta, a taxonomia de *Citrus* desenvolveu-se com base em características morfológicas e geográficas. Posteriormente, diversos estudos bioquímicos e moleculares foram realizados para o melhor entendimento das relações filogenéticas das espécies cítricas. Barrett e Rhodes (1976) concluíram que existem apenas três espécies ancestrais de todos os citros (*C. reticulata*, *C. medica* e *C. grandis*), sendo todas as demais consideradas híbridas. Esses autores basearam-se na análise filogenética de dados bioquímicos e morfológicos de folhas, flores e frutos de 146 acessos. A diversidade isoenzimática investigada em 198 cultivares de *Citrus* proporcionou a divisão de suas espécies em dois principais grupos, um formado pelas laranjas e tangerinas e outro abrangendo as limas, limões, cidra e pomelos (Asíns *et al.* 1998).

De acordo com Swingle (1943), os limões apresentam possivelmente origem híbrida. Posteriormente, esta hipótese foi reforçada através de dados bioquímicos e moleculares indicando *C. medica* como um dos ancestrais das limas e limões (Malik *et al.* 1974; Roose *et al.* 1998; Nicolosi *et al.* 2000).

Herrero *et al.* (1996), com base em dez sistemas isoenzimáticos, concluíram que tangerina, laranja doce, limão e pomelo apresentam baixa variabilidade genotípica. Entretanto, encontraram alto percentual heterozigótico entre as limas (*C. aurantifolia*, *C. limettioides* e *C. latifolia*) e limões (*C. limon*, *C. karna*, *C. meyeri* e *C. volkameriana*), sugerindo uma origem híbrida para esses materiais. As laranjas e pomelos, por outro lado, apresentaram baixos índices de heterozigosidade, sugerindo processos de auto-polinização e períodos de adaptação ao longo de sua evolução. As limas foram provavelmente originadas a partir de um cruzamento envolvendo três espécies *C. medica*, *C. grandis* e uma espécie do gênero *Microcitrus* (Barrett e Rhodes 1976).

Torres *et al.* (1978) observaram, com base em padrões isoenzimáticos, forte relacionamento entre as tangerinas e laranjas (*C. sinensis* e *C. aurantium*), podendo estas últimas terem surgido a partir do cruzamento entre *C. grandis* e uma espécie de tangerina.

As diversas cultivares de citros com características morfológicas distintas refletem pequenas diferenças no DNA individual, podendo ser causadas por inserções ou deleções, difíceis de serem detectadas por métodos como os de isoenzimas.

Mais recentemente técnicas moleculares, principalmente utilizando RAPD-DNA *Polimórfico Amplificado Aleatoriamente* (Random Amplified Polymorphic DNA) e RFLP-*Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição* (Restriction fragment length polymorphism), têm sido bastante empregadas. Coleta Filho *et al.* (1998) analisaram a diversidade genética entre espécies e híbridos de tangerinas utilizando 23 primers, produzindo 109 marcadores RAPD, dos quais 45 foram polimórficos. Alto índice de similaridade genética foi detectado sugerindo uma estreita relação genética entre os acessos. Esses autores propuseram a inclusão das espécies analisadas dentro de *C. reticulata*, ao invés de um grande número de espécies como proposto por alguns sistemas de classificação.

Roose (1988) analisou marcadores RFLP em 68 cultivares de citros. Os resultados mostraram altos níveis de heterozigidade, sugerindo uma origem híbrida para a maioria dos acessos. Similarmente, alta heterozigidade foi encontrada entre 45 espécies de *Citrus* analisadas, exceto nas espécies *C. reticulata*, *C. grandis* e *C. medica*, as quais apresentaram “fragmentos únicos”, sendo consideradas espécies básicas do subgênero *Citrus* (Federici *et al.* 1998).

Seqüências de nucleotídeos de 15 pb, incluídas nas chamadas VNTR-*Seqüências Adjacentes Repetidas em Número Variável* (Variable Number of Tandem Repeats) ou minissatélites foram utilizadas no estudo da variabilidade genética entre cultivares de tangerinas e laranjas, além da distinção de “seedlings” de origem zigótica e nucelar a partir de

uma progênie de *C. volkameriana*. A análise dos fragmentos de DNA amplificados revelou não só a origem dos indivíduos, como também a distinção entre dez cultivares de *C. reticulata*, distribuindo-as em sete grupos, com base nos percentuais de similaridade. Por outro lado, este método não foi capaz de diferenciar as cultivares de *C. sinensis* (Luro *et al.* 1995).

Fann *et al.* (2001) avaliaram a evolução do DNA satélite, em espécies de *Citrus* e *Poncirus*, e demonstraram a ocorrência de pequenas variações entre elas. A maioria dos monômeros apresentou 181 pb e um conteúdo de guanina e citosina de 60% e 68%, representando uma média superior de GC para os genomas de *Citrus*. Esses autores concluíram que as pequenas diferenças observadas indicam que as sequências analisadas pertencem a uma família de DNA satélite que sofreu modificações espécie-específicas ao longo da evolução.

Os ISSR-*Inter-Simple Sequence Repeats* (Sequências Repetidas Inter-Simples), constituídos de repetições de 2-4 nucleotídeos, foram amplificados para localizar polimorfismos entre 68 cultivares de *Citrus* geneticamente relacionadas. Embora muitos acessos tenham apresentado bandas monomórficas, foi possível encontrar polimorfismos distintos para laranja doce, pomelo, limão e tangerina (Fang e Roose 1997).

Nicolosi *et al.* (2000) analisaram *Citrus* e gêneros relacionados com base em marcadores RAPD e nove iniciadores espécie-específicos do tipo SCAR-*Regiões Amplificadas de Sequências Caracterizadas* (Sequence-Characterized Amplified Regions) encontrando uma estreita relação genética entre *C. aurantifolia* e *C. macrophylla*, sugerindo esta última, juntamente com *C. medica*, como espécies ancestrais das limas. Esses autores concluíram ainda, com base no DNA de cloroplasto, que *C. medica* e *C. sinensis* ou *C. aurantifolia* seriam os ancestrais paterno e materno de *C. limettioides*, respectivamente. Nesta mesma análise, *C. grandis*, *C. paradisi* e *C. sinensis* foram proximamente relacionadas.

### **3. Referências Bibliográficas**

---

---



### 3.1. Referências Bibliográficas

- Agarwal PK. 1987.** Cytogenetical investigations in Rutaceae I. Meiotic studies in four *Citrus* species of hybrid origin. *Cytologia* **52**: 753-756.
- Aguiar-Perecin MLR. 1985.** C-banding in maize. I. Band patterns. *Caryologia* **38**: 23-30.
- Asíns MJ, Mestre PF, Herrero R, Navarro L, Carbonell EA. 1998.** Molecular markers: a continuously growing biotechnology area to help *Citrus* improvement. *Fruits* **53**: 293-302.
- Barrett HC, Rhodes AM. 1976.** A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst Bot* **1**: 105-136.
- Bacchi O. 1944.** Observações citológicas em *Citrus* III. Megasporogênese, fertilização e poliembrionia. *Bragantia* **4**: 405-412.
- Befu M, Kitajima A, Hasegawa K. 2001.** Chromosome composition of some *Citrus* species and cultivars based on the chromomycin A (3) (CMA) banding patterns. *J Japan Soc Hort Sci* **70**: 83-88.
- Cameron JW, Frost HB. 1968.** Genetics, breeding and nucellar embryony in *Citrus*. In: Reuther, W.; Patchelor, LD; Webber. HJ (eds.). *The Citrus Industry*. Berkley University of California Press. **2**: 325-370.
- Cameron JW, Soost RK. 1986.** *Citrus*. In: Simmonds NW (ed.). *Evolution of crop plants*. Longman Scientific & Technical, Inglaterra. pp. 261-265.
- Coelho YS, Mascarenhas JM. 1990.** Sazonalidade de safra do limão Tahiti. In: Informativo do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical, CNPMF, Cruz das Almas-BA.
- Cornélio MTMN. 1994.** Caracterização cromossômica de algumas espécies e de híbridos interespecíficos do gênero *Citrus*. Dissertação de Mestrado, UFRPE, Recife, Brasil.

- Cronquist A. 1988.** The evolution and classification of flowering plants. New York. The New York Botanical Garden, 555p.
- Davies FS, Albrigo LG. 1994.** *Citrus*. Crop Production Science in Horticulture 2, CAB International, Wallingford.
- De Carvalho R, Guerra M. 2002.** Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas* **136**: 159-168.
- D'Hont A, Grivet L, Rao PFS, Berding N, Glaszmann JC. 1996.** Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet* **250**: 405-413.
- D'Hont A, Ison D, Alix K, Roux C, Glaszmann JC. 1998.** Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* **41**: 221-225.
- Esen A, Scora RW. 1975.** Distribution of enzymatic browning of young shoot homogenates in the Aurantioideae. *Amer J Bot* **62**: 1078-1083.
- Esen A, Soost RK. 1971.** Unexpected triploids in *Citrus*: their origin, identification and possible use. *J Hered* **62**: 329-333.
- Esen A, Soost RK. 1977.** Separation of nucellar and zygotic browning. *Proceedings International Society of Citriculture, Florida*, **2**: 616-618.
- Esen, A, Soost, R.K. and Geraci, G. (1979).** Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in *Citrus*. *J Hered* **70**: 5-8.
- Fang DQ, Roose ML. 1997.** Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet* **95**: 408-417.

- Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML. 1998.** Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor Appl Genet* **96**: 812-822.
- Forni-Martins ER, Guerra M. 1999.** Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* Scop. Species (*Fabaceae*). *Caryologia* **52**: 97-103.
- Friebe B, Tuleen N, Jiang J, Gill BS. 1993.** Standard karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *T. aestivum*. *Genome* **36**: 731-742.
- Friebe B, Endo TR, Gill BS. 1996.** Chromosome-banding methods. In: Fukui K, Nakayama S. *Plant Chromosome – Laboratory Methods*, CRC Press, Tokyo, pp 123-154.
- Frost HB. 1925.** Tetraploidy in *Citrus*. *Proc Nat Acad Sci* **11**: 535-537.
- Frost H.B. 1938.** The genetics and cytology of *Citrus*. *Current Science* **11**: 24-27.
- Frost HB, Soost RK. 1968.** Seed reproduction: development of gamets and embryos. In: Reuther, W.; Patchelor, LD; Webber, HJ (eds.). *The Citrus Industry*, Berkley: University of California Press. **2**: 290-324.
- Gall JG, Pardue ML. 1969.** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Nat Acad Sci* **63**: 378-383.
- Gayet JP, Bleinroth EW, Matallo M, Garcia EEC, Garcia AE, Ardito EFG, Bordin MR. 1995.** Lima ácida Tahiti para exportação: procedimento de colheita e pós-colheita. *Série Publicações Técnicas Frupex* 12, Embrapa-SPI, Brasília, pp 36.
- Guerra M. 1985.** Cytogenetics of *Rutaceae*. III. Heterochromatin patterns. *Caryologia* **38**: 335-346.
- Guerra M. 1993.** Cytogenetics of *Rutaceae*. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* **71**:234-241.

- Guerra M, Kenton A, Bennett MD. 1996.** rDNA sites in mitotic and polytene chromosome of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. *Ann J Bot* **78**: 157-161.
- 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. *Amer J Bot* **87**:735-747.
- Herrero R, Asíns MJ, Carbonell EA, Navarro L. 1996.** Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor Appl Genet* **92**:599-609.
- Krug CA. 1943.** Chromosome number in the subfamily *Aurantioideae* with special reference to the genus *Citrus*. *Bot Gaz* **104**: 602-611.
- Krug CA, Bacchi O. 1943.** Triploid varieties of *Citrus*. *J Hered* **34**: 277-283.
- Lee LS. 1988.** *Citrus* polyploidy – origins and potential for cultivar improvement. *Aust J Agric Res* **39**: 735-747.
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS. 1993.** Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site  $\alpha$ -amilase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* **36**: 517-523.
- Liang G. 1988.** Studies on the Giemsa C-banding patterns of some *Citrus* and its related genera. *Acta Gen Sin* **15**: 409-415.
- Longley AE. 1925.** Cytology-polycary, polyspary and polyploidy in *Citrus* relatives. *J. Washington Acad Sci* **15**: 347-351.
- Luro F, Laigret F, Bové JM, Ollitrault P. 1995.** DNA amplified fingerprinting, a useful tool

for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. HortScience. **30**: 1063-1067.

**Mcneil JA, Johnson CV, Carter KC. 1991.** Localizing DNA and RNA within nuclei and chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. Genet Anal Tech Appl **8**: 41-58.

**Malik MN, Scora RW, Soost RK. 1974.** Studies on the origin of the lemon. Hilgardia **42**: 361-382.

**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.

**Medina-Filho HP, Bordignon R, Ballve RML. 1993.** Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twins in *Citrus* rootstocks. Rev Bras Gen **16**: 703-711.

**Melo NF, Cervi AC, Guerra M. 2001.** Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). Plant Syst Evol **226**: 69-84.

**Miranda M, Ikeda F, Endo T, Moriguchi T, Omura M. 1997a.** Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosome. Chrom Res **5**:86-92.

**Miranda M, Ikeda F, Endo T, Moriguchi T, Omura M. 1997b.** rDNA sites and heterochromatin in Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swing.) chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI staining. Caryologia **50**:333-340.

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

**Moreira CS, Moreira S. 1991.** História da citricultura no Brasil. In: Rodrigues O, Viégas F, Pompeu JRJ (eds.). *Citricultura Brasileira*. Fundação Cargill, Campinas, pp. 1-18.

- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E. 2000.** *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* **100**: 1155-1166.
- Ortiz Marcide JM. 1985.** Nomenclatura botânica de los cítricos. *Levante Agrícola*, Valencia, Espanha, 259-260, 71p.
- 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.** Cytological studies in *Citrus* IV. Evolution in genus *Citrus*. *Cytologia* **27**: 172-188.
- Roose ML, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS. 1998.** The chromosomes of *Citrus* and *Poncirus* species and hybrids: Identification of characteristic chromosomes and physical mapping of rDNA loci using in situ hybridization and fluorochrome banding. *J Hered* **89**:83-86.
- Schubert I, Wobus U. 1985.** In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* **92**: 143-148.
- Schwarzacher T, Ambros P, Schweizer D. 1980.** Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* **134**: 293-297.
- Schweizer D, Ambros PF. 1994.** Chromosome banding. In: Gosden JR (ed). *Methods in Molecular Biology*, vol. 29, *Chromosome Analysis Protocols*, Humana Press, Totowa, pp 97-113.
- Scora RW. 1975.** IX. On the history and origin of *Citrus*. *Bull Torrey Bot Club* **102**: 369-375.
- Seal AG, Bennett MD. 1982.** Preferential C-banding of wheat or rye chromosomes. *Theor Appl Genet* **63**: 227-233.

- Selito-Boaventura YM, Pio RM. 1989.** Análise citogenética em três cultivares de laranja doce (*C. sinensis* (L.) Osbeck). *Rev Bras Gen* **12**: 117-126.
- Sharma AK, Bal AK. 1957.** Chromosome studies in *Citrus*. I. *Agron Lusit* **19**: 13-20.
- Sobrinho APC. 1980.** Aspecto da citricultura no Norte e Nordeste brasileiro. In: Rodrigues O, Vieira F (eds). *Citricultura Brasileira*. Fundação Cargill, Campinas, pp. 147-179.
- Soost RK, Cameron JW. 1975.** *Citrus*. In: Janick J, Moore JN (eds). *Advances in fruit breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, Ind. 507-540.
- Soost RK, Cameron JW. 1980.** ‘Oroblanco’, a triploid pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience* **15**: 667-669.
- Soost RK, Cameron JW. 1985.** ‘Melogold’, a triploid pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience* **20**: 1134-1135.
- Soost RK, Roose ML. 1996.** *Citrus*. In: Janick J, Moore JN (eds). *Fruit breeding, tree and tropical fruits*. New York: John Wiley, **1**: 257-323.
- Starrantino A, Recupero GR. 1981.** *Citrus* hybrids obtained *in vitro* from 2x females x 4x males. *Proc Inter Soc Citri* **1**: 31-32.
- Swingle WT. 1943.** The botany of *Citrus* and its wild relatives in the orange subfamily. 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. 128-474.
- Swingle WT. 1967.** The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Weber HJ, Batchelor LD (eds). *The Citrus Industry*. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 190-430.

- Taketa S, Harrison GE, Heslop-Harrison JS. 1999.** Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theor Appl Genet* **98**: 1-9.
- Tanaka T. 1977.** Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Stud Citrol* **14**:1-6.
- Torres AM, Soost RK, Diedenhofen U. 1978.** Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. *Amer J Bot* **65**: 869-881.
- Wei W, Cheng Y, Duan, Y. 1988.** Studies on the evolution of *Citrus* based on Kariotype and Giemsa C-banding patterns. *Acta Hortic Sinica* **15**: 223-228.
- Zurita F, Sánchez A, Burgos M, Jiménez R, De La Guardia RD. 1997.** Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridisation. *Heredity* **85**: 557-561.



## 4. Capítulo 1

Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus*

*reticulata* Blanco, its hybrids and related species

Artigo aceito para publicação na revista *Plant Systematics and Evolution*

---

---

## **Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species.**

**M. T. M. N. Cornélio<sup>1</sup>, A. R. S. Figueirôa<sup>2</sup>, K. G. B. Santos<sup>2</sup>, R. Carvalho<sup>2</sup>,  
W. S. Soares Filho<sup>3</sup>, and M. Guerra<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>3</sup>EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, Brazil.

**Abstract.** Karyotypes of 93 individuals belonging to 18 accessions of mandarins, mandarin hybrids and two related species were analysed with the fluorochromes CMA and DAPI, to identify marker chromosomes. The karyotypes revealed highly differentiated banding patterns and could be classified in four groups according to the presence/absence of chromosomes with three bands (type A) or with two bands (one proximal and one terminal, type B, or both terminals, type C). The accessions of group I exhibited the simplest karyotypes (lacking chromosome types A, B and C), represented by ‘Sunki’ and ‘Cleopatra’. Group II (lacking chromosome types A and B) included three accessions of Mediterranean mandarins and ‘Cravo’ mandarin, all of them with very similar and almost completely homozygous karyotypes. All other karyotypes of groups II and III (lacking chromosome type A) were heterozygous for one or more chromosome pairs and most of them seemed to be hybrids derivatives from non-mandarin accessions. Group IV (with chromosome types A and B) was represented only by two heterozygous hybrids (‘Murcott’ and ‘King’). The karyotype of most hybrids agrees with one of the possible combinations resulting from chromosome types segregation from their putative ancestor karyotypes, but at least ‘Orlando’ seemed to be a more complex hybrid. Comparing with banding patterns of other *Citrus* species, those of group I and the Mediterranean mandarins are the best candidates to represent *C. reticulata* (sensu Swingle) as a true species.

**Key words:** Mandarins, CMA banding, chromosome markers, *Citrus* hybrids.

The genus *Citrus* L., is both the most important fruit crop in the world and an almost unsolvable taxonomic group. It was formerly subdivided by Swingle (1943) into the subgenera *Papeda*, a group of primitive species, and *Citrus*, which includes all commercially important citric species. The two main classification systems of *Citrus* differ largely in terms of the number of species accepted: 16 species according to Swingle (1943) and 162 species according to Tanaka (1977). Scora (1975), based on biochemical studies of several species, and Barrett and Rhodes (1976), based on a phylogenetic analysis of 146 morphological and biochemical traits in 43 accessions, concluded that there exist only three species [*C. reticulata* Blanco, *C. medica* L. and *C. grandis* (L.) Osb.], considering the remaining groups as hybrids. In spite of the evidences largely favourable to Swingle's system, Tanaka's nomenclature remains by far the most widely used. The correspondence between the two systems has been carefully preserved (Blondel 1978).

The taxonomic conflict among *Citrus* species has been attributed to several factors: intense apomictic reproduction by nucellar embryony; expression of characters of young plants in nucellar bud embryos; wide cross compatibility, resulting in many natural and artificial hybrids highly vigorous and fertile; cultivar selection often from spontaneous somatic mutations, and a long history of cultivation (Cameron and Frost 1968, Davies and Albrigo 1994, Moore 2001). Apparently, after cultivation many *Citrus* species lost their species identity. Even so, Asíns et al. (1998), based on isoenzyme diversity of 198 cultivars of *Citrus* and related genera, were able to distinguish two main groups of cultivated species: the orange-mandarin group and the lime-lemon-citron-pummelo group.

More recently, several authors tried to find out the relationships between *Citrus* accessions, using mainly isozyme and molecular markers (Moore 2001). In general, a variable heterozygosity level associated with low interspecific variation has been found, but no clear consensus about the relationships between cultivated and wild species has been established.

Mandarins are the most diversified group of citric fruits, including both monoembryonic and polyembryonic cultivars and many interspecific hybrids (Hodgson 1967, Barrett and Rhodes 1976). Nevertheless, a remarkable similarity among mandarin cultivars at the molecular and isoenzymatic level has been reported (Esen and Scora 1977, Machado et al. 1996, Coletta Filho et al. 1998). According to Tanaka (1969, 1977) there are 36 mandarin species whereas Swingle recognized only three species, one of them, *C. reticulata*, comprising 34 species of Tanaka's system (Swingle 1967).

Chromosome analyses have shown that, with the exception of a few polyploids, the genus has a stable chromosome number of  $2n=18$ , with a limited number of chromosome markers in the conventional karyotype (reviewed by Guerra et al. 1997). However, when the chromosomes of six species of *Citrus* were double stained with the fluorochromes chromomycin A3 (CMA) and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), they exhibited many  $CMA^+/DAPI^-$  bands (CMA banding) with a high level of heterozygosity and interspecific karyotype diversification (Guerra 1993). Previous works using C-banding resulted in a banding pattern similar to CMA/DAPI staining, but there were technical disadvantages in relation to fluorochrome banding (Guerra 1985, 1993). *In situ* hybridization with 5S and 45S rDNA probes added some extra markers to the karyotypes (Matsuyama et al. 1996, Miranda et al. 1997a, Roose et al. 1998, Pedrosa et al. 2000) but a clear distinction between cultivars was only possible with CMA banding.

In spite of the chromosomal variability among *Citrus* species, analysis of several *C. sinensis* cultivars with CMA banding has revealed a heterozygous, but stable, karyotype (Matsuyama et al. 1996, Miranda et al. 1997b, Pedrosa et al. 2000). On the other hand, the analysis of a single cultivar of *C. reticulata* displayed a rather homozygous karyotype (Guerra et al. 2000).

In the present work, the CMA banding pattern of 18 accessions of the orange-mandarin group was analysed, including the putative hybrids *C. aurantium* (L.) and *C. sinensis* (L.) Osb. The results revealed a large diversity of banding patterns among mandarins, with only a few cultivars seeming to be homozygous. They further support the hypothesis that *C. reticulata* (sensu Swingle) may be one of the basic species of the genus and cast doubt upon the assumed ancestry of some hybrids.

### **Material and methods**

Seedlings or adult plants of 18 accessions from the Citrus Germplasm Bank of the EMBRAPA- Cassava and Fruit Crops, Cruz das Almas, Bahia, Brazil, were analysed. The accessions and the number of individuals analysed are listed in Table 1.

Root tips from germinating seeds were pre-treated with 8-hydroxyquinoline (0.002M) for 20-24 h at 10 °C before fixation in ethanol:acetic acid 3:1. Seeds with at least three seedlings each were preferentially used in order to increase the chance of working with nucellar embryos. Thus, a banding pattern repeated in two or more seedlings would probably represent the nucellar or maternal karyotype. Additionally, apical meristem from adult plants (scions) of *C. aurantium*, ‘Clementine de Nules’ (*C. clementina* Hort. Ex Tan.) and ‘Murcott’ were pretreated and fixed in the same manner, in order to compare the karyotypes of seedlings with those of the mother plant.

Slide preparation and CMA/DAPI double staining followed Schweizer and Ambros (1994). The meristems were washed twice in distilled water (10 min each), digested with a 2% cellulase-20% pectinase solution (1-1.5 h) and squashed in 45% acetic acid. Only one root tip was used in each slide, in order to avoid mixing nucellar and zygotic seedlings. After

coverslip removal in liquid nitrogen the slides were aged for three days, stained with CMA (1 h), counterstained with DAPI (30 min), and mounted in McIlvaine's (pH 7.0) buffer-glycerol v/v 1:1. Conventional chromosome staining was performed with Giemsa, as described in Guerra et al. (2000).

Metaphases of three to seven slides per accession were photographed and analysed to identify the banding pattern of the accession. Slides with a banding pattern different from the dominant one in that accession were registered as zygotic seedlings. Photomicrographs were taken on Kodak Tri-X Pan film and the negatives were digitized with a film scanner. Alternatively, images of the best cells were captured with a CoHu camera and analysed using the QFISH program of Leica.

## Results

All karyotypes analysed were diploids ( $2n=18$ ) with a large number of highly reproducible and clearly identified  $CMA^+/DAPI^-$  bands, preferentially located at the end of the long arms. Proximal bands sometimes were weakly or neutrally stained with CMA, but they were unambiguously recognized as  $DAPI^-$  bands in all cases. With DAPI, chromosome morphology could be better distinguished (Fig. 2b, f, n and 3b, h).

### *Chromosome types*

The chromosome types of *Citrus* species suggested by Guerra (1993), based on the number and position of  $CMA^+$  bands of six different karyotypes, have been modified in the present work for a more precise description of the banding pattern variation. Figure 1 shows a scheme

including those chromosome types described in Guerra (1993) and the modifications introduced here. Types A (two telomeric and one proximal band), B (one telomeric and one proximal band) and C (two telomeric bands) have been maintained as before. Chromosome types D, E and F have been modified as follows: type D has a single terminal band either large or small; type E has a proximal or interstitial band, and type F has no CMA<sup>+</sup> band. These changes were necessary because the distinction between the former types D (one large telomeric band) and E (one small telomeric band) was not sufficiently precise. Furthermore, chromosomes with a single subterminal to proximal band were not observed in previous works and have been found here in *C. depressa* Hayata as well as in accessions of *C. limon* (L.) Burm. f. and some related species (unpublished data). Type F<sub>L</sub> (Guerra et al. 2000) has been maintained to describe the largest F chromosome, generally the first or the second largest chromosome of the complement, sometimes with a fine terminal CMA<sup>+</sup> band in the long arm. In 'Sunki' *C. sunk* Hort. Ex Tan. this large chromosome had a bright terminal band, but it was clearly a variation of F<sub>L</sub>.

In the current investigation, chromosome types A, B, C and E were rare and easily identified, being good chromosome markers for most of the accessions, whereas types D and F were the most numerous and therefore less suitable for karyotype characterization. Besides the characteristic banding, some of these chromosome types presented other structural features in most accessions. Thus, most C chromosomes had different sized bands, with the smaller band in the smaller arm (except in 'Comum'). The proximal CMA<sup>+</sup> block of type B chromosomes was usually smaller than the terminal one, being specially small in 'Shiikuwashá', 'Orlando' and *C. aurantium*. In prophases or prometaphases it was often distended and deeply negative with DAPI (DAPI<sup>-</sup>), looking like a dull gap. The same DAPI reaction was observed in the proximal band of all type A chromosomes. Similarly, in most



karyotypes there were one or two D chromosomes with a large and remarkably brighter CMA<sup>+</sup> block (CMA<sup>++</sup>), which was DAPI<sup>-</sup> and sometimes detached as a satellite.

### *Chromosomal heterozygosity*

Most of the accessions exhibited heterozygosity for at least one chromosome pair. Variability in chromosome size or band size, as well as the presence or absence of small bands, were only considered when they could be identified in every good cell from different slides. Heterozygosity for type D chromosomes was difficult to ascertain because such chromosomes were numerous and in many accessions the bands varied gradually in size to the point that they were apparently absent, appearing like a type F chromosome. Furthermore, visibility of small bands was often influenced by staining intensity. Therefore, small differences between karyotypes concerning to the number of D or F chromosomes is meaningless. The only heteromorphism that could be assigned for very small bands was that of F<sub>L</sub>, because this chromosome is easily identified. This band was paler and not always visible in one or both F<sub>L</sub> chromosomes of ‘Cleopatra’, ‘Clementine de Nules’, ‘Orlando’, ‘Ponkan’ and *C. aurantium*, therefore it was not included in their karyotype formula.

The assumption that the most frequently found karyotype in seedlings was the nucellar karyotype was confirmed in bud meristems of adult plants of ‘Clementine de Nules’, ‘Murcott’ and *C. aurantium*. Only one seedling with zygotic karyotype was detected in ‘Batangas’, ‘Comum’, ‘King’ and ‘Ponkan’ whereas two of them were found in ‘Montenegrina’. These individuals were not included in Table 1.

*CMA banding pattern of each accession*

According to the presence of chromosome markers, the 16 accessions of mandarin and hybrids analysed could be classified in four groups: I, karyotypes without chromosomes types A, B and C; II, karyotypes without A and B; III, those without A; and IV, those with chromosomes A and B. Table 1 indicates the karyotype formula of all accessions. Figures 2 and 3 show CMA/DAPI stained metaphases of all species and cultivars studied, whereas Figure 4 shows their corresponding idiogrammes.

The simplest banding pattern found was that of group I cultivars ‘Sunki’ (Fig. 2a, b) and ‘Cleopatra’ (Fig. 2c). They displayed the same karyotype formula ( $14D + 4F$ ) and were almost identical, with six D chromosomes having larger bands, one of them with a  $CMA^+/DAPI^-$  satellite (arrow in Fig. 2a, b). The difference between them was due to the  $F_L$  pair, which had a small  $CMA^+$  band in both homologues of ‘Sunki’, whereas in ‘Cleopatra’ the  $CMA^+$  block was weaker or absent.

Four other cultivars with simple and almost identical banding patterns were ‘Montenegrina’, ‘do Rio’, ‘Comum’ and ‘Cravo’, all of them with  $2C + 10D + 6F$  (group II). The karyotypes of ‘do Rio’ and ‘Montenegrina’ were indistinguishable, whereas the other two cultivars displayed small variations. The two C chromosomes were always slightly different in size and each chromosome showed bands of different sizes. In ‘do Rio’ and ‘Montenegrina’ the smaller bands were fainter than the larger one (Fig. 2d). In ‘Comum’ there was one C chromosome with two large bands and another as in ‘do Rio’ and ‘Montenegrina’ (Fig. 2e), whereas in ‘Cravo’ they were equally brilliant (Fig. 2g). They also had six D chromosomes with larger bands in common, and one or two satellited D chromosomes bearing a secondary constriction distended and almost unstained in ‘Comum’ (Figs. 2e, f) or denser and brilliant in ‘Cravo’ (Fig. 2g). ‘Dancy’ ( $1C + 12D + 5F$ ), also in group II, had only one C and nine D

chromosomes with large bands. One small-banded and one large-banded D chromosome of ‘Dancy’ were satellited (Fig. 2h).

In the group III, ‘Oneco’ (1B + 1C + 9D + 7F), ‘Clementine de Nules’ (1B + 1C + 11D + 5F) and ‘Batangas’ (1B + 1C + 10D + 6F) displayed the most similar karyotypes. They had in common a similar C chromosome, six or seven D chromosomes with larger bands (Fig. 2i, j, l) and a B chromosome with a large proximal band, mainly in ‘Clementine de Nules’. In this latter cultivar the CMA<sup>+</sup> block of two D chromosomes was observed as a satellite after sequential Giemsa staining (Fig. 2j, k). These satellites were of different sizes and the chromosome with the largest satellite exhibited sometimes a small band at the opposite telomere, like a weakly stained C chromosome.

*C. depressa* (1B + 1C + 10D + 2E + 4F) was the only accession with E chromosomes (Fig. 2m, n). It had one B with a weak proximal band, one C with bright CMA<sup>+</sup> blocks and six D chromosomes with larger bands, two of them with a CMA<sup>++</sup> block. ‘Ponkan’ (1B + 2C + 11D + 4F), in this same group, diverged mainly by the presence of two C chromosomes, one of them with brighter bands and the other with a satellite in the larger band (Fig. 2o). ‘Orlando’ (1B + 3C + 7D + 7F) was the single accession with three C chromosomes slightly different in size (Figs. 3a, b). ‘Page’ (2B + 1C + 10D + 5F) showed one C chromosome with a secondary constriction, as in ‘Ponkan’, and another secondary constriction in one of the two B chromosomes.

‘Murcott’ (1A + 1B + 10D + 6F) and ‘King’ (1A + 1B + 1C + 10D + 5F) were the only representatives of group IV. They presented a similar A chromosome and a B with a conspicuous proximal CMA<sup>+</sup> band (Fig. 3d, f). In ‘King’ there were two secondary constrictions: one in a B and another in a D chromosome. They were sometimes widely distended, as the chromosomes were splitted in two parts (Fig. 3e). The single C chromosome of ‘King’ had bright and unequal bands.

Two other species, assumed to be involved in the origin of the hybrids investigated, were analysed: *C. aurantium* (Fig. 3g, h) and *C. sinensis* cv. Pêra Vacinada (Fig. 3i). 'Pêra Vacinada' had the same banding pattern (2B + 2C + 7D + 7F) described for other cultivars of sweet orange (Pedrosa et al. 2000). The karyotype of *C. aurantium* (1A + 1B + 1C + 8D + 7F) was similar to that previously reported (1A + 2B + 1C + 7D + 7F, Guerra 1993) differing only by a second B chromosome with a faint proximal band, probably corresponding to an extra D observed here.

Figure 4 shows an idiogrammatic representation of all accessions. Homomorphic chromosome pairs were represented by a single chromosome and those that were heteromorphic were represented by a pair. Small variations in chromosome or band size were not represented. The chromosomes were ordered from the A to the F types, with F<sub>L</sub> pair at the end, and from the largest to the smallest. Chromosome and band size are only approximately represented.

## Discussion

Banding patterns are structural features of karyotypes which are well conserved through generations and in artificially induced hybrids. In maize, for example, different races are characterized by different banding patterns and hybrids between races with different banding pattern show the banding characteristic of both parents (Mastenbroek and De Wet 1983, Aguiar Perecin 1985). Among *Citrus* cultivars, conservation of banding patterns has previously been demonstrated in several accessions from *C. sinensis* (Guerra 1993, Matsuyama et al. 1996, Miranda et al. 1997b, Pedrosa et al. 2000). Mandarins, on the other hand, revealed a remarkable variation of CMA/DAPI banding patterns in the present work,

indicating a complex hybridization history. The difference in CMA banding variability between cultivars of *C. sinensis* and *C. reticulata* (sensu Swingle) is probably related to their selection process. Most sweet orange cultivars arose by spontaneous gene mutations, which do not affect the karyotype, whereas many mandarin cultivars were originated from hybridization, changing the karyotype through the introduction of alien chromosomes. Nevertheless, mandarin selections of the same cultivars, like ‘Montenegrina’ and ‘do Rio’, have very little genetic variability (Machado et al. 1996, Bretó et al. 2001) and the same karyotype.

#### *Chromosome banding variability among mandarins*

In the genus *Citrus*, at least five different chromosome types can be distinguished on the basis of CMA/DAPI banding. The original definition of these types, by Guerra (1993), was modified in this work, mainly because a new type was discovered (type E). The rarer types, A, B, C and E, can be used as marker chromosomes to identify most accessions.

Chromosome types D and F occur in two or more non-homologous chromosome pairs. The type C, although rare, may occur in at least two non-homologous chromosome pairs, since three of them were found in the chromosome complement of ‘Orlando’. Moreover, the small C chromosome of ‘Ponkan’ and ‘Page’ sometimes displayed a secondary constriction, which was not observed neither in other mandarin accessions nor in the two different-sized C chromosomes of *C. sinensis*. Miranda et al. (1997a) demonstrated that the 45S rDNA probe hybridizes with one of the bands of C chromosomes in *Fortunella crassifolia* but not in *C. sinensis*.

On the other hand, chromosomes A, B and F<sub>L</sub>, from different accessions, seemed to be true homeologues. The single pair of F<sub>L</sub>, easily identifiable in the karyotype of all accessions and in far related genera (Guerra et al. 2000), is certainly the same homeologous. Similarly, the A chromosomes of 'King' and 'Murcott' were very similar and may be homeologous, although three A chromosomes were found in the diploid complement of *C. grandis* (Guerra 1993, Befu et al. 2001). Type B chromosomes, found in different accessions with a secondary constriction associated with a proximal CMA<sup>+</sup> band, may also be homeologous. The size of this band varied, being very small in most accessions of mandarins, sweet orange and sour orange and larger in 'Clementine de Nules', 'Oneco', 'Murcott' and 'King'. This CMA<sup>+</sup> block most probably corresponds to a nucleolus organizer region since it co-localized, at least in *C. sinensis*, with 45S rDNA sites (Matsuyama et al. 1996, Miranda et al. 1997a, Pedrosa et al. 2000).

#### *Karyotype similarity in accessions with low heterozigosity*

The banding patterns of the mandarin accessions analysed here allow to separate them into four groups, according to the presence or absence of some marker chromosomes. The two single accessions of group I, 'Sunki' (*C. sunki*) and 'Cleopatra' (*C. reshni*), showing only chromosome types D and F and high homozygosity, contrast with the chromosomal diversity and heterogeneity of other groups. These cultivars or species are considered to be natives of South China and India, respectively, but they have many morphological characteristics in common, such as small, acid fruits, green embryos and polyembryonic seeds (Hodgson 1967). They also share biochemical and physiological similarities, like identical small and large subunits of rubisco (Handa et al. 1986) or tolerance to salty or highly calcareous soils

(Chapman 1968). Their low and similar heterozygosity index for RFLPs and isozymes is an indicative of non-hybrid origin (Federici et al. 1998). Herrero et al. (1996) attributed the very low heterozygosity of these species to their reproduction from seeds, since they are used as rootstock. Taxonomically, they were placed by Tanaka (1969, 1977) into the microsubgroup *Angustifolia*, and like many other mandarins, they have been merged into *C. reticulata* by most authors, mainly supported by Swingle (1943) and later by Scora (1975) and Barrett and Rhodes (1976). However, *C. reshni* was accepted as a valid species by Hodgson (1967) and *C. sunki* was one of the two mandarin species of Tanaka's system distinguished as a variety by Swingle (*C. reticulata* var. *austera*).

The group II was characterized by the presence of chromosome types C, D and F, lacking A and B. It includes the Mediterranean mandarins (*C. deliciosa*), represented here by 'Montenegrina', 'do Rio', 'Cravo' and 'Comum', with almost identical and homozygous karyotypes, except that 'Comum' was heterozygous for the C pair. The karyotype of 'Cravo' (formerly described from another sample by Guerra et al. 2000) suggests that it has a close proximity with the Mediterranean mandarins, but the history of this mandarin, widely cultivated in Brazil, is unknown. Group II also included 'Dancy', with two heterozygotic chromosome pairs but with the same chromosome types of this group. Handa et al. (1986), based on isoelectrofocusing of rubisco subunits, also grouped 'Cravo' and 'Dancy' with Mediterranean mandarins and separated them from 'Ponkan' and 'King'.

#### *High heterozygosity in accessions of hybrid origin*

All accessions of group III (without A chromosomes) seemed to be of hybrid origin. *C. depressa*, with a simple B and a C chromosomes, is most probably a hybrid, as supposed by

Swingle (1943). 'Clementine de Nules' is one of the many selections of *C. clementina*, a kind of mandarin also included by Swingle into *C. reticulata*. All cultivars of clementine mandarins are probably derived by bud mutation from a single plant (Bretó et al. 2001), presumably a hybrid between *C. deliciosa* and *C. aurantium* (Hodgson 1967), or between a mandarin and *C. sinensis* (Deng et al. 1996, Nicolosi et al. 2000). Both crosses are compatible with the karyotype described here.

'Oneco' and 'Batangas' had similar and heterozygous karyotypes. The former is assumed to be originated from seedlings of 'Ponkan' (Hodgson 1967), which is acceptable from the karyotype analyses. 'Page' is considered a kind of tangelo resulting from a cross between tangelo 'Minneola' (*C. paradisi* x *C. tangerina*) and clementine (*C. aurantium* x *C. deliciosa*). Considering that all four relatives are heterozygous for one or more chromosome pairs, the karyotype resulting from such a cross is particularly difficult to predict, although the chromosome constitution found in 'Page' is fairly compatible with one of the chromosome combinations expected for such a hybrid.

'Orlando' has a remarkable characteristic, rarely found in other known *Citrus* karyotypes: two small and one large C chromosome. The origin of 'Orlando' is attributed to a cross between the 'Duncan' grapefruit *C. paradisi* and the 'Dancy' mandarin *C. tangerina* (Davies and Albrigo 1994). Recently, Befu et al. (2001) described the karyotype of 'Duncan' as 2A + 1B + 1C + 6D + 8F (converted to the chromosome nomenclature used here). The absence of A chromosomes, found in homozygosity in 'Duncan', and the presence of three C chromosomes in 'Orlando' strongly support that a direct ancestry of 'Orlando' from *C. paradisi* x *C. tangerina* (1C + 12D + 5F) is not possible.

Group IV was only represented here by the putative hybrids 'King' and 'Murcott', characterized mainly by a heterozygous chromosome type A. Swingle (1967) assumed that 'King' was a natural hybrid between a mandarin orange (*C. sinensis* x *C. reticulata*) and a



pummelo, a sweet orange or a pummelo x sweet orange hybrid. Indeed, the karyotype of 'King' strongly suggests that it is hybrid including pummelo or a closely related germplasm as one of its ancestors, since chromosomes type A are common in pummelo and grapefruits (Guerra 1993, Befu et al. 2001). Similarly, 'Murcott' is supposed to be a tangor that arose accidentally in the USA (Davies and Albrigo 1994), although Hodgson (1967) commented that its origin is unknown and its history obscure. It is certainly a hybrid different from 'King' but also descending from a pummelo-like germplasm. Nicolosi et al. (2000) found some pummelo-hereditary markers in 'King' and 'Murcott' that could be related to the presence of the chromosome A.

#### *The putative ancestral karyotype of mandarins*

CMA banded chromosomes proved to be a very useful tool for carrying out a more comprehensive analysis of *Citrus* phylogeny. The results showed that most mandarin accessions are heterozygous and may be of hybrid origin. Since chromosomes type A and B were found only in a few mandarin hybrids and in the lime-lemon-citron-pummelo group (Guerra 1993, Befu et al. 2001), one can speculate that all mandarin karyotypes with these chromosome types are hybrids. Chromosomes type C, present in Mediterranean mandarins and in most other accessions, may be part of the original mandarin karyotype, but it may have arisen *de novo* once or more times in the genus. On the contrary, type E chromosome, found here only in *C. depressa*, seems to be restricted to a small group of mandarin species.

From the cytological point of view, the species of group I, with the simplest karyotype (only D and F chromosomes), and less probably the Mediterranean mandarins, with a simple and homozygous karyotype, seemed to be the best candidates to represent *C. reticulata* (*sensu*

Swingle) as a true species. According to Gmitter and Hu (1990), *C. sunki* grows in the wild in the province of Yunnan, southern China, together with two putative true species of modern citrus, *C. medica* and *C. grandis*, and some of the most primitive *Citrus* subgenus *Papeda*. These authors found a substantial portion of the *Citrus* gene pool represented in this region and suggested that the Yunnan area was a part of the primitive centre of origin of modern *Citrus* species. These data give additional support to the present hypothesis that *C. sunki* or a intimate relative may be the living mandarin closest to the original stock of *C. reticulata*.

The authors are grateful to Dr. Maria Puertas for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Brazilian agencies FACEPE, CNPq and CAPES.

## References

- Aguiar Perecin M. L. R. (1985) C-banding in maize. I. Band patterns. *Caryologia* 38: 23-30.
- Asíns M. J., Mestre P. F., Herrero R., Navarro L., Carbonell E. A. (1998) 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. *Syst. Bot.* 1: 105-136.
- Befu M., Kitajima A., Hasegawa K. (2001) Chromosome composition of some *Citrus* species and cultivars based on the chromomycin A (3) (CMA) banding patterns. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70: 83-88.
- Blondel L. (1978) Classification botanique des espèces du genre *Citrus*. *Fruits* 33: 695-720.

- Bretó M. P., Ruiz C., Pina J. A., Asíns M. J. (2001) The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21: 285-293.
- Cameron J. W., Frost H. B. (1968) Genetics, breeding and nucellar embryony in *Citrus*. In: Reuther W., Batchelor L. D., Webber H. J. (eds) *The Citrus Industry. Anatomy, physiology, genetics and reproduction*, vol II. University of California Press, Berkeley, pp 325-366.
- Chapman H. D. (1968) The mineral nutrition of *Citrus*. In: Reuter W, Batchelor LD, Webber HJ (eds) *The Citrus Industry. Anatomy, physiology, genetics and reproduction*, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 127-289.
- Coletta Filho H. D., Machado M. A., Targon M. L. P. N., Moreira M. C. P. Q. D. G., Pompeu Jr. J. (1998) Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102: 133-139.
- Davies F. S., Albrigo L. G. (1994) *Citrus*. *Crop Production Science in Horticulture* 2, CAB International, Wallingford.
- Deng Z. N., Gentile A., Nicolosi E., Continella G., Tribulato E. (1996) Parentage determination of some *citrus* hybrids by molecular markers. *Proc. Int. Soc. Citricul.* 2: 849-854.
- Esen A., Scora R. W. (1977) Amylase polymorphism in *Citrus* and some related genera. *Amer. J. Bot.* 64: 305-309.
- 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. *Theor. Appl. Genet.* 96: 812-822.
- Gmitter Jr. F. G., Hu X. (1990) The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (*Rutaceae*). *Econ. Bot.* 44: 267-277.

- Guerra M. (1985) Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin patterns. *Caryologia* 38: 335-346.
- Guerra M. (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71: 234-241.
- Guerra M., 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. *Braz. J. Genet.* 20: 489-496.
- 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. *Amer. J. Bot.* 87: 735-747.
- Handa T., Ishizawa Y., Oogaki C. (1986) Phylogenetic study of Fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. *Jpn. J. Gen.* 61: 15-24.
- Herrero R., Asíns M. J., Carbonell E. A., Navarro L. (1996) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92: 599-609.
- Hodgson R. W. (1967) Horticultural varieties of *Citrus*. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) *The Citrus Industry. History, world distribution, botany and varieties*, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 431-591.
- Machado M. A., Colleta Filho H. D., Targon M. L. P. N., Pompeu Jr. J. (1996) Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica* 92: 321-326.
- Mastenbroek I., De Wet J. M. J. (1983) Chromosome C-banding of *Zea mays* and its closest relatives. *Can. J. Genet. Citol.* 25: 203-209.

- 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. (1997a) 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. (1997b) Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosome. *Chrom. Res.* 5: 86-92.
- Moore G. A. (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet.* 17: 536-540.
- 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. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155-1166.
- 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.
- Roose M. L., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J. S. (1998) The chromosomes of *Citrus* and *Poncirus* species and hybrids: Identification of characteristic chromosomes and physical mapping of rDNA loci using *in situ* hybridization and fluorochrome banding. *J. Hered.* 89: 83-86.
- Scora R. W. (1975) IX. On the history and origin of *Citrus*. *Bull. Torrey. Bot. Club.* 102: 369-375.
- Schweizer D., Ambros P. F. (1994) Chromosome banding. In: Gosden JR (ed) *Methods in molecular biology*, vol. 29, Chromosome analysis protocols, Humana Press, Totowa, pp 97-113.

- Swingle W. T. (1943) The botany of *Citrus* and its wild relatives in the orange subfamily. In: Reuther W, Weber HJ, Batchelor DL (eds) The *Citrus* industry. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 128-474.
- Swingle W. T. (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) The *Citrus* Industry. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 190-430.
- Tanaka T. (1969) Misunderstanding with regard to *Citrus* classification and nomenclature. Bull Uni Osaka. Pref. Ser. B. 21: 139-145.
- Tanaka T. (1977) Fundamental discussion of *Citrus* classification. Stud. Citrol. 14: 1-6.

Addresses of the authors: Maria Tereza Marquim Nogueira Cornélio, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, 50.100-130, Recife-PE, Brazil. Aguaracy Roseane da Silva Figueirôa ([arfigueiroa@bol.com.br](mailto:arfigueiroa@bol.com.br)), Karla Galvão Bezerra dos Santos ([ksantos@gwdg.de](mailto:ksantos@gwdg.de)), Reginaldo de Carvalho ([rc@ufpe.br](mailto:rc@ufpe.br)), Dr. Marcelo Guerra ([mguerra@ufpe.br](mailto:mguerra@ufpe.br)), Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420, Recife-PE, Brazil. Dr. Walter dos Santos Soares Filho ([wsoares@cnpmf.embrapa.br](mailto:wsoares@cnpmf.embrapa.br)), Embrapa Mandioca e Fruticultura, 44.380-000 Cruz das Almas-BA, Brazil.

**Table 1.** List of accessions analysed of mandarins, mandarin hybrids and related species. Species names according to Tanaka (1969).

Species	Cultivar	Number of individuals	Karyotype formula
Mandarins			
<i>Citrus clementina</i> Hort. ex Tan.	‘Clementine de Nules’	6	1B+1C+11D+5F
<i>C. deliciosa</i> Ten.	‘Montenegrina’	7	2C+10D+6F
	‘do Rio’	4	2C+10D+6F
	‘Comum’	5	2C+10D+6F
<i>C. depressa</i> Hayata	‘Shiikuwashá’	4	1B+1C+10D+2E+4F
<i>C. nobilis</i> Lour.	‘King’	7	1A+1B+1C+10D+5F
<i>C. reticulata</i> Blanco	‘Batangas’	4	1B+1C+10D+6F
	‘Cravo’	8	2C+10D+6F
	‘Oneco’	3	1B+1C+9D+7F
	‘Ponkan’	5	1B+2C+11D+4F
<i>C. reshni</i> Hort. ex Tan.	‘Cleopatra’	8	14D+4F
<i>C. sunki</i> Hort. ex Tan.	‘Sunki’	3	14D+4F
<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.	‘Dancy’	3	1C+12D+5F
Hybrids			
( <i>C. paradisi</i> Macf. x <i>C.</i>	‘Page’	4	2B+1C+10D+5F

*tangerina* Hort. ex Tan.) x *C.*

*clementina* Hort. ex Tan.

*C. sinensis* (L.) Osb. x *C.*

*reticulata* Blanco 'Murcott' 6 1A+1B+10D+6F

*C. paradisi* Macf. x *C. tangerina*

Hort. ex Tan. 'Orlando' 4 1B+3C+7D+7F

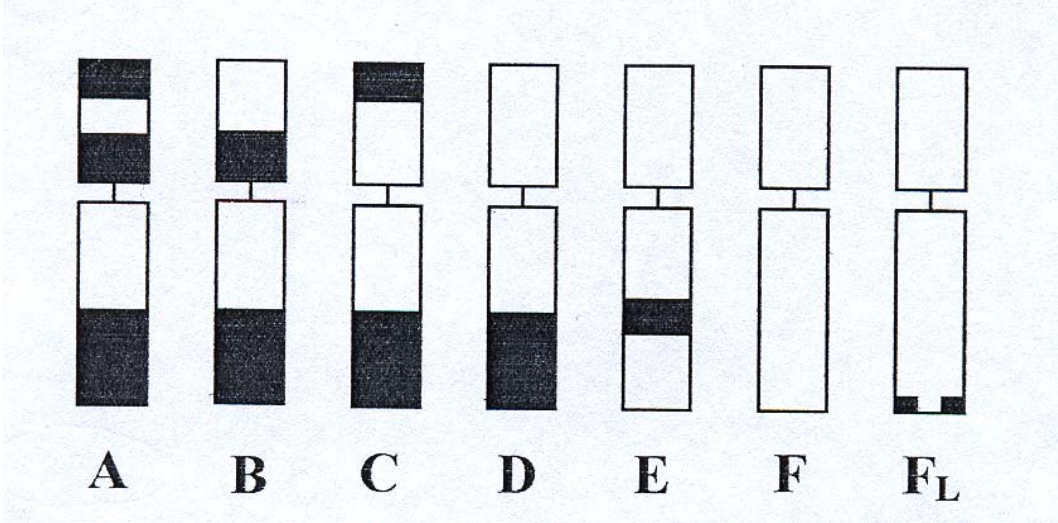
Other species

*C. aurantium* L. unknown 5 1A+1B+1C+8D+7F

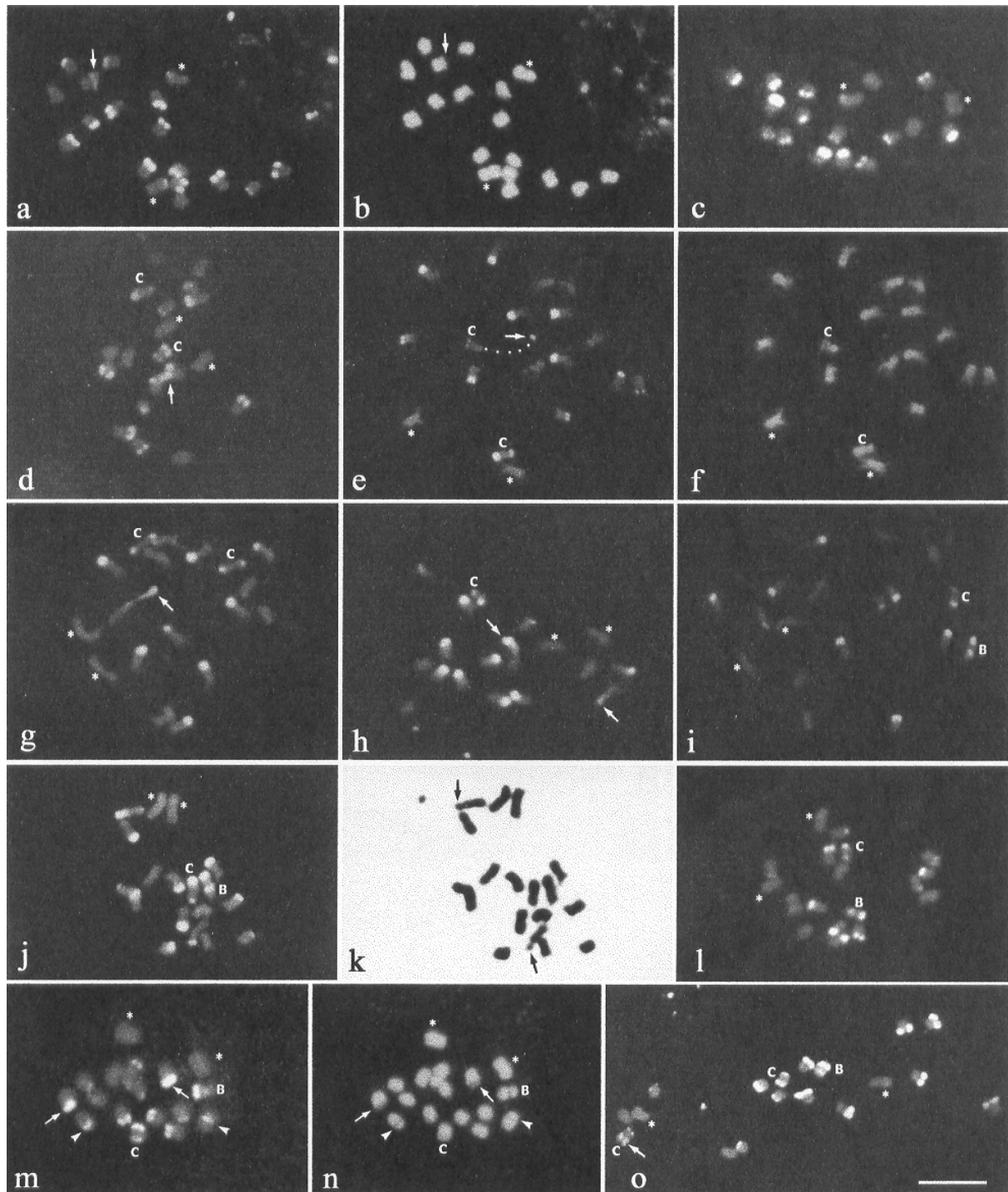
*C. sinensis* (L.) Osb. 'Pêra Vacinada' 7 2B+2C+7D+7F

---

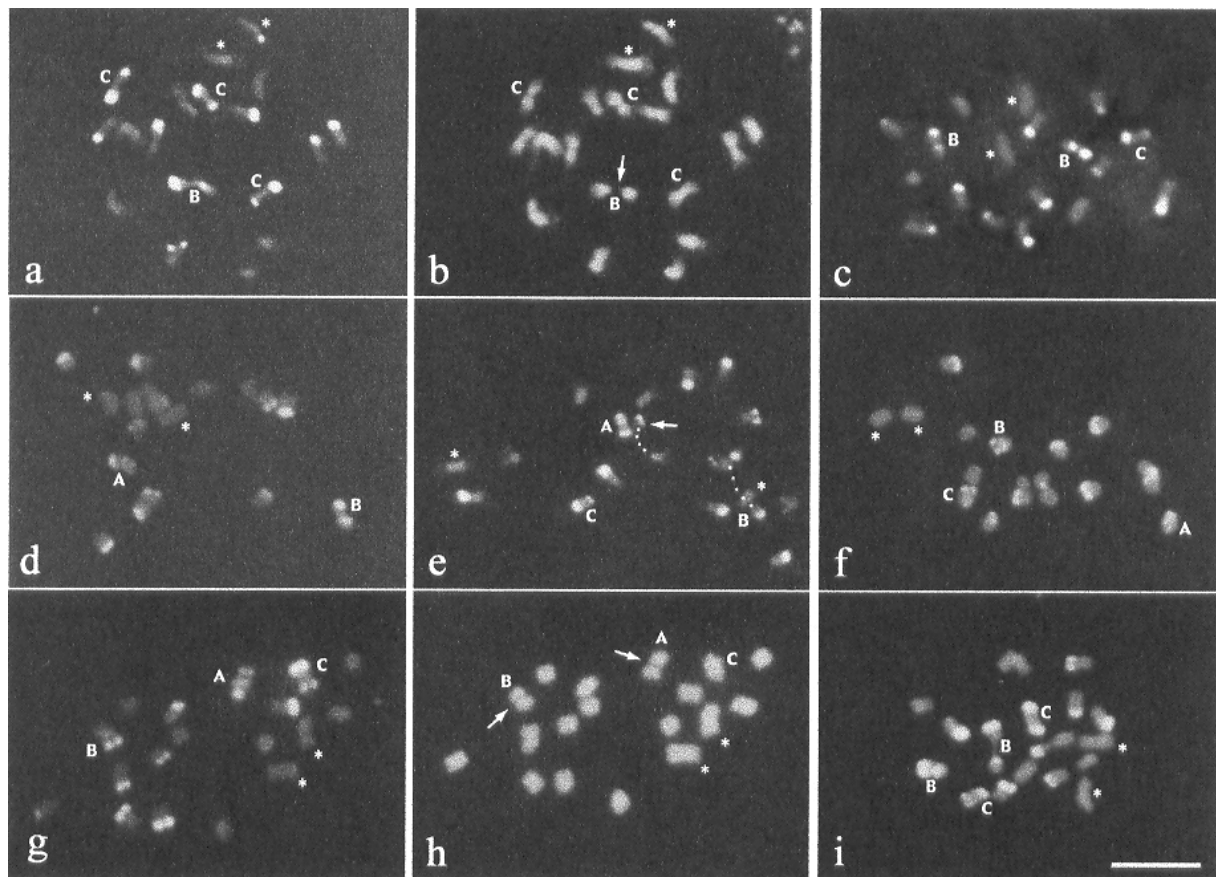




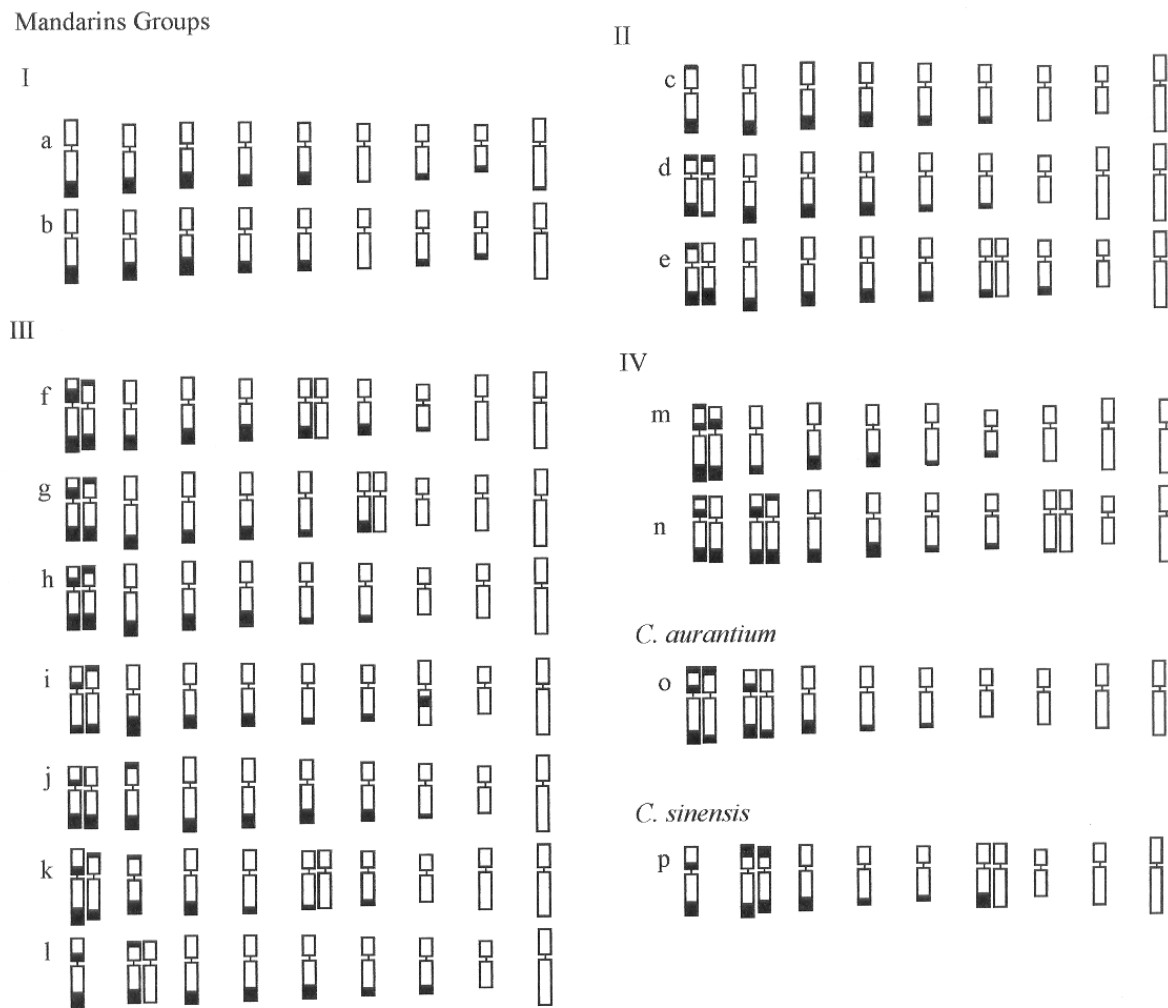
**Figure 1.** Chromosome types found in *Citrus* species, according to the position of CMA<sup>+</sup> bands.



**Figure 2.** Chromosome complements of mandarin and hybrid cultivars stained with CMA (**a, c-j, l-o**); DAPI (**b, f, n**) and Giemsa (**k**). **a** and **b** 'Sunki'; **c** 'Cleopatra'; **d** 'Montenegrina'; **e** and **f** 'Comum'; **g** 'Cravo'; **h** 'Dancy'; **i** 'Oneco'; **j** and **k** 'Clementina'; **l** 'Batangas'; **m** and **n** 'Shiikuwashá'; **o** 'Ponkan'. Arrows point large CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> bands **d, m** and **n** or satellites **e, g, h, k** and **o**. Arrowheads in **m** and **n** point CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> interstitial regions in E chromosomes. Chromosome types A, B, and C are indicated by letters. F<sub>L</sub> type chromosomes are marked by asterisks. The bar in **o** corresponds to 5µm.



**Figure 3.** Chromosome complements of some mandarins and related species stained with CMA (**a**, **c-g** and **i**) and DAPI (**b** and **h**). **a** and **b** 'Orlando'; **c** 'Page'; **d** 'Murcott'; **e** and **f** 'King'; **g** and **h** *C. Aurantium*; **i** *C. sinensis* 'Pêra Vacinada'. Arrow and dots in **e** show one satellite and two secondary constrictions, respectively. Arrows in **b** and **h** indicate DAPI proximal bands. Chromosome types A, B, and C are indicated by letters.  $F_L$  type chromosomes are marked by asterisks. The bar in **i** corresponds to 5 $\mu$ m.



**Figure 4.** Idiograms with banding patterns of all accessions analysed. The mandarins and hybrids were grouped according to their banding patterns. Group I: **a** ‘Sunki’ and **b** ‘Cleopatra’. Group II: **c** ‘Montenegrina’; ‘do Rio’ and ‘Cravo’; **d** ‘Comum’ and **e** ‘Dancy’. Group III: **f** ‘Clementine de Nules’; **g** ‘Oneco’; **h** ‘Batangas’; **i** ‘Shiikuwashá’; **j** ‘Ponkan’; **k** ‘Orlando’ and **l** ‘Page’. Group IV: **m** ‘Murcott’ and **n** ‘King’. **o** *C. aurantium* and **p** *C. sinensis* cv. Pêra Vacinada. Homomorphic homologous chromosomes are represented by a single chromosome, heteromorphic homologous chromosomes are represented as a pair.

## **5. Capítulo 2**

### **Evidências citológicas da origem híbrida das limas e limões diplóides e suas relações com cidras e pomelos**

Artigo a ser submetido à revista *Chromosome Research*

---

---

## **Evidências citológicas da origem híbrida das limas e limões diplóides e suas relações com cidras e pomelos**

R. Carvalho<sup>1</sup>, W.S. Soares Filho<sup>2</sup> & M. Guerra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420, Recife, PE, Brasil; E-mail: mguerra@ufpe.br;* <sup>2</sup>*Embrapa Mandioca e Fruticultura, 44.380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil*

*Key words:* *Citrus*, Heterocromatina, CMA/DAPI, FISH, Meristema Apical

### **Resumo**

O padrão de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> e a localização dos sítios de DNAr 5S e 45S de 14 acessos do grupo lima-limão-cidra-pomelo foram investigados visando identificar as relações de similaridade cariotípica dentro desse grupo. Foram encontrados os mesmos tipos cromossômicos conhecidos anteriormente em laranjas e tangerinas, além de um tipo com duas bandas na região do braço longo em *C. aurantifolia*. As quatro cultivares analisadas de *C. limon* mostraram um mesmo padrão de bandas e sítios de DNAr, sugerindo que se tratem de um único germoplasma diferenciado em cultivares por meio de mutações somáticas. Igualmente as duas cultivares investigadas de *C. paradisi*, ‘Marsh Seedless’ e ‘Henderson’, apresentaram o mesmo padrão de bandas. Os limões *C. jambhiri*, *C. limonia* e *C. volkameriana* apresentaram cariótipo muito semelhante entre si. *Citrus limon* diferenciou-se desses limões pela presença de um cromossomo C, mas todos pareceram relacionados a *C.*

*medica*, principalmente pela presença de um cromossomo tipo B muito semelhante. Curiosamente, a cultivar ‘Ponderosa’, tida como um limão, foi claramente relacionada aos pomelos pela presença de dois cromossomos do tipo A característicos desses acessos. As limas, *C. aurantifolia* e *C. limettioides*, pareceram também relacionadas a *C. medica*, tanto pelo padrão de bandas CMA quanto pela distribuição dos sítios de DNAr, embora menos proximamente que os limões. A presença de um tipo cromossômico em *C. aurantifolia* desconhecido nos demais acessos sugere que essa espécie pode ser derivada de um híbrido com algum germoplasma estranho ao subgênero. A análise da distribuição dos sítios de DNAr permitiu refinar a comparação entre os acessos. *Citrus grandis* e *C. medica* foram os únicos acessos homocigotos deste grupo, suportando a hipótese de que essas últimas seriam duas das três ou quatro espécies verdadeiras do subgênero *Citrus*, enquanto os demais acessos seriam híbridos.

## **Introdução**

As espécies de *Citrus* (L.) têm sido alvo de numerosos estudos agrônômicos, taxonômicos e evolutivos. Os limões (diversas espécies) e as limas, doce (*C. limettioides* Tan.) e ácidas (*C. aurantifolia* Christm. Swing.) ocupam lugar de destaque entre as frutas cítricas, principalmente por seu sabor, aroma agradável e elevado conteúdo de vitamina C. A taxonomia do gênero, entretanto, é particularmente conflitante, variando o número de espécies aceitas desde 16 (Swingle 1967) até 162 espécies (Tanaka, 1977). No sistema de classificação de Swingle os limões e as limas estão representados por apenas duas espécies, *C. limon* (L.) Burm. f. e *C. aurantifolia*, enquanto no sistema de Tanaka são incluídas 34 espécies, a maioria delas como limões. Essa diferença nos sistemas de classificação parece estar

associada a algumas características reprodutivas do grupo, principalmente as fracas barreiras de isolamento reprodutivo entre as espécies e o fenômeno da embriogênese nucelar, que assegura uma reprodução vegetativa intensa na maioria das espécies. Além disso, a extensa história de cultivo dessas espécies resultou na formação de numerosos híbridos artificiais e na seleção de diversas mutações somáticas espontâneas (Barrett & Rhodes 1976; Moore 2001). Mais recentemente, tem havido uma tendência a considerar as espécies de *Citrus* como híbridos derivados de cruzamentos entre três espécies básicas (cidra *C. medica* L., tangerina *C. reticulata* Blanco. e toranja *C. grandis* (L.) Osbeck), ou entre essas e espécies do subgênero *Papeda* ou de gêneros proximamente relacionados (Scora 1975; Barrett & Rhodes 1976; Moore 2001).

Em geral, os limões, apresentam baixa variabilidade genotípica entre suas espécies e alta heterozigose, sugerindo uma origem híbrida (Malik *et al.* 1974; Torres *et al.* 1982; Herrero *et al.* 1996). De acordo com Swingle (1967), os limões verdadeiros, *C. limon*, constituiriam uma espécie de validade duvidosa, enquanto os demais limões seriam de origem híbrida. Dados bioquímicos (Malik *et al.* 1974) e moleculares (Roose *et al.* 1998; Nicolosi *et al.* 2000), no entanto, sugerem que todos os limões seriam híbridos e indicam *C. medica* como uma das espécies ancestrais das limas e limões. Igualmente as toranjas (*C. grandis* L. Osb.)constituem um grupo antigo e muito diversificado, destacando-se o pomelo (*C. paradisi* Macf.), um possível híbrido entre *C. grandis* e *C. sinensis* (L.) Osb., de grande valor comercial (Swingle 1967; Hodgson 1967).

Baseados na diversidade de isoenzimas de 198 cultivares de *Citrus* e gêneros próximos e apoiados por diversas análises anteriores, Asíns *et al.* (1998) reconheceram duas grandes linhas evolutivas entre os citros de maior interesse agrônômico: uma constituída pelas laranjas e tangerinas, e outra, formada por um grupo maior, reunindo as limas, limões, cidra e pomelos. A existência de uma estreita proximidade entre as espécies e híbridos do primeiro



grupo foi recentemente comprovada por Cornélio *et al.* (2003) com base na variabilidade cromossômica. Essa análise revelou que apenas dois grupos de tangerinas apresentaram homozigose quanto aos padrões de bandas cromossômicas, enquanto as demais tangerinas, laranja-doce e laranja-azedada eram heterozigotas e provavelmente híbridas.

A análise da variabilidade cariotípica dessas espécies tem se mostrado particularmente reveladora das relações entre elas. Apesar de apresentarem número cromossômico constante  $2n=18$ , com tamanho e morfologia cromossômica semelhantes (Guerra *et al.* 1997, 2000), as espécies de *Citrus* e gêneros afins apresentam alta variabilidade na quantidade e localização dos blocos de heterocromatina. A dupla coloração com os corantes fluorescentes cromomicina  $A_3$  (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) demonstrou numerosas bandas  $CMA^+/DAPI^-$  e um padrão semelhante ao do bandeamento C (Guerra 1985, 1993). Diversos trabalhos têm comprovado que o bandeamento com cromomicina  $A_3$  apresenta melhor repetibilidade de resultados e menor alteração nos cromossomos que o bandeamento C, permitindo uma clara diferenciação entre a maioria dos acessos investigados (Guerra 1993; Miranda *et al.* 1997a, b; Roose *et al.* 1998; Befu *et al.* 2000, 2001; Cornélio *et al.* no prelo). Estudos iniciais do padrão de bandas CMA em limas, limões, cidra, pomelo e toranja revelaram alta quantidade de heterocromatina, principalmente nas regiões terminais, além de heterozigidade em pelo menos um par cromossômico (Guerra 1993; Befu *et al.* 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre 14 acessos do grupo lima-limão-cidra-pomelo através do padrão de bandas CMA/DAPI e da localização *in situ* de sítios de DNAr 5S e 45S, visando identificar quais cromossomos poderão ser usados como marcadores nesses acessos. Os resultados mostraram que, nesse grupo, apenas *C. medica* e *C. grandis* são homozigotas, em relação aos tipos cromossômicos, suportando a hipótese de que essas

espécies, juntamente com algumas tangerinas, podem estar entre as espécies básicas do subgênero *Citrus*.

## **Materiais e Métodos**

Preparações citológicas de 14 acessos de *Citrus* foram feitas a partir do meristema apical de brotos foliares obtidos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Foram analisados os seguintes materiais: *Citrus aurantifolia* Swing. (limão ‘Galego’), *C. grandis* Osb. (toranja ‘Israel’), *C. jambhiri* Lush. (limão ‘Rugoso Mazoe’), *C. limettioides* Tan. (‘Lima doce da Palestina’), *C. limon* (L.) Burm. f. (limão ‘Eureka IPEACS’, ‘Fino’, ‘lisboa’ e ‘Siciliano’), *C. limonia* Osb. (limão ‘Cravo Santa Cruz’), *C. medica* L. (cidra ‘Ethrog’), *C. medica* x *C. limon* (limão ‘Ponderosa’), *C. paradisi* Macf. (pomelo ‘Marsh seedless’ e ‘Henderson’) e *C. volkameriana* Ten. et. Pasq. (limão ‘Volkameriano’).

Para análise mitótica, brotos foliares foram pré-tratados com 2 mM de 8-hidroxiquinoleína a 8 °C por 24 h, fixados em etanol-ácido acético (3:1, v/v) por 2-24 h à temperatura ambiente e estocados a -20 °C. As lâminas foram preparadas por digestão enzimática em solução de celulase 2% (Sigma) e pectinase 20% (Sigma) a 37 °C por 2 h. O material foi esmagado em uma gota de ácido acético 45%, congelado em nitrogênio líquido para remoção da lamínula e deixado secar ao ar.

### *Dupla coloração com CMA/DAPI*

A coloração com os fluorocromos CMA e DAPI foi feita de acordo com Schweizer & Ambros (1994). Lâminas envelhecidas, por três dias, foram coradas com CMA (0,5 mg/ml)

por 1h, em seguida coradas com DAPI (1 µg/ml) por 1/2 h e montadas em glicerol: tampão McIlvaine 1:1 (v/v), pH 7,0, contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. As lâminas foram envelhecidas por mais três dias antes da análise em microscópio de epifluorescência Leica DMLB.

### *Hibridização in situ*

Para localizar os sítios de DNAr 45S foram utilizadas as sondas SK18S e SK25S, contendo fragmentos do DNA ribossomal 18S e 25S, respectivamente, obtidos originalmente de *Arabidopsis thaliana* L. (Unfried *et al.* 1989; Unfried & Gruendler 1990) e gentilmente cedidas pelo Prof. Dieter Schweizer, da Universidade de Viena. As sondas foram marcadas com biotina-11-dUTP (Sigma) por *nick translation*. O DNAr 5S foi obtido por PCR, a partir do DNA genômico de *Passiflora edulis* Sims. ou *C. aurantifolia* Swing., utilizando-se os iniciadores de síntese 5'-GTG CGA TCA TAC CAG C(A/G)(G/T)TAA TGC ACC GG-3' e 5'-GAG GTG CAA CAC GAG GAC TTC CCA GGA GG-3', e simultaneamente marcado com digoxigenina 11-dUTP.

O procedimento e as condições de hibridização *in situ* foram feitos como descrito por Moscone *et al.* (1996). As sondas foram adicionadas numa mistura de hibridização, a uma concentração final de 1,2 a 3,0 ng/µl, contendo 60% de formamida, 5% de dextran sulfato e 0,1 µg/µl de esperma de salmão em 2xSSC. A mistura de hibridização e as preparações citológicas foram desnaturadas a 75°C por 10 min e hibridizadas por 18-20 h a 37°C em câmara úmida. O DNAr 45S foi detectado com o anticorpo monoclonal anti-biotina produzido em rato (Dakopatts nº M743) e visualizado com um anticorpo secundário produzido em coelho, conjugado ao tetrametil-rodamina-isotiocianato (TRITC) (Dakopatts nº R270). A sonda de DNAr 5S foi detectada com anticorpo anti-digoxigenina produzido em ovelha conjugado com fluoresceína-isotiocianato (FITC) (Boehringer Mannheim nº 1207741) e o

sinal amplificado com anticorpo secundário produzido em coelho conjugado com FITC (Dakopatts F135, DAKO). As lâminas foram contracoradas com 2 µg/ml de DAPI, lavadas rapidamente em 2xSSC e montadas em meio Vectashield H-1000 (Vector Labs).

As células foram analisadas em microscópio de epifluorescência Leica DMLB e capturadas através do software Leica Qfish, utilizando uma câmera de vídeo Cohu-CCD, ou fotografadas com filme T-MAX ASA 400 da Kodak, copiadas em papel Kodak Kodabromide F3.

## Resultados

### *Características gerais das bandas CMA<sup>+</sup> e sítios ribossomais*

A análise dos cromossomos corados com CMA/DAPI mostrou sempre bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> e nenhuma banda DAPI<sup>+</sup>. As bandas CMA<sup>+</sup> localizaram-se, em sua maioria, nas regiões terminais e nos braços longos, e menos freqüentemente nas regiões intercalares e proximais.

Os cromossomos foram classificados em sete tipos, incluindo os seis propostos por Cornélio *et al.* (no prelo) e mais um tipo G não descrito anteriormente, mostrando uma banda terminal e outra subterminal no braço longo (Figura 1). O tipo F<sub>L</sub> é uma variante do tipo F, caracterizado por ser um dos maiores cromossomos do cariótipo, podendo se apresentar sem banda (F<sub>L</sub><sup>0</sup>) ou com uma pequena banda (F<sub>L</sub><sup>+</sup>), geralmente muito fraca, no telômero do braço longo de um dos homólogos. Em alguns cromossomos do tipo D a região heterocromática foi subterminal, visível principalmente quando observada pela coloração DAPI. Essa variação, no entanto, foi de reconhecimento mais difícil e por isso foi conservada dentro do tipo D. A Figura 2 mostra um idiograma de cada acesso analisado, com os cromossomos organizados do

tipo A ao tipo F e do maior para o menor. O cromossomo G foi pareado com o maior dos cromossomos tipo F. No caso dos pares heteromórficos, foram representados os dois homólogos, e nos homomórficos, apenas um.

Os cromossomos do tipo D e F foram os mais freqüentes, enquanto os tipos A, B e C foram mais raros e por isso foram utilizados como marcadores para os acessos. O tipo G foi encontrado apenas em *C. aurantifolia*. Com exceção de *C. medica* e *C. grandis*, que apresentaram homozigose em relação aos tipos cromossômicos, os demais acessos apresentaram pelo menos um par de cromossomos heteromórficos. Foi também observado heteromorfismo no tamanho das bandas em todos os acessos.

O cromossomo tipo A foi encontrado apenas em *C. paradisi*, *C. grandis* e no limão 'Ponderosa', mostrando heterozigose em relação ao tamanho das bandas proximal e terminal do braço curto. Todos os acessos apresentaram pelo menos um cromossomo do tipo B, sempre com a banda CMA<sup>+</sup> proximal menor que a terminal. No cromossomo C, encontrado apenas em *C. limon*, *C. paradisi*, *C. grandis* e em 'Ponderosa', a banda CMA<sup>+</sup> do braço curto foi menor que a do braço longo (Figura 3).

A hibridização *in situ* com sondas de DNAr 45S mostrou que as bandas CMA<sup>+</sup> proximais observadas nos cromossomos A e B corresponderam sempre a sítios de DNA ribossomal. Os demais sítios de DNAr 45S foram geralmente localizados em regiões CMA<sup>+</sup> de cromossomos tipo D, referido como D/45S. Excepcionalmente foram encontrados sítios muito pequenos na região eucromática de dois cromossomos de *C. volkameriana* e *C. jambhiri*. As seqüências de DNAr 5S foram detectadas sempre na eucromatina de cromossomos do tipo D, podendo ocorrer na região oposta à banda CMA<sup>+</sup> (D/5S) ou vizinhas ao sítio de DNAr 45S (D/5S-45S) (Figura 4).

### Caracterização cariotípica dos acessos

*Citrus jambhiri*, *C. limonia* e *C. volkameriana* apresentaram cariótipos muito semelhantes entre si ( $1B + 11D + 4F + 2F_L^0$ ), tendo um ou dois cromossomos D com uma banda subterminal (Figura 3a-f). As quatro cultivares de *C. limon* analisadas, Eureka IPEACS, Lisboa, Fino e Siciliano, também apresentaram a mesma fórmula cariotípica ( $1B + 1C + 9D + 5F + 2F_L^+$ ) (Figuras 2a-c e 3g). Todos esses acessos apresentaram dois sítios de DNAr 45S, em um cromossomo B e em um D, e dois sítios de DNAr 5S ( $1D/5S$  e  $1D/5S-45S$ ). *C. volkameriana* e *C. jambhiri*, entretanto, apresentaram ainda dois sítios extras, muito pequenos, de DNAr 45S em dois cromossomos, um do tipo D e outro do tipo F (Figura 4b, f).

*Citrus aurantifolia*, com fórmula cariotípica  $2B + 10D + 5F + 1G$  mostrou cromossomos do tipo B heteromórficos, tendo o maior B as maiores bandas. O cromossomo tipo G, um dos maiores do cariótipo, apresentou a banda telomérica em forma de um ponto mediano, provavelmente resultante da associação da heterocromatina terminal das duas cromátides (Figura 3h). Apenas um dos cromossomos  $F_L$  foi claramente identificado, enquanto o outro homólogo pode estar representado pelo cromossomo tipo G. Dois ou três cromossomos D pareceram ter bandas subterminais. Foram observados três sítios de DNAr 45S (2B e 1D) e dois sítios de DNAr 5S ( $1D/5S$  e  $1D/5S-45S$ ) (Figuras 2e e 4i, j).

*Citrus limettioides* apresentou a fórmula cariotípica  $2B + 10D + 4F + 2F_L^+$ , destacando-se um par de cromossomos do tipo B fortemente heteromórfico, tanto em relação ao tamanho desses cromossomos quanto ao de ambas as bandas  $CMA^+$ . A banda proximal do B maior foi encontrada freqüentemente distendida, enquanto no B menor essa descondensação não foi observada. Entre os cromossomos D dois deles pareceram ter a banda  $CMA^+$  subterminalmente localizada (Figura 3j). Este acesso apresentou três sítios de DNAr 45S, três maiores (2B e 1D) e dois sítios de DNAr 5S ( $1D/5S$  e  $1D/5S-45S$ ) (Figuras 2f e 4l).

Em *C. medica* ( $2B + 8D + 6F + 2F_L^0$ ), ao contrário de *C. limettioides* e *C. aurantifolia*, os cromossomos do tipo B foram de igual tamanho. Um par de cromossomos D mostrou bandas subterminais (Figura 3k). Foram observados dois sítios de DNAr 45S em cromossomos B e dois sítios de DNAr 5S em cromossomos D/5S (Figuras 2g e 4n).

*Citrus grandis* ( $2A + 2B + 2C + 4D + 6F + 2F_L^+$ ) também apresentou homozigose para os tipos cromossômicos, diferindo no tamanho das bandas dos homólogos A e no tamanho dos homólogos do tipo C (Figuras 2h e 3l,m). Algumas diferenças muito pequenas observadas entre os homólogos não foram representadas no idiograma da Figura 2. Em *C. paradisi*, as cultivares Henderson e Marsh Seedless apresentaram a mesma fórmula cariotípica ( $2A + 1B + 3C + 7D + 3F + 2F_L^0$ ). O maior cromossomo do tipo C apresentou a banda do braço curto menor que a banda do braço longo (Figura 2i e 3n). Na cultivar Henderson foram observados quatro sítios de DNAr 45S (2A, 1B e 1D) e dois sítios de DNAr 5S (1D/5S e 1D/5S-45S) (Figura 4o). Na cultivar Ponderosa ( $2A + 1B + 1C + 6D + 6F + 2F_L^0$ ) o único cromossomo C apresentou uma das bandas duas ou três vezes maior que a outra e maior que a dos cromossomos D (Figuras 2j e 3p). Foram observados três sítios de DNAr 45S (2A e 1B) e dois de DNAr 5S em cromossomos D/5S (Figura 4p).

## Discussão

### *Características estruturais dos cariótipos do grupo*

O padrão de bandas  $CMA^+/DAPI^-$  do grupo de limão-lima-cidra-pomelo mantém as características básicas do gênero *Citrus* descritas inicialmente por Guerra (1993). Um tipo cromossômico diferente dos observados anteriormente, com duas bandas no braço longo, foi

encontrado em *C. aurantifolia*. Esse cromossomo pode ter se originado de uma inversão subterminal compreendendo parte da eucromatina e heterocromatina de um cromossomo D ou do surgimento de um bloco heterocromático subterminal em um cromossomo  $F_L$  com uma pequena banda  $CMA^+$  terminal. Esta última hipótese é mais provável, uma vez que apenas nesse acesso o par  $F_L$  não foi claramente identificado. O fato de que esse tipo cromossômico não foi observado em outros representantes de *Citrus* ou em gêneros próximos (Guerra *et al.* 2000) sugere que o tipo G seja uma variante mais recente, da mesma maneira que o tipo E, encontrado apenas em *C. depressa* (Cornélio *et al.* 2003). Por outro lado, espécies do subgênero *Papeda* podem estar envolvidas na origem de *C. aurantifolia*, uma vez que o cromossomo tipo G foi encontrado em *C. webberi* West. e *C. hystrix* D.C. (dados não publicados).

Os cariótipos de alguns acessos aqui analisados foram previamente descritos por Guerra (1993), geralmente a partir de plantas provenientes de jardins botânicos. A identificação taxonômica constante nesses materiais não foi checada e vários deles parecem erroneamente identificados, o que explica a divergência em relação aos dados do presente trabalho. Portanto, esses primeiros padrões de bandas, embora possam estar corretos, como no caso de *C. sinensis*, não devem ser considerados.

Os padrões de bandas  $CMA^+$  da maioria dos acessos analisados revelaram heteromorfismo para os tipos cromossômicos, exceto em *C. grandis* e *C. medica*. A homozigose observada nestas duas espécies não foi total, havendo pequenas alterações no tamanho cromossômico ou no tamanho das bandas. As duas cultivares de *C. grandis* analisadas por Befu *et al.* (2001) apresentaram 3A e 3C, diferindo, portanto, do cariótipo encontrado no presente trabalho (2A, 2B e 2C). É conhecido que *C. grandis* possui numerosas cultivares e variedades e um polimorfismo intraespecífico grande (Swingle 1967; Hodgson



1967), o que poderia justificar essa variação. Por outro lado, a cultivar de *C. medica* analisada por esses autores teve um padrão de bandas idêntico ao da presente análise.

Estudos anteriores haviam revelado que várias cultivares de *C. sinensis* e tangerinas apresentavam cariótipos heteromórficos para os tipos cromossômicos, com exceção de dois grupos de tangerinas: *C. reshni* e *C. sunki*, com 14D e 4F, e *C. deliciosa* e a cultivar ‘Cravo’, com 2C, 10D e 6F (Pedrosa *et al.* 2000; Cornélio *et al.* no prelo). Considerando que o heteromorfismo para tipos cromossômicos deve ser maior em híbridos que em espécies puras é possível que esses dois estoques de tangerina, juntamente com *C. grandis* e *C. medica*, representem as espécies verdadeiras de *Citrus*, as quais, por hibridização e retrocruzamentos, teriam originado todos os demais acessos do subgênero *Citrus*, como proposto por diversos autores (revisado por Moore 2001).

A hibridização *in situ* revelou que a banda CMA<sup>+</sup> proximal de todos os cromossomos A ou B, além da banda CMA<sup>+</sup> de um ou dois cromossomos D da maioria dos cariótipos, são constituídas de DNAr 45S. As demais bandas CMA<sup>+</sup> provavelmente são constituídas por algum tipo de DNA satélite que também apresenta grande afinidade pela cromomicina A<sub>3</sub>. Fann *et al.* (2001) demonstraram a ocorrência, em espécies de *Citrus* e *Poncirus*, de uma seqüência de DNA satélite com monômeros de 181 pb e conteúdo de GC variando entre 60% e 68% entre si. Como a cromomicina A<sub>3</sub> apresenta maior afinidade por DNA rico em GC (Schweizer & Ambros 1994) é provável que esta seqüência esteja distribuída nas bandas CMA<sup>+</sup> que não apresentam DNAr. Curiosamente, dois sítios menores foram observados na região eucromática de algumas cultivares. Isso pode se dever ao tamanho do bloco de DNAr ter sido muito pequeno para ser detectado com CMA ou a uma diferença estrutural que resultou em uma coloração neutra com CMA (ver Guerra 2000; Cornélio *et al.* 2003).

Dois sítios de DNAr 5S foram visualizados em todos os acessos, geralmente em heterozigose, sendo um deles adjacente ao DNAr 45S de um cromossomo D (D/5S-45S) e o

outro localizado na extremidade eucromática oposta à banda de outro cromossomo D (D/5S). Entre os acessos analisados, apenas *C. medica* foi homozigota para o cromossomo D/5S. Com isso, *C. medica* pode ter sido um dos pais e o doador desse cromossomo para todos esses acessos.

### *O cariótipo dos limões*

A origem dos limões é desconhecida, mas muito provavelmente todos são híbridos. Os chamados “limões verdadeiros”, cultivares Eureka, Fino, Siciliano e Lisboa, pertencentes a *C. limon*, apresentaram um cariótipo idêntico. A heterozigose cariotípica, visível tanto nos cromossomos marcadores B, C, D e F<sub>L</sub> quanto nos sítios de DNAr, pode ser a causa da heterozigose gênica revelada por marcadores morfológicos, padrões de isoenzimas, óleos essenciais e marcadores moleculares (Malik *et al.* 1974; Bennett & Rhodes 1976; Moore & Castle 1988; Luro *et al.* 1995; Herrero *et al.* 1996; Nicolosi *et al.* 2000).

A heterozigose pode também estar relacionada com as alterações meióticas características de híbridos estruturais observadas em *C. limon* (Longley 1925; Raghuvanshi 1962). Scora (1975) sugeriu que *C. limon* seria derivado de *C. aurantifolia* x *C. medica*, enquanto Nicolosi *et al.* (2000) sugeriram sua origem a partir de *C. aurantium* x *C. medica*. Do ponto de vista estritamente citológico, a presença de um cromossomo C e um F<sub>L</sub><sup>+</sup> em *C. limon* e a ausência desses cromossomos em *C. aurantifolia* e *C. medica* torna a primeira hipótese improvável enquanto a última é compatível com esses dados, uma vez que *C. aurantium* apresenta ao menos o cromossomo tipo C. Dados isoenzimáticos também sugerem *C. aurantium* como provável ancestral de *C. limon* (Torres *et al.* 1978; Hirai *et al.* 1986).

Fang & Roose (1997) analisaram o polimorfismo para marcadores moleculares de ISSR amplificados em cultivares de *C. limon* e encontraram uma alta diversidade, sugerindo

uma origem polifilética para essa espécie, o que parece improvável pela identidade dos padrões de bandas CMA das cultivares analisadas. Aparentemente, as cultivares de *C. limon*, da mesma maneira que as cultivares de *C. sinensis* (Pedrosa *et al.* 2000) e *C. clementina* (Bretó *et al.* 2001; Cornélio *et al.* 2003), originaram-se de mutações surgidas em um único germoplasma de origem híbrida.

Os limões *C. jambhiri*, *C. limonia* e *C. volkameriana* mostraram um padrão de bandas CMA e distribuição de sítios de DNAr 5S e 45S muito semelhante entre si, diferindo principalmente pela presença de um par de sítios de DNAr muito pequeno em *C. volkameriana* e *C. jambhiri*. A afinidade entre esses dois acessos foi enfatizada por alguns autores, que consideraram *C. volkameriana* como um provável híbrido de *C. jambhiri* com tangerina (Esen & Scora 1975; Moore & Castle 1988). Devido à semelhança entre os cariótipos desses dois acessos, parece pouco provável que *C. volkameriana* tenha surgido por hibridização secundária, embora uma origem a partir de *C. jambhiri* com um dos acessos do grupo de tangerinas *C. sunki/C. reshni* (carentes dos tipos cromossômicos A, B e C) seria compatível com padrões de bandas desses acessos. Scora (1975) propôs que *C. jambhiri* seria um híbrido de *C. medica* com tangerina, o que também seria possível com o estoque de *C. reshni/C. sunki*. As pequenas diferenças entre os cariótipos desses três tipos de limão e *C. limon* e a similaridade observada em vários outros caracteres (Hodgson 1967; Swingle 1967), sugere que eles sejam derivados de ancestrais diferentes, mas geneticamente próximos.

A presença de dois sítios muito pequenos de DNAr 45S, em heterozigose, em *C. volkameriana* e *C. jambhiri* parece difícil de ser explicada. É possível que esses sítios existam em outros acessos, porém com um nível de repetição inferior e por isso não tenham sido detectados. Por outro lado, os sítios de DNAr são conhecidos por apresentarem evolução muito rápida e têm sido por vezes encontrados em número e posição imprevistos nos cromossomos. Em *Hordeum*, por exemplo, foram observados sítios muito pequenos de DNAr

em *H. vulgare* mas não em outras cinco espécies diplóides próximas (Taketa *et al.* 1999). Em híbridos de *Allium* esses sítios parecem ter mudado diversas vezes de posição e de número no complemento cromossômico (Schubert & Wobus 1985).

#### *O cariótipo de C. grandis e seus híbridos*

A homozigose encontrada em *C. grandis* é compatível com a meiose regular descrita para essa espécie (Banerji 1954), rara em outros citros (Raghuvanshi 1962). *Citrus grandis*, *C. paradisi* e a cultivar ‘Ponderosa’ são claramente relacionadas pela presença de cromossomos A, B e C. Cromossomos A podem ser a principal característica de *C. grandis* e seus híbridos.

*Citrus paradisi* é admitido como um híbrido entre *C. grandis* e *C. sinensis*, originado em plantações da América Central há menos de 200 anos atrás (Davies & Albrigo 1994). A presença de três cromossomos C em *C. paradisi* sugere que os dois cromossomos de *C. sinensis* ou de *C. grandis* não são homólogos, podendo migrar junto para um mesmo gameta. Os cromossomos C de *C. grandis* foram muito semelhantes entre si, entretanto, os dois C de *C. sinensis* são de tamanhos bem distintos, podendo ser não homólogos (Guerra 1993; Matsuyama *et al.* 1996; Miranda *et al.* 1997a, b; Pedrosa *et al.* 2000). Nesse caso, dois dos três cromossomos C de *C. paradisi* teriam derivado de *C. sinensis* e o terceiro de *C. grandis*. Isso também explica a origem dos três cromossomos C do tangelo ‘Orlando’, híbrido derivado de *C. paradisi* e *C. tangerina* (Cornélio *et al.* 2003), que poderia ter herdado dois cromossomos C não-homólogos de *C. paradisi* e o terceiro de *C. tangerina*. Para Hodgson (1967), a cultivar ‘Ponderosa’ ou ‘Limão Ponderosa’ seria um híbrido entre cidra e limão, o que é incompatível com a ausência de cromossomos A nesses supostos ancestrais. O fato de que *C. paradisi* e ‘Ponderosa’ apresentarem dois cromossomos A sugere que não se tratem de híbridos primários, mas que derivem de retrocruzamentos com *C. grandis* ou de cruzamentos

entre híbridos primários. Por outro lado, Guerra (1993) e Befu *et al.* (2001) encontraram três cromossomos A no material que analisaram, indicando a existência desses cromossomos em diferentes pares de homólogos.

#### *O cariótipo de C. medica e das limas*

A participação de *C. medica* na origem dos limões e das limas *C. limettioides* e *C. aurantifolia* tem sido proposta em trabalhos recentes (Federici *et al.* 1998; Roose *et al.* 1998; Nicolosi *et al.* 2000). Embora a fórmula cariotípica das limas analisadas aparente homozigose, elas apresentam forte heteromorfismo do cromossomo B e heterozigose dos sítios de DNAr. O cromossomo B grande das limas e limões é idêntico ao de *C. medica* enquanto o cromossomo B pequeno das limas é semelhante ao encontrado em alguns acessos de tangerina. A análise de marcadores moleculares do DNA nuclear e do DNA do cloroplasto indica *C. medica* como ancestral paterno de *C. limettioides* e sugere *C. sinensis* ou *C. aurantifolia* como ancestral materno (Nicolosi *et al.* 2000). *Citrus sinensis* possui dois cromossomos C, ausentes em *C. limettioides*, enquanto *C. aurantifolia* é cariológicamente compatível como ancestral de *C. limettioides*.

Scora (1975) e Nicolosi *et al.* (2000) propuseram que *C. aurantifolia* seria um híbrido de *C. medica* com um representante do subgênero *Papeda*. Barrett & Rhodes (1976) sugeriram que *C. aurantifolia* seria um híbrido triplo, envolvendo *C. medica*, *C. grandis* e *Microcitrus*, enquanto *C. limettioides* seria um híbrido mais complexo, derivado de *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. limon* e *C. sinensis*. Nesses casos, é difícil avaliar a compatibilidade com os dados cariotípicos, uma vez que todos os ancestrais propostos são heterozigotos e praticamente qualquer combinação de tipos cromossômicos seria possível. A relação entre *C. aurantifolia* e alguma espécie fora do subgênero *Citrus* é sugerida pelo fato

de que o cromossomo tipo G, presente unicamente em *C. aurantifolia*, foi também encontrado em *C. hystrix* D.C. e *C. webberi* West (dados não publicados).

Em resumo, o presente trabalho suporta fortemente *C. medica* e *C. grandis* como espécies verdadeiras, as quais juntamente com um ou dois estoques de *C. reticulata* sensu Swingle poderiam ter dado origem às demais espécies ou cultivares do subgênero *Citrus*. As limas, *C. aurantifolia* e *C. limettioides*, aparecem fortemente relacionadas a *C. medica*, embora a primeira possa conter germoplasma estranho ao subgênero. A relação entre limas, limões e *C. medica* é evidenciada pela presença de um cromossomo B grande comum a todos, um D/5S em homozigose em *C. medica* e em heterozigose nos demais e a ausência de cromossomos A e C em todos, exceto em *C. limon*, que possui um cromossomo C. Por outro lado, a presença de cromossomos A em *C. grandis*, *C. paradisi* e 'Ponderosa' separa esse grupo dos demais.

### **Agradecimentos**

Nossos agradecimentos ao Dr. Dieter Schweizer, da Universidade de Viena por disponibilizar as sondas de DNA ribossomal 45S e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo suporte financeiro.

## Referências

- Asíns MJ, Mestre PF, Herrero R, Navarro L, Carbonell EA (1998) Molecular markers: a continuously growing biotechnology area to help Citrus improvement. *Fruits* 53: 293-302.
- Banerji I (1954) Morphological and cytological studies on *Citrus grandis* Osbeck. *Phytomorphology* 4: 390-396.
- 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 (*C. grandis* [L.] Osb.), ‘Washington’ navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosome 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 A (3) (CMA) banding patterns. *J Japan Soc Hort Sci* 70: 83-88.
- Bretó MP, Ruiz C, Pina JA, Asíns MJ (2001) The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Mol Phylogenet Evol* 21: 285-293.
- 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.
- Davies FS, Albrigo LG (1994) *Citrus*. Crop Production Science in Horticulture 2, CAB International, Wallingford.
- Esen A, Scora RW (1975) Amylase polymorphism in *Citrus* and some related genera. *Amer J Bot* 64: 305-309.

- Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet* **95**: 408-417.
- Fann JY, Kovarik A, Hemleben V, Tsirekidze NI, Beridze TG (2001) Molecular and structural evolution of *Citrus* satellite DNA. *Theor Appl Genet* **103**: 1068-1073.
- Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor Appl Genet* **96**: 812-822.
- Guerra M (1985) Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin patterns. *Caryologia* **38**: 335-346.
- Guerra M (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* **71**: 234-241.
- Guerra M, 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. *Amer J Bot* **87**: 735-747.
- Herrero R, Asíns MJ, Carbonell EA, Navarro L (1996) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecific and intragenus genetic variability. *Theor Appl Genet* **92**: 599-609.
- Hirai M, Kozaki I, Kajiura I (1986) Isozyme analysis and phylogenetics relationships of *Citrus*. *Jpn J Breed* **36**: 377-389.
- Hodgson RW (1967) Horticultural varieties of *Citrus*. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) *The Citrus Industry. History, world distribution, botany and varieties*, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 431-591.



- Longley AE (1925) Cytology-polycary, polyspary and polyploidy in *Citrus* relatives. *J. Washington Acad Sci* **15**: 347-351.
- Luro F, Laigret F, Bové JM, Ollitrault P (1995) DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. *HortScience*. **30**: 1063-1067.
- Malik MN, Scora RW, Soost RK (1974) Studies on the origin of the lemon. *Hilgardia* **42**: 361-382.
- 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 (1997a) 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 (1997b) Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosome. *Chrom Res* **5**: 86-92.
- Moore GA (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet* **17**: 536-540.
- Moore GA, Castle WS (1988) Morphology and isozimic analysis of open-pollinated *Citrus* rootstock populations. *J Hered* **79**: 59-63.
- 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.

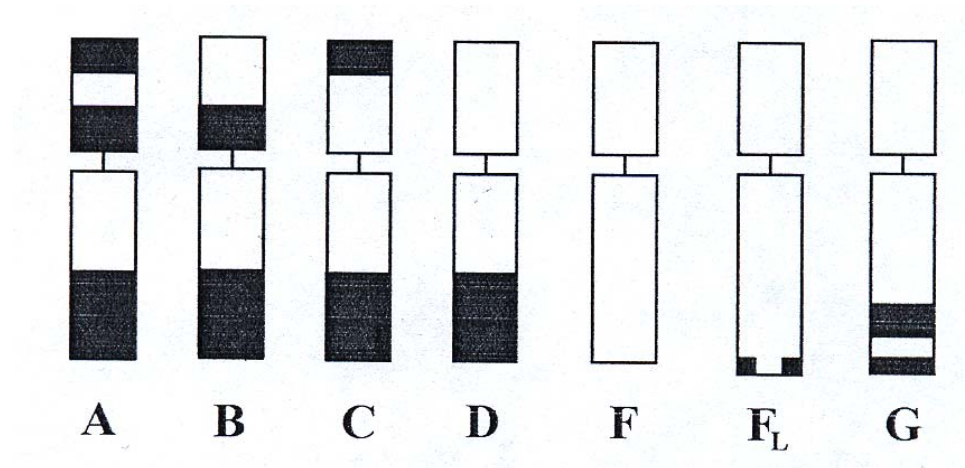
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000) *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* **100**: 1155-1166.
- Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M (2000) Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor Appl Genet* **100**: 361-367.
- Raghuvanshi SS (1962) Cytological in *Citrus* IV. Evolution in genus *Citrus*. *Cytologia* **27**: 172-188.
- Roose ML, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (1998) The chromosomes of *Citrus* and *Poncirus* species and hybrids: Identification of characteristic chromosomes and physical mapping of rDNA loci using *in situ* hybridization and fluorochrome banding. *J Hered* **89**: 83-86.
- Scora RW (1975) IX. On the history and origin of *Citrus*. *Bull Torrey Bot Club* **102**: 369-375.
- Schubert I, Wobus U (1985) *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* **92**: 143-148.
- Schweizer D, Ambros PF (1994) Chromosome banding. In: Gosden JR (ed) *Methods in molecular biology*, vol. 29, *Chromosome analysis protocols*, Humana Press, Totowa, pp 97-113.
- Swingle WT (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) *The Citrus Industry. History, world distribution, botany and varieties*, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 190-430.
- Taketa S, Harrison GE, Heslop-Harrison JS (1999) Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theor Appl Genet* **98**: 1-9.
- Tanaka T (1977) Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Stud Citrol* **14**: 1-6.

Torres AM, Soost RK, Diedenhofen U (1978) Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. *Amer J Bot* **65**: 869-881.

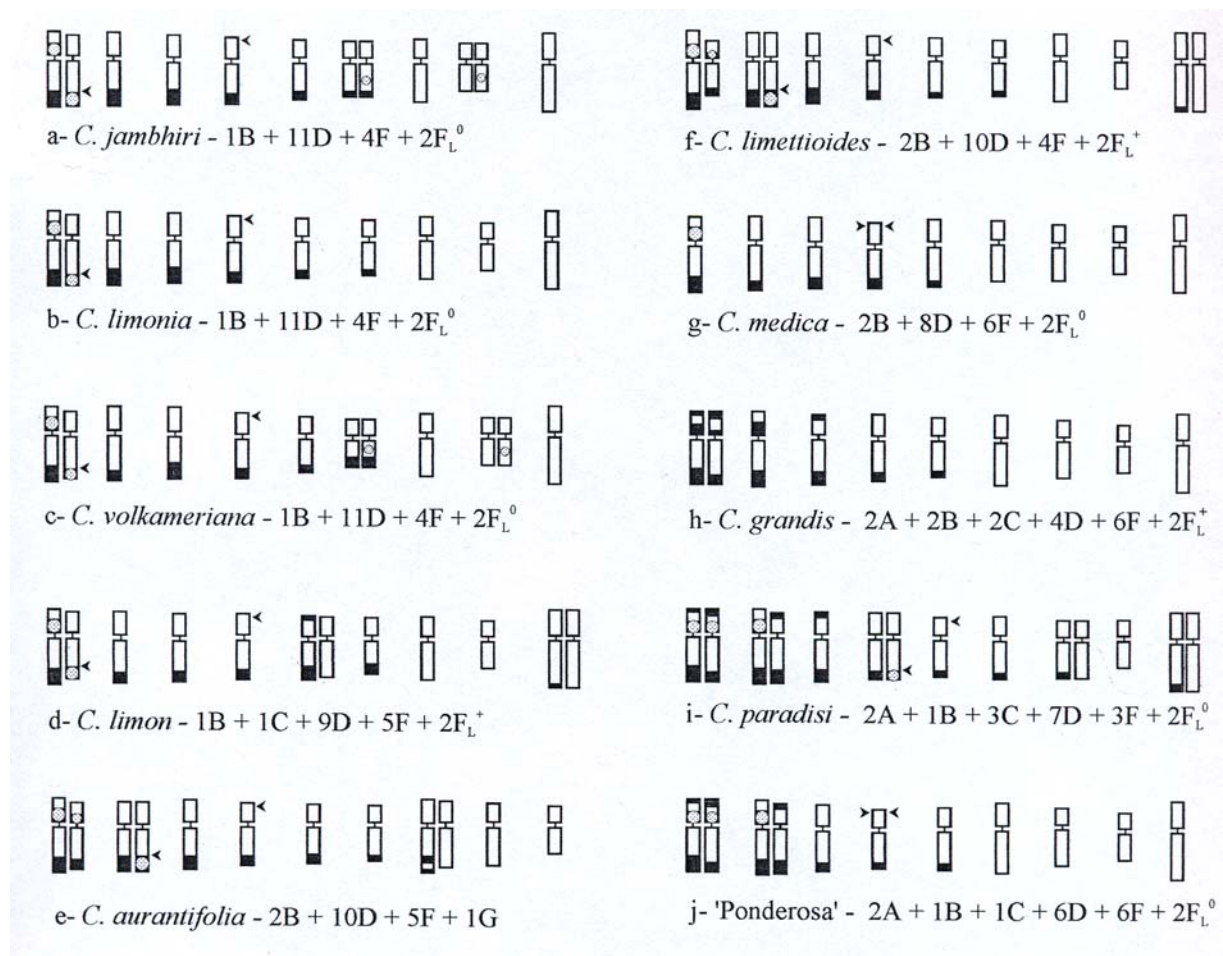
Torres AM, Soost RK, Mau-Lastovicka T (1982) *Citrus* isozymes. Genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. *J Heredity* **73**: 335-339.

Unfried I, Stocker U, Gruendler P (1989) Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Co10. *Nucleic Acids Research* **17**: 7513.

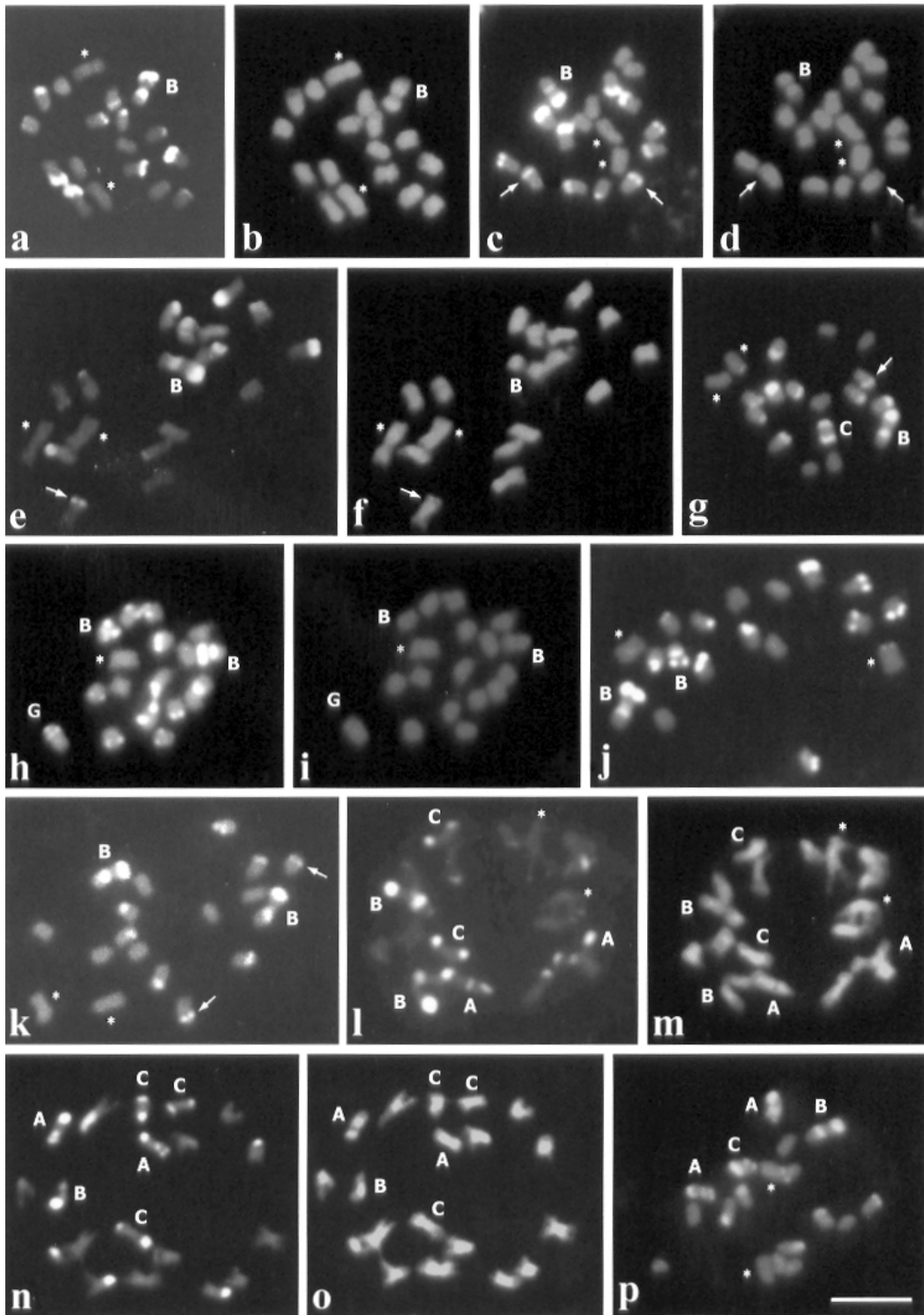
Unfried I, Gruendler P (1990) Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **18**: 4011.



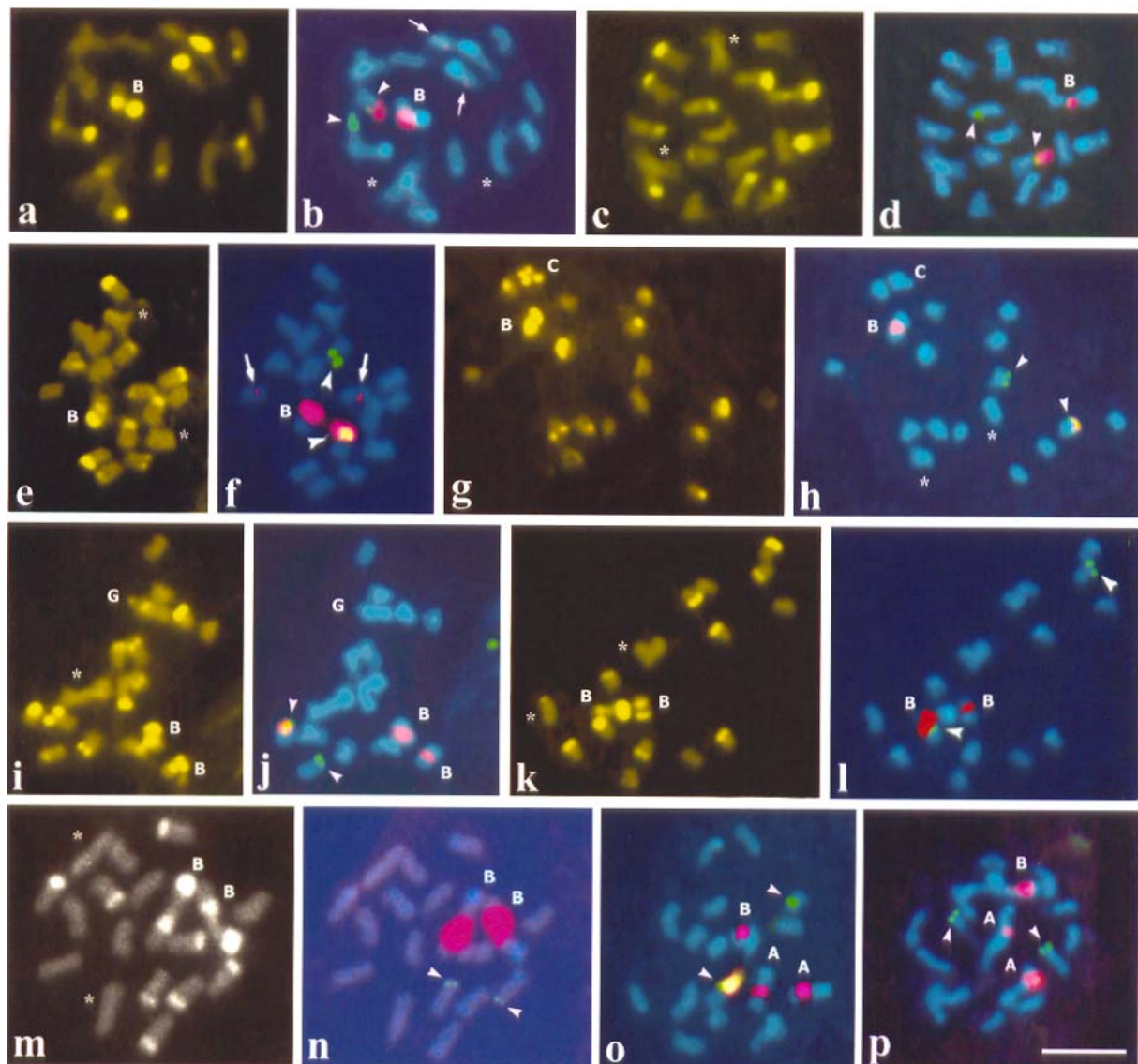
**Figura 1.** Tipos cromossômicos encontrados nos acessos do grupo lima-limão-cidra-pomelo de acordo com a localização das bandas CMA<sup>+</sup>.



**Figura 2.** Idiograma representando o padrão de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, fórmula cariotípica e a localização dos sítios de DNAr 5S (◀, em um dos homólogos e ▶ ◀, em ambos) e 45S (●). **a** *Citrus jambhiri*, **b** *C. limonia*, **c** *C. volkameriana*, **d** *C. limon*, **e** *C. aurantifolia*, **f** *C. limettioides*, **g** *C. medica*, **h** *C. grandis*, **i** *C. paradisi*, **j** 'Ponderosa'. Os cromossomos foram organizados do tipo A ao F, do maior para o menor. O cromossomo G foi agrupado com um dos F. No caso de heteromorfismo, os cromossomos foram representados aos pares, e nos homomórficos apenas um.



**Figura 3.** Complementos cromossômicos do grupo lima-limão-cidra-pomelo corados com CMA (a, c, e, g, h, j, k, l, n e p) e DAPI (b, d, f, i, m e o). (a-b) *Citrus jambhiri*, (c-d) *C. limonia*, (e-f) *C. volkameriana*, (g) *C. limon*, (h-i) *C. aurantifolia*, (j) *C. limettioides*, (k) *C. medica*, (l-m) *C. grandis*, (n-o) *C. paradisi* e (p) 'Ponderosa'. Asteriscos indicam cromossomos do tipo  $F_L$ . Setas apontam bandas subterminais. Os tipos cromossômicos são indicados por letras. Barra corresponde a 5  $\mu$ m.



**Figura 4.** Complementos cromossômicos dos acessos do grupo lima-limão-cidra-pomelo corados com CMA (a, c, e, g, i, k e m) e hibridizados com sonda de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho) (b, d, f, h, j, l, n-p). (a-b) *Citrus jambhiri*, (c-d) *C. limonia*, (e-f) *C. volkameriana*, (g-h) *C. limon*, (i-j) *C. aurantifolia*, (k-l) *C. limettioides*, (m-n) *C. medica*, (o) *C. paradisi* e (p) 'Ponderosa'. Setas apontam sítios pequenos de DNAr 45S em b e f. Cabeças de seta mostram regiões de DNAr 5S em cromossomos D/5S e D/5S-45S. Barra corresponde a 5 $\mu$ m.

## **6. Capítulo 3**

**Padrão de bandas CMA e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S na lima ácida ‘Tahiti’ e em uma seleção derivada por semente**

Artigo a ser submetido à revista *Chromosome Research*

---

---



## **Padrão de bandas CMA e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S na lima ácida ‘Tahiti’ e em uma seleção derivada por semente**

R. Carvalho<sup>1</sup>, W.S. Soares Filho<sup>2</sup> & M. Guerra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420, Recife, PE, Brasil.* <sup>2</sup>*Embrapa Mandioca e Fruticultura, 44.380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil.*

*Key words:* Triploidia, CMA/DAPI, FISH, Meiose, *Citrus latifolia*

### **Resumo**

Foram comparados os padrões de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> e a localização dos sítios de DNAr 5S e 45S nos clones ‘Tahiti IAC 05’ e ‘Tahiti CNPMF 2000’, este obtido por semente. O ‘Tahiti IAC 05’ apresentou a fórmula cariotípica 3B + 1C + 14D + 6F + 1F<sub>L</sub><sup>0</sup> + 1F<sub>L</sub><sup>+</sup> + 1F<sub>L</sub><sup>st</sup>, com cinco sítios de DNAr 45S (3B e 2D) e três sítios de DNAr 5S (2D/5S e 1D/5S-45S). Nenhuma combinação dos cariótipos diplóides conhecidos resultaria na fórmula desse acesso. Presume-se, porém, que a origem da lima ácida ‘Tahiti’ seja devida à fecundação de um gameta diploide de *Citrus aurantifolia*, ou de um germoplasma próximo, com um gameta haplóide de *C. limon*. A seleção ‘Tahiti CNPMF 2000’ diferiu do ‘Tahiti IAC 05’ pelo padrão de bandas de alguns cromossomos. A maioria dessas alterações pareceu ter sido causada por mudanças de posição dos sítios de DNAr em um embrião nucelar. Nos dois casos, há indicações de que os padrões de bandas CMA podem sofrer alterações em acessos surgidos

por sementes. A análise meiótica do ‘Tahiti CNPMF 2000’ foi irregular com formação de uni, bi e trivalentes, enquanto o ‘Tahiti IAC 05’ foi totalmente estéril.

## Introdução

O limão ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia* Tanaka) pertence ao grupo das limas ácidas e se destaca como uma das mais importantes frutas cítricas. O nome limão ‘Tahiti’ teve origem, provavelmente, quando esta lima ácida foi introduzida nos Estados Unidos, vinda do Tahiti, na segunda metade do século XIX (Hodgson 1967). É considerada um híbrido natural, originada do cruzamento entre uma cultivar de lima ácida [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.] com o limão verdadeiro, *C. limon* (L.) Burm. f., ou mais provavelmente entre uma lima ácida e a cidra, *C. medica*. Esses três tipos de citros têm em comum, entre várias outras características, o fato de serem originários de uma mesma região, que inclui parte da Índia, Malásia e Mianmar (Hodgson, 1967). Swingle (1967) considerou a lima ácida ‘Tahiti’ como uma cultivar da lima, *C. aurantifolia*, enquanto Tanaka (1961) o separou em uma espécie própria, *C. latifolia*, reunida com as limas ácidas *C. aurantifolia* e doces *C. limettioides* Tan. na subseção *Eulimonellus*. A similaridade do Tahiti com as limas tem sido comprovada por padrões de isoenzimas e marcadores moleculares (Esen & Scora 1977; Herrero *et al.* 1996; Federici *et al.* 1998).

Bacchi (1940) e Krug & Bacchi (1943) descreveram a lima ácida ‘Tahiti’ como um triplóide, com  $2n=27$  e associaram a ausência de sementes à triploidia. No gênero *Citrus* (L.) todas as espécies são diplóides ( $2n=18$ ), mas triplóides e tetraplóides surgem espontaneamente entre sementes de plantas cultivadas (Krug & Bacchi 1943; Esen & Soost 1971; Barrett & Hutchinson 1978; Wakana *et al.* 1981). Triploidia tem sido também induzida

em diferentes cultivares de *Citrus* (Krug & Bacchi 1943; Cameron & Soost 1969; Oiyama *et al.* 1991). Contudo, entre os poliplóides, apenas o ‘Tahiti’ e a cultivar ‘Bearss’, igualmente triplóide e aparentemente derivada da lima ácida ‘Tahiti’ (Hodgson 1967), possuem importância econômica, apresentando frutos maiores, casca fina, maior quantidade de suco por fruto (30-55%) e maior adaptação ao cultivo em regiões tropicais e subtropicais (Krug & Bacchi 1943; Gayet *et al.* 1995). Além dessas, apenas as cultivares triplóides de pomelo, Oroblanco e Melogold, apresentam algum valor comercial (Soost & Cameron 1980; 1985).

Plantas poliplóides em *Citrus* podem surgir por via sexual ou somática (Lee 1988). Os triplóides sexuais surgem pela fusão de um gameta não-reduzido ( $2n$ ) com um gameta haplóide ( $n$ ) (Esen & Soost 1971; Wakana *et al.* 1981). A formação de esporos não-reduzidos é geralmente devida a alterações da meiose e varia entre acessos. Contudo, o sucesso do desenvolvimento do embrião triplóide depende de um equilíbrio entre o nível de ploidia do embrião ( $3x$ ) e do endosperma ( $5x$ ), levando a que triplóides bem sucedidos, surgidos de cruzamentos  $2x \times 2x$ , quase sempre derivem de megagametófitos não-reduzidos (Esen & Soost 1971; Lee 1988).

Citologicamente, os acessos de *Citrus* são extremamente polimórficos em relação ao padrão de bandas heterocromáticas reveladas pela coloração com o fluorocromo cromomicina  $A_3$  (CMA), contracorado com o fluorocromo 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Recentemente foram descritos os padrões de bandas  $CMA^+$  para os principais acessos de limões, limas, cidra e pomelos (Carvalho *et al.* em preparação), os quais podem estar envolvidos na formação da lima ácida ‘Tahiti’. Híbridos entre esses acessos podem ser identificados pela combinação dos padrões de bandas dos supostos ancestrais.

Neste trabalho, foi feita uma análise comparativa dos padrões de bandas  $CMA^+/DAPI^-$ , da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S e da meiose de dois acessos de

lima ácida ‘Tahiti’, visando contribuir para o entendimento da origem e estabilidade dos genomas deste triplóide.

## **Material e Métodos**

A análise citogenética foi feita nos clones ‘Tahiti IAC 05’ e ‘Tahiti CNPMF 2000’, utilizando-se meristema apical de brotos foliares, obtidos do Banco Ativo de Germoplasmas de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Para análise mitótica, brotos foliares foram pré-tratados com 2 mM de 8-hidroxiquinoleína a 8 °C por 24 h, fixados em etanol-ácido acético (3:1, v/v) por 24 h à temperatura ambiente e estocados a – 20 °C. Os brotos foliares foram digeridos em solução enzimática de celulase 2% (Sigma) e pectinase 20% (Sigma) a 37 °C por 2 h. O material foi esmagado em uma lâmina com uma gota de ácido acético 45%, congelado em nitrogênio líquido para remoção da lamínula e deixado secar ao ar. No caso da análise meiótica, os botões florais jovens foram mergulhados diretamente em solução fixadora e as lâminas foram coradas convencionalmente com Giemsa, de acordo com Guerra (1983).

### *Coloração com CMA/DAPI*

A coloração com os fluorocromos CMA e DAPI foi feita de acordo com Schweizer & Ambros (1994). Preparações, envelhecidas por três dias, foram coradas com CMA (0,5 mg/ml) por 1h, em seguida coradas com DAPI (1 µg/ml) por 1/2 h e montadas em glicerol: tampão McIlvaine 1:1 (v/v), pH 7,0, contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. As lâminas foram

envelhecidas por mais três dias antes da análise em microscópio Leica DMLB com luz ultravioleta.

### *Hibridização in situ*

Para localizar os sítios de DNAr 45S foram utilizadas as sondas SK18S e SK25S, contendo fragmentos do DNA ribossomal 18S e 25S, respectivamente, obtidos originalmente de *Arabidopsis thaliana* L. (Unfried *et al.* 1989; Unfried & Gruendler 1990) e gentilmente cedidas pelo Prof. Dieter Schweizer, da Universidade de Viena. As sondas foram marcadas com biotina-11-dUTP (Sigma) por *nick translation*. O DNAr 5S foi obtido por PCR, a partir do DNA genômico de *Citrus aurantifolia*, utilizando-se os iniciadores de síntese 5'-GTG CGA TCA TAC CAG C(A/G)(G/T)TAA TGC ACC GG-3' e 5'-GAG GTG CAA CAC GAG GAC TTC CCA GGA GG-3', e simultaneamente marcado com digoxigenina 11-dUTP.

O procedimento e as condições de hibridização *in situ* foram feitos como descrito por Moscone *et al.* (1996). As sondas foram adicionadas numa mistura de hibridização, a uma concentração final de 1,2 a 3,0 ng/μl, contendo 60% de formamida, 5% de dextran sulfato e 0,1 μg/μl de esperma de salmão em 2xSSC. A sonda e as preparações citológicas foram desnaturadas a 75 °C por 10 min e hibridizadas por 18-20 h a 37 °C em câmara úmida. O DNAr 45S foi detectado com o anticorpo monoclonal antibiotina produzido em rato (Dakopatts n° M743) e visualizado com um anticorpo secundário anti-antibiotina de rato, produzido em coelho, conjugado ao tetrametil-rodamina-isotiocianato (TRITC, Dakopatts n° R270). A sonda de DNAr 5S foi detectada com anticorpo antidigoxigenina, produzido em ovelha, conjugado com fluoresceína-isotiocianato (FITC) (Boehringer Mannheim n° 1207741) e o sinal amplificado com anticorpo anti-antidigoxigenina de ovelha, produzido em coelho, conjugado com FITC (Dakopatts F135, DAKO). As lâminas foram contracoradas

com 2 µg/ml de DAPI, lavadas rapidamente em 2xSSC e montadas em meio Vectashield H-1000 (Vector Labs).

As células foram analisadas em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB e capturadas através do software Leica Qfish, utilizando uma câmera de vídeo Cohu-CCD, ou fotografadas com filme T-MAX ASA 400 da Kodak, copiadas em papel Kodak Kodabromide F3.

## Resultados

A coloração com os fluorocromos CMA e DAPI revelou que as duas seleções de lima ácida ‘Tahiti’ apresentaram  $2n=27$  e um complemento cromossômico semelhante. A maioria dos cromossomos apresentou bandas heterocromáticas, principalmente nas regiões terminais dos braços longos (Figura 1). Os cromossomos foram classificados de acordo com Cornélio *et al.* (2003): tipo A, duas bandas teloméricas e uma proximal; tipo B, uma banda proximal e uma telomérica; tipo C, duas bandas teloméricas; tipo D, uma banda terminal; tipo E, uma banda proximal ou intersticial (ausente no ‘Tahiti IAC 05’) e o tipo F sem banda CMA<sup>+</sup>.

Apenas bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> foram visualizadas, exceto uma única banda CMA<sup>0</sup>/DAPI<sup>-</sup> detectada em um cromossomo tipo B (denominado B<sup>0</sup>) no clone ‘Tahiti CNPMF 2000’ (Figura 2a, h). A presença de uma região proximal DAPI<sup>-</sup> sugere que esse cromossomo seja homólogo aos demais cromossomos do tipo B, variando apenas na intensidade de brilho com CMA na região proximal. Isso foi comprovado pelo fato de que essa região hibridizou com a sonda de DNA ribossomal 45S, como nos demais cromossomos do tipo B (Figura 2i).

O ‘Tahiti IAC 05’ apresentou fórmula cariotípica  $3B + 1C + 14D + 6F + 1F_L^0 + 1F_L^+ + 1F_L^{st}$ , destacando-se dois cromossomos tipo B maiores e um menor, além de um cromossomo do tipo C (Figura 2b, e). Entre os cromossomos D, um ou dois pareceram ter bandas subterminais. Dos três cromossomos  $F_L$  (o maior cromossomo F, que em alguns acessos apresenta uma pequena banda terminal), um não mostrou banda CMA ( $F_L^0$ ), um outro tinha uma pequena banda terminal ( $F_L^+$ ) e um terceiro ( $F_L^{st}$ ) tinha uma banda subterminal (Figura 2b, e). Foram observados cinco sítios de DNAr 45S, três colocalizados com a banda CMA<sup>+</sup> proximal dos tipos B e dois na banda de cromossomos do tipo D. Os sítios de DNAr 5S também foram localizados em cromossomos do tipo D, dois na região oposta à banda CMA<sup>+</sup> (denominados D/5S) e um adjacente ao sítio de DNAr 45S (D/5S-45S) (Figura 2f).

A seleção ‘Tahiti CNPMF 2000’ apresentou a fórmula cariotípica  $1A + 2B + 1B^0 + 12D + 8F + 1F_L^0 + 1F_L^+ + 1F_L^{st}$  (Figura 2a, h) destacando-se como cromossomos marcadores um cromossomo A e três Bs. Um ou dois cromossomos tipo D tinham bandas subterminais e os  $F_L$  eram idênticos aos do ‘Tahiti IAC 05’. O cromossomo A apresentou a banda terminal do braço longo bem maior que as bandas do braço curto. O ‘Tahiti CNPMF 2000’, além disso, apresentou cinco sítios de DNAr 45S, quatro situados proximalmente (1A, 2B e  $1B^0$ ) e um colocalizado com a banda CMA<sup>+</sup> do cromossomo D (D/5S-45S). Três sítios de DNAr 5S foram observados, dois localizados em cromossomos F (F/5S) e um no cromossomo D/5S-45S (Figura 2i).

A análise meiótica revelou total esterilidade para o clone ‘Tahiti IAC 05’, não tendo sido detectada nem mesmo a formação do tecido esporogêneo, embora a morfologia das anteras parecesse normal. Por outro lado, o ‘Tahiti CNPMF 2000’ apresentou meiose com irregularidades, havendo formação de univalentes, bivalentes e trivalentes (Figura 2c).

## Discussão

### *Origem da lima ácida 'Tahiti'*

Cariologicamente, a cultivar 'Tahiti IAC 05' apresenta como cromossomos marcadores três cromossomos B (sendo um menor que os outros), um C, dois D/5S, um D/5S-45S, um D/45S e três F<sub>L</sub> ligeiramente distintos. A presença de um cromossomo C, encontrado, entre as limas e limões analisados por Carvalho *et al.* (em preparação), unicamente em *C. limon*, torna este um dos ancestrais mais prováveis para o 'Tahiti IAC 05'. Embora diferentes tipos de cromossomos C possam ser encontrados nos citros (Cornélio *et al.*, no prelo; Carvalho *et al.* em preparação), o cromossomo C de *C. limon* pareceu idêntico ao do 'IAC 05'. Por outro lado, há um consenso de que *C. medica* seria uma das espécies básicas do subgênero *Citrus* e que estaria fortemente relacionada ao grupo dos limões e limas (Barrett & Rhodes 1976; Moore 2001).

A condição triplóide da lima ácida 'Tahiti' poderia ter surgido de duas maneiras distintas: por autotriploidia, o que pode ser descartado pelo padrão de bandas apresentado, ou pela fecundação de um gameta não-reduzido por um gameta haplóide de outra cultivar ou outra espécie. Raghuvanshi (1962) sugeriu, com base na análise meiótica de vários acessos de *Citrus*, que gametas não-reduzidos poderiam surgir por falha na meiose I e formação de núcleos de restituição. Neste caso, o gameta não-reduzido teria a mesma fórmula cariotípica da planta-mãe. Cameron & Soost (1969) encontraram evidências de que em *Citrus* o gameta não-reduzido poderia surgir por duplicação após a meiose. Nesse caso, é difícil prever quais seriam os tipos de gametas resultantes de um determinado complemento cromossômico diplóide, uma vez que a maioria dos germoplasmas de *Citrus* é heteromórfica para alguns cromossomos e os pares de homólogos não estão definidos. Em *C. limon*, por exemplo, há um



cromossomo B, um C, um D/5S-45S e um F sem identificação clara dos respectivos homólogos. Na presente análise, serão considerados apenas os cariótipos gaméticos derivados de núcleos de restituição, por serem previsíveis e estarem também incluídos entre os tipos da segunda hipótese.

Carvalho *et al.* (em preparação) analisaram o padrão de bandas dos acessos mais importantes de limas e limões. Baseando-se nesses cariótipos, as únicas combinações capazes de reproduzir o conjunto de cromossomos marcadores do ‘Tahiti IAC 05’ (3B e 1C) seria um gameta  $2n$  de *C. medica* (2B) com um gameta  $n$  de *C. limon* (1B + 1C) ou um gameta  $2n$  de uma lima, *C. aurantifolia* ou *C. limettioides* (2B), com um gameta reduzido de *C. limon*. O fato de que o limão ‘Tahiti’ possui três cromossomos  $F_L$  diferentes, sendo um deles com banda subterminal, só poderia ser explicado por uma recombinação causada por um quiasma situado entre as duas bandas terminais do cromossomo G e o  $F_L^0$  de *C. aurantifolia*, o que resultaria em um cromossomo  $F_L^+$  e um  $F_L^{st}$ . Essa suposição é reforçada pelo fato de que o tamanho da banda subterminal do  $F_L$  de *C. aurantifolia* e da lima ácida ‘Tahiti’ são muito semelhantes, além de que, a maioria dos quiasmas nos citros são terminais (Banerji 1954; Raghuvanshi 1962; Naithani & Raghuvanshi 1963).

Em relação ao número de sítios de DNAr, qualquer das combinações mencionadas teria o problema de que o ‘Tahiti IAC 05’ apresenta um cromossomo D/45S no lugar de um dos dois cromossomos D/5S-45S esperados. Como o cromossomo D/45S não foi encontrado em nenhum outro acesso analisado por Carvalho *et al.* (em preparação), é possível que um dos dois cromossomos D/5S-45S do genoma original da lima ácida ‘Tahiti’ tenha perdido o sítio de DNAr 5S, como parece ter ocorrido na evolução de outros gêneros (ver, por exemplo, Thomas *et al.* 1996; Ran *et al.* 2001). Alternativamente, um germoplasma ainda desconhecido, próximo a *C. aurantifolia*, contendo um cromossomo D/45S e um  $F_L^{st}$ , poderia explicar a origem da lima ácida ‘Tahiti’.

### *A origem da seleção 'Tahiti CNPMF 2000'*

A seleção 'Tahiti CNPMF 2000' foi obtida na Embrapa Mandioca e Fruticultura, a partir de uma semente de 'Tahiti', possivelmente do clone 'Tahiti IAC 05'. Comparada com este último, a seleção 'CNPMF 2000' produz mais sementes (em média, uma por fruto) e tem frutos menos ácidos, menos ovalados e não formados em cacho (Soares Filho *et al.* 2001). Variações desse tipo são geralmente atribuídas a mutações em embriões nucelares. Plantas derivadas de embriões zigóticos envolveriam um outro genoma e certamente teriam diferenças morfológicas e fisiológicas maiores que as encontradas nesta seleção.

Na lima ácida 'Tahiti', a produção de sementes é muito baixa (0,2 a 0,4 por fruto) e, quando se formam, são geralmente pequenas e com baixa viabilidade (Krug e Bacchi 1943). Não se têm informações sobre a origem dessas sementes, se zigótica ou nucelar. Sementes triplóides de origem zigótica, formadas por megásporos não-reduzidos  $2n$ , têm sido encontradas em várias espécies de *Citrus* com frequência relativamente alta (Lee 1988). O mal desenvolvimento das plântulas a partir dessas sementes é atribuído a um desbalanço do nível de ploidia entre o embrião e o endosperma (Esen & Soost 1973). Apesar de possuir anteras estéreis, a meiose feminina da lima ácida 'Tahiti' é desconhecida. Krug & Bacchi (1943) contaram os cromossomos de três plântulas de sementes de 'Tahiti' e encontraram  $2n=19$ ,  $2n=20$  e  $2n=21$ , demonstrando a formação de embriões zigóticos. Contagens cromossômicas em plântulas de outras duas sementes de Tahiti (M. Guerra, dados não publicados) revelaram números semelhantes ( $2n=23$ , 24), indicando que a meiose feminina ocorre neste triplóide, embora com irregularidades.

Cariotipicamente o 'Tahiti CNPMF 2000' apresenta algumas semelhanças e diferenças importantes em relação ao 'Tahiti IAC 05'. Os três cromossomos  $F_L$  e os três cromossomos B foram conservados, mas o menor B alterou a resposta com o CMA na banda

proximal, o que poderia ser devido a uma redução do nível de repetições do DNAr nessa região. O cromossomo C foi substituído por um A, ou teria recebido uma inserção de DNAr 45S na região proximal, um D e um D/45S perderam as bandas e os dois sítios de DNAr 5S passaram de cromossomos D/5S para cromossomos F. Essas alterações são difíceis de explicar, tanto considerando uma origem zigótica quanto nucelar. Nenhum dos cariótipos descritos por Carvalho *et al.* (em preparação) poderia produzir um gameta  $n$  que, junto com um gameta  $2n$  do ‘Tahiti IAC 05’ resultasse, em um cariótipo idêntico ao do ‘Tahiti CNPMF 2000’, o que torna a hipótese zigótica mais improvável.

Uma origem nucelar só seria possível considerando que os sítios de DNAr pudessem mudar de posição durante a formação do embrião nucelar, uma vez que quase todas as diferenças entre os dois cariótipos envolveram esses sítios, exceto um cromossomo D que teria perdido a banda CMA<sup>+</sup>. Mudanças na posição dos sítios de DNAr 45S foram inicialmente reportadas por Schubert e Wobus (1985) em híbridos e clones de *Allium* e posteriormente por outros autores em diferentes grupos de plantas, tanto para o DNAr 45S (Dubcovsky & Dvorak 1995; Thomas *et al.* 1996; Taketa *et al.* 1999) quanto para o DNAr 5S (Lee *et al.* 1999; Frello & Heslop-Harrison 2000). Provavelmente, a análise com CMA/DAPI e FISH de outros clones da lima ácida ‘Tahiti’ derivados de sementes é necessária para esclarecer a origem do ‘Tahiti CNPMF 2000’.

## **Agradecimentos**

Nossos agradecimentos ao Dr. Dieter Schweizer, da Universidade de Viena, por disponibilizar as sondas de DNA ribossomal 45S e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo suporte financeiro.

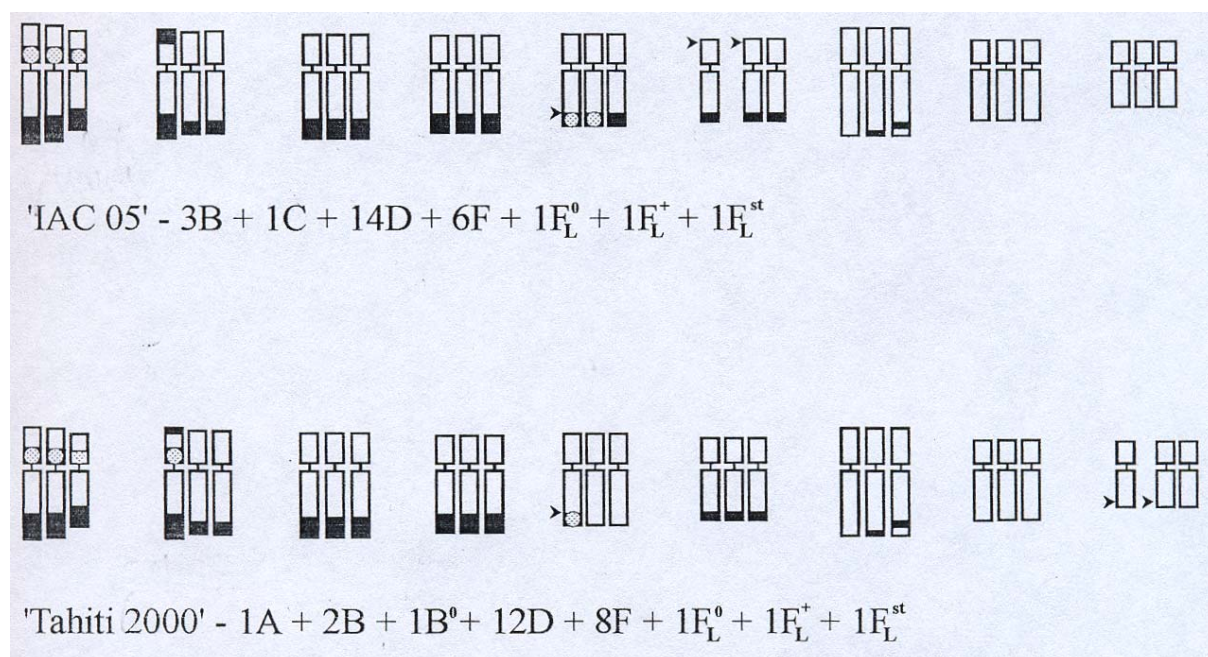
## Referências

- Bacchi O (1940) Observações citológicas em *Citrus*. I. Número de cromossomos de algumas espécies e variedades. *J Agron* **3**: 249-258.
- Barrett HC, Hutchinson DJ (1978) Spontaneous tetraploidy in apomitic seedlings of *Citrus*. *Econ Bot* **32**: 27-45.
- Barrett HC, Rhodes AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst Bot* **1**: 105-136.
- Banerji I (1954) Morphological and cytological Studies on *Citrus grandis* Osbeck. *Phytomorphology* **4**: 390-396.
- Cameron JW, Soost RK (1969) Characters of new populations of *Citrus* polyploids and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. *Proc First Inter Citrus Symp* **1**: 199-205.
- Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M (no prelo) Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst Evol* **240**: 149-161.
- Dubcovsky J, Dvorak (1995) Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. *Genetics* **140**: 1367-1377.
- Esen A, Scora RW (1977) Amylase polymorphism in *Citrus* and some related genera. *Amer J Bot* **64**: 305-309.
- Esen A, Soost RK (1971) Unexpected triploids in *Citrus*: their origin, identification and possible use. *J Hered* **62**: 329-333.
- Esen A, Soost RK (1973) Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo:endosperm ploidy ratios in *Citrus*. I. Congresso Mundial de Citricultura **2**: 53-63.

- Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor Appl Genet* **96**: 812-822.
- Frello S, Heslop-Harrison JS (2000) Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (*Iridaceae*) investigated by *in situ* hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. *Ann Bot* **86**: 317-322.
- Gayet JP, Bleinroth EW, Matallo M, Garcia EEC, Garcia AE, Ardito EFG, Bordin MR (1995) Lima ácida Tahiti para exportação: procedimento de colheita e pós-colheita. *Série Publicações Técnicas Frupex* 12, Embrapa-SPI, Brasília, pp 36.
- Guerra M (1983) O uso do Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ci e Cult* **35**: 190-193.
- Herrero R, Asíns MJ, Carbonell EA, Navarro L (1996) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor Appl Genet* **92**: 599-609.
- Hodgson RW (1967) Horticultural varieties of *Citrus*. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) *The Citrus Industry. History, world distribution, botany and varieties*, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 431-591.
- Krug CA, Bacchi O (1943) Triploid varieties of *Citrus*. *J hered* **34**: 277-283.
- Lee LS (1988) *Citrus* polyploidy – origins and potential for cultivar improvement. *Aust J Agric Res* **39**: 735-747.
- Lee SH, Do GS, Seo BB (1999) Chromosomal localization of 5S rRNA gene loci and the implications for relationships within the *Allium* complex. *Chrom Res* **7**: 89-93.
- Moore GA (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet* **17**: 536-540.

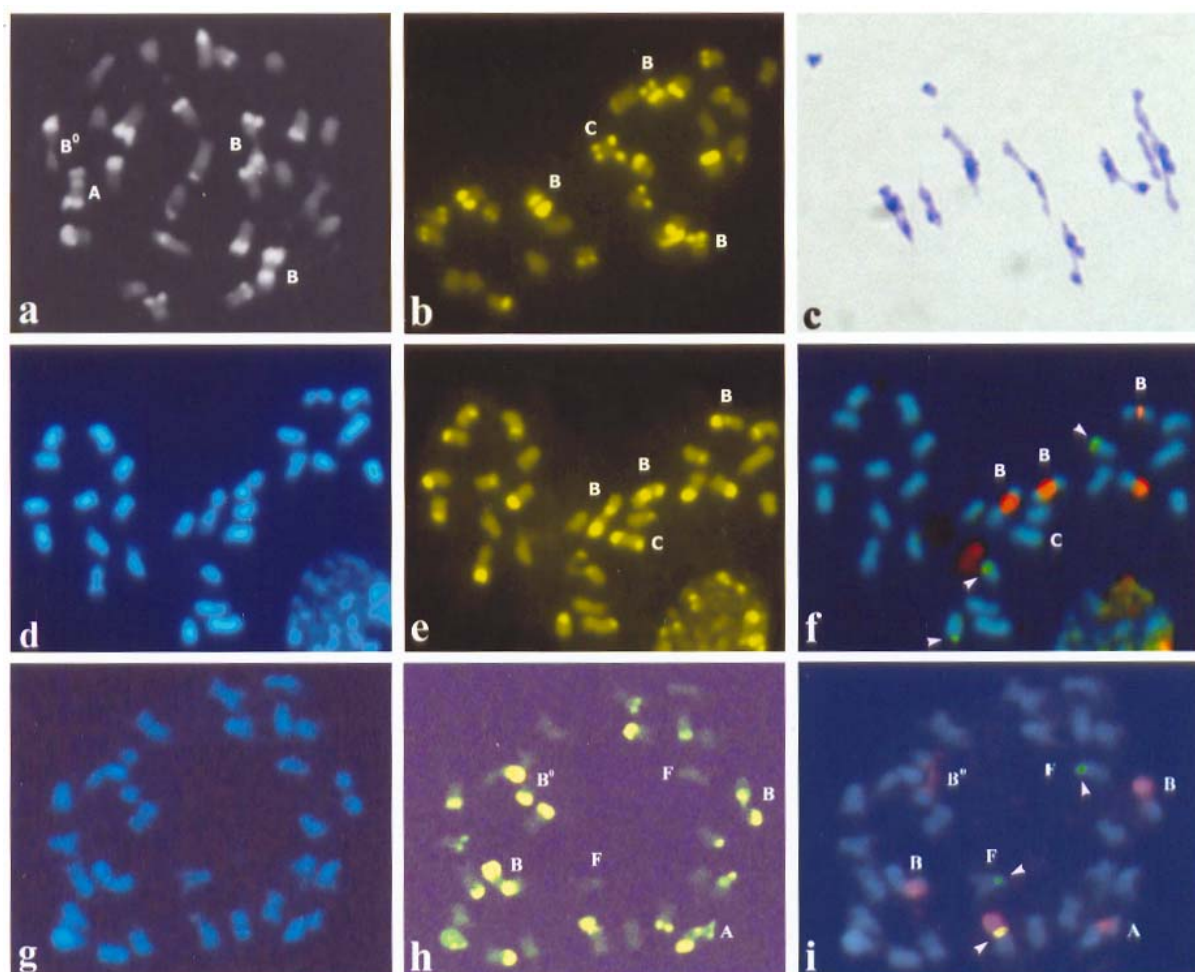
- Moscone EA, Matzke MA, Matzke AJM (1996) The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* **105**: 231-236.
- Naithani SP, Raghuvanshi SS (1963) Cytogenetical studies in *Citrus*. Part I. *Genetica* **33**: 301-312.
- Oiyama I, Kobayashi S, Yoshinaga K, Ishii S, Ohgawara T (1991) Use of pollen from a somatic hybrid between *Citrus* and *Poncirus* in the production of triploids. *HortScience* **26**: 1082.
- Raghuvanshi SS (1962) Cytological in *Citrus* IV. Evolution in genus *Citrus*. *Cytologia* **27**: 172-188.
- Ran Y, Hammett KRW, Murray BG (2001) Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Ann Bot* **87**:823-830.
- Schubert I, Wobus U (1985) In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* **92**: 143-148.
- Schweizer D, Ambros PF (1994) Chromosome banding. In: Gosden JR (ed) Methods in molecular biology, vol. 29, Chromosome analysis protocols, Humana Press, Totowa, pp 97-113.
- Soares Filho WS, Cunha Sobrinho AP, Passos OS, Diamantino MSAS, Moitinho EDB (2001) Recursos genéticos e identificação de novas variedades: um exemplo com citros. III SIRGEALC – Simpósio de recursos genéticos para a América Latina e Caribe, Londrina, pp 434-436.
- Soost RK, Cameron JW (1980) ‘Oroblanco’, a triploid pummelo-grafruit hybrid. *HortSci* **15**: 667-669.
- Soost RK, Cameron JW (1985) ‘Melogold’, a triploid pummelo-grafruit hybrid. *HortSci* **20**: 1134-1135.

- Swingle WT (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Weber HJ, Batchelor LD (eds) The Citrus Industry. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 190-430.
- Taketa S, Harrison GE, Heslop-Harrison JS (1999) Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theor Appl Genet* **98**: 1-9.
- Tanaka T (1961) Citrologia, semi-centennial commemoration papers on *Citrus* studies. Citrologia Supporting Foundation pp 114.
- Thomas HM, Harper MR, Meredith MR, Morgan WG, Thomas ID, Timms E, King IP (1996) Comparison of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorescence *in situ* hybridization. *Chrom Res* **4**: 486-490.
- Unfried I, Stocker U, Gruendler P (1989) Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Co10. *Nucleic Acids Res* **17**: 7513.
- Unfried I, Gruendler P (1990) Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **18**: 4011.
- Wakana A, Iwamasa M, Uemoto S (1981) Seed development in relation to ploidy of zygotic embryo and endosperm in polyembryonic *Citrus*. *Proc Int Soc Citricult* **1**: 35-39.



**Figura 1.** Representação diagramática da distribuição das bandas CMA<sup>+</sup>, fórmula cariotípica e dos sítios de DNAr 5S (➤) e 45S (●) nas seleções investigadas de lima ácida 'Tahiti'.





**Figura 2.** Complementos cromossômicos das seleções ‘Tahiti IAC 05’ (**b, d-f**) e ‘Tahiti CNPMF 2000’ (**a, g-i**). (**a, b, e, e h**) corados com CMA, (**d e g**) com DAPI e (**f e i**) hibridizados com sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho). A figura (**c**) mostra uma célula meiótica em metáfase-anáfase I irregular de ‘Tahiti CNPMF 2000’, corada com Giemsa. Cabeças de seta apontam os sítios de DNAr 5S. Tipos cromossômicos mais característicos são representados por letras. Barra corresponde a 5µm.

## **7. Conclusões gerais**

---

---

## Conclusões Gerais

No presente trabalho foram analisados citogeneticamente 32 acessos diplóides e dois triplóides de *Citrus* pertencentes aos grupos laranja-tangerina e lima-limão-cidra-pomelo. Com base nos resultados obtidos, chegou-se às seguintes conclusões:

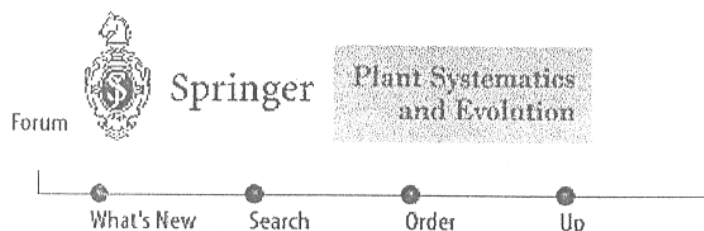
- 1) A grande diversidade nos padrões de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> e a alta heteroziguidade observada sugerem uma origem híbrida para a maioria dos acessos de tangerinas analisados;
- 2) A presença de um cromossomo tipo A em heterozigose na cultivar Murcott coloca em dúvida sua origem a partir do cruzamento entre *C. sinensis* e *C. reticulata*, sendo mais provável a participação de *C. aurantium* como uma de suas espécies ancestrais, uma vez que estas espécies possuem um cromossomo tipo A em seu cariótipo;
- 3) A análise comparada do padrão de bandas CMA entre as cultivares de tangerinas analisadas indica as espécies *C. sunki* e *C. reshni*, além de algumas cultivares do grupo das Mediterrâneas (*C. deliciosa*) (grupo II), como os mais prováveis representantes do genoma basal de *C. reticulata* (sensu Swingle);
- 4) A similaridade no padrão de bandas CMA e na localização dos sítios de DNAr 5S e 45S reforça a indicação do surgimento das cultivares de *C. limon* e *C. paradisi* por mutação somática a partir de um único germoplasma;
- 5) A presença do cromossomo tipo G em *C. aurantifolia* sugere, em sua origem, ou a participação de genoma estranho ao subgênero *Citrus* ou surgimento por inversão subterminal na hetero/eucromatina de um cromossomo tipo D ou, ainda, realocação de heterocromatina na região subterminal de um cromossomo do tipo F<sub>L</sub><sup>+</sup>;

- 6) A observação de pequenos sítios de DNAr 45S, nos mesmos tipos cromossômicos, em *C. jambhiri* e *C. volkameriana* indica uma maior similaridade entre essas supostas “espécies” em relação a outras espécies do grupo dos limões;
- 7) A presença de um par de cromossomos tipo A em limão ‘Ponderosa’ sugere um maior distanciamento dessa cultivar com os limões e uma maior proximidade com as toranjas *C. grandis* e pomelos *C. paradisi*;
- 8) A presença de cariótipos em homozigose para todos os pares cromossômicos em *C. medica* e *C. grandis* suporta a indicação dessas espécies, juntamente com *C. sunki* e *C. reshni*, como espécies verdadeiras do subgênero *Citrus*;
- 9) A análise comparativa do padrão de bandas da lima ácida ‘Tahiti IAC 05’ com acessos diplóides de *Citrus* previamente analisados sugere, mais provavelmente, uma origem a partir do cruzamento entre um gameta  $n$  de *C. limon* e um  $2n$  de *C. aurantifolia*;
- 10) A presença de um cromossomo D/45S em ‘Tahiti IAC 05’, não encontrado nos acessos diplóides previamente analisados, indica o surgimento desse cromossomo por perda do sítio de DNAr 5S, uma vez que a lima ácida ‘Tahiti’ é considerada uma espécie derivada;
- 11) As diferenças cariotípicas entre as seleções analisadas de ‘Tahiti’ podem ter sido causadas por alterações estruturais, com redistribuição de heterocromatina CMA<sup>+</sup> e dos sítios de DNAr, durante a formação do ‘Tahiti CNPMF 2000’, provavelmente devido a mutações somáticas em um embrião nucelar.

## **8. Anexos**

---

---



## Instructions for Authors

### Technical instructions for manuscripts and illustrations in electronic form (in pdf)

#### Copyright Transfer Statement

Authors transfer the copyright on their articles to Springer-Verlag effective if and when each article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive and unlimited rights to reproduce and distribute the article in any form (printing, electronic media or any other form); it also covers translation rights for all languages and countries. For U.S. authors the copyright is transferred to the extent transferable.

Manuscripts should be sent to the Editorial Assistant, to the Editor-in-Chief or to one of the Associate Editors:

Prof. Dr. Konrad Bachmann, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany ([bachmann@IPK-gatersleben.de](mailto:bachmann@IPK-gatersleben.de)).

Prof. Dr. Jorge V. Crisci, Division Plantas Vasculares, Museo de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque, La Plata 1900, Argentina ([jcrisci@netverk.com.ar](mailto:jcrisci@netverk.com.ar)).

Prof. Dr. A. Dafni, Lab. of Pollination Ecology, Institute of Evolution, Haifa University, Haifa 31905, Israel ([adafni@research.haifa.ac.il](mailto:adafni@research.haifa.ac.il)).

Prof. Dr. Peter K. Endress, Institute of Systematic Botany, University of Zurich, Zollikerstrasse 107, CH-8008 Zurich, Switzerland ([pendress@systbot.unizh.ch](mailto:pendress@systbot.unizh.ch)).

Prof. Dr. Else Marie Friis, Department of Palaeobotany, Swedish Museum of Natural History, Box 50007, S-10405 Stockholm, Sweden ([else.marie.friis@nrm.se](mailto:else.marie.friis@nrm.se)).

Prof. Dr. Frank H. Hellwig (Editor-in-Chief), Institut für Spezielle Botanik, Botanischer Garten und Herbar Haussknecht, Universität Jena, Philosophenweg 16, D-07743 Jena, Germany ([hellwig@otto.biologie.uni-jena.de](mailto:hellwig@otto.biologie.uni-jena.de)).

Prof. Dr. Michael Hesse, Institut für Botanik der Universität Wien, Rennweg 14, A-1030 Wien, Austria ([michael.hesse@univie.ac.at](mailto:michael.hesse@univie.ac.at)).

lines.

**Small print.** Footnotes, Material and methods sections, Acknowledgements, References, Tables, and figure legends should be marked for small print.

**Scientific names.**

*Italics* should be used for names at generic and lower taxonomic rank, but not for names at higher ranks.

**Units and symbols.** Temperatures may be expressed in degrees Celsius, time in seconds (s), minutes (min), hours (h), days (d). Otherwise, the International System of Units (SI) should be used.

**Standard chemical symbols and abbreviations** for chemical names may be used if they are concise and widely accepted, see Eur J Biochem (1993) 213: 1-3

Gene symbols must be written in lower case *italics* as e. g. *rbcL*, *matK*.

Protein symbols designated on the basis of gene names are written with first or all letters capitalized and in roman type.

**Footnotes** to the text should be numbered consecutively.

**Literature citations** in the text should be by author(s) and year. Where there are more than two authors, only the first should be named, followed by „et al.“.

Example: ... has been investigated by Sorensson (1993) and Sorensson and Brewbaker (1994) ... Yang et al. (1992) have shown .....

The list of **references** should include only publications cited in the text. They should be in alphabetical order by name of the first author with all authors and the complete title of each work cited. Citation must obey the same rules as for the main text. The second and subsequent lines are indented.

Examples are:

- a) Articles from journals and other serial publications: Knapp S., Persson V., Blackmore S. (1998) Pollen morphology and functional dioecy in *Solanum* (Solanaceae). Plant Syst. Evol. 210: 113–139.
- b) Articles from non-serial collective publications (symposia volumes, encyclopedias, etc.) and books: Verma D. P. S., Nadler K. (1984) Legume-*Rhizobium* symbiosis: host's point of view. In: Verma D. P. S., Hohn T. (eds.) Genes involved in microbe-plant interactions. Springer, Wien New York, pp. 57–93 (Plant gene research).

For standardization of formats, authors are requested to adhere to the following: in Literature Cited, use of abbreviations of journals contained in B-P-H (G. H. M. Lawrence, A. F. G. Buchheim, G. S. Daniels and H. Dolezal, eds., 1968, Botanico-Periodicum-Huntianum, Hunt Botanical Library, Pittsburgh), including Supplementum; (G. D. R. Bridson and E. R. Smith, eds., 1991, B-P-H/S, Hunt Institute for Botanical Documentation, Pittsburgh); in taxonomic treatments, use of book abbreviations from TL-II (F. A. Stafleu and R. S. Cowan, 1976–1988, Taxonomic Literature, ed. 2, vols. 1–7, Bohn, Scheltema & Holkema, Utrecht; plus Supplements); throughout the text, use of taxonomic author abbreviations from Authors of Plant Names (R. K. Brummitt and C. E. Powell, eds., 1992, Royal Botanic Gardens, Kew).

It is recommended that the work be divided into Introduction (without heading), Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements (without heading) and References.

Details must be given about origin and determination of each organism studied. Scientific (Latin) names should conform to the international rules of nomenclature. Authors of species and infraspecific taxa investigated must be given either when first mentioned in text or included all in one of the tables. In principal, voucher specimens are to be deposited in a large public herbarium quoted using the abbreviation given in the “Index Herbariorum”.

Data matrices including sequence alignments must be made available to the public. There must be a

sentence included in the Materials and methods section that such information is available from the corresponding author. „DNA or proteine sequences must be deposited in public data bases (GenBank, EMBL, etc.) before the revised version is sent to the editor.“

### 3. Tables

Tables should be numbered consecutively with arabic numbers. Footnotes to tables should be indicated by lower case superscript letters, beginning with a in each table.

### 4. Illustrations

The number of illustrations should be kept at the minimum needed to clarify the text. Double documentation of the same points in figures and tables is not acceptable.

All figures should be numbered consecutively. Halftone illustrations should be submitted as sharp, glossy, high-quality photographic prints. Line drawings should be supplied as black-and-white drawings suitable for reproduction. Figures that are to appear together should be either photographed as a group or mounted together on flexible white drawing paper (0.4 mm thick, about 300 g/m<sup>2</sup>). All figures should be trimmed at right angles and be of a size permitting direct printing: no more than 7.6 cm across for column width, no more than 15.9 cm for page width, no higher than 22.7 cm. (The publisher reserves the right to reduce illustrations.)

Illustrations can be published in colour only if authors agree to bear some of the extra costs for reproduction and printing.

In line drawings all lines should be of uniform thickness; letters and numbers should be of professional quality and proper dimensions (approx. 2 mm high after reduction). Computer drawings are acceptable provided they are of comparable quality to line drawings. Photographs should exhibit high contrast. Arrows, letters and numbers should be inserted with template rub-on letters. Illustrations showing organisms or their details should have an internal scale with the dimensions stated in the legend.

**Legends** should be typed on a separate sheet. Each legend should be explanatory and meaningful without reference to the text.

### 5. Proofs, Offprints

For all papers page proofs will be sent as PDF files to the authors. Misprints only should be corrected, and no changes of contents or style should be made on the page proofs. Costs caused by changes or revisions in the page proofs – other than those resulting from printer's errors – exceeding 10 per cent of the typesetting costs will be charged to the author.

Springer will supply the corresponding author with 100 offprints of each paper free of charge. Additional offprints may be ordered at cost price. A price list and an order form will be sent with the proofs. The filled-in order form should accompany the corrected proofs when they are returned.

**All business communications and all correspondence concerning technical details, financial items, and offprints should be addressed directly to Springer-Verlag, Production Department, Sachsenplatz 4-6, P. O. Box 89, A-1201 Wien, Austria (Fax +43/1/330 24 26-64; e-mail: [petra.naschenweng@springer.at](mailto:petra.naschenweng@springer.at)).**



## *Chromosome Research*

*The International Journal for all aspects of Chromosome and Nuclear Biology*

[http://ipsapp009.lwwonline.com/journals/KAP\\_CHRO/texts/KapLogo.gif](http://ipsapp009.lwwonline.com/journals/KAP_CHRO/texts/KapLogo.gif)

**Submission of manuscripts:** Manuscripts may be sent to any of the Associate Editors or to the Editor-in-Chief. 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:** Manuscripts may be submitted as hard copy, in which case 3 copies of the manuscript and of all illustrations should be supplied. They may also be submitted on floppy disk or CD ROM (PC formatted please) accompanied by one hard copy, or they may be submitted as e-mail attachments, in which case no hard copy is required until after the manuscript has been accepted for publication. If the manuscript is submitted as an e-mail attachment and the editor is unable to open the attachment successfully, the author will be asked to immediately send the manuscript in some other form. When a manuscript is accepted for publication, the editor will require the entire final revised manuscript, if possible including all illustrations, on floppy disk or CD, plus one immaculate hard copy of the full text and one set of high quality glossy prints of all illustrations, printed to a standard that the author considers to be optimal. Detailed instructions for preparing disk versions of accepted manuscripts can be found on the journal's Website.

**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.

#### 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. One page of colour per paper is provided free of charge; further colour pages are invoiced at EURO 340.00 (c. USD 350.00) for each page, regardless of the number of figures on it. Magnifications must be shown by scale bars and any lettering should be in lower case Helvetica bold type, approximately 3 mm in height (12 or 14 point type size). Photomicrographs should be submitted at the correct size for final reproduction. They should be cropped as close as possible to the area of interest and should be 76, 106 or 160 mm wide (half, two-thirds or full page width), not exceeding 215 mm in depth. Where two or more photographs are mounted together on one page, they should be separated by 2-3 mm of white space. The complete montage must conform to the dimensions given above. Glossy prints

must be of high quality, with as much contrast as the subject allows. Electronic files must be provided as EPS, JPEG or TIFF, on 1.44 MB 3.5-inch disc, 100 MB ZIP disc, or CD-ROM in PC or MAC format.

**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:**

**1. 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

**2. 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/elecref.html>

One of the most complete sites on citing electronic sources is the UCL Library Services page at: <http://www.ucl.ac.uk/Library/citing.htm>

**Copyright:** Copyright in articles published in this journal is the property of Kluwer Academic Publishers to the extent transferrable. 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<sup>4</sup>

**Proofs:** The corresponding author will be sent proofs of text for checking and must return their corrections within 48 hours. Printers' errors only may be corrected; any other alterations may be charged to the author. If authors' proofs are not returned in time, proofreading will be carried out by the Publisher, but neither the Editors nor the Publisher shall be responsible for

any errors. Authors will not be sent proofs of their illustrations. These are, however, carefully and critically examined by the Editor-in-Chief, who sets the highest standards for reproduction of all artwork. The Editor-in-Chief always consults the author(s) if there are any problems or doubts in this regard.

**Offprints:** Fifty free offprints of each paper are provided. Authors may order additional offprints on the form which accompanies the proofs.

Publishers' Office:

Kluwer Academic Publishers

PO Box 55, Lancaster, LA1 1PE, United Kingdom

Phone: +44 (0) 1524 34996; Fax: +44 (0) 1524 32144

E-mail: [mail@kaplanc.co.uk](mailto:mail@kaplanc.co.uk)

Copyright © 2001, Kluwer Academic Publishers. All rights reserved.