

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

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO EM *Citrus*: ANÁLISES EVOLUTIVAS E
INTEGRAÇÃO COM DADOS GENÔMICOS**

SANDRA MENDES DA SILVA

RECIFE

2016

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

**MAPEAMENTO CITOGÊNÉTICO EM *Citrus*: ANÁLISES EVOLUTIVAS E
INTEGRAÇÃO COM DADOS GENÔMICOS**

Tese apresentada por Sandra Mendes da Silva ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, como um dos requisitos para a Obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal, Área de concentração Sistemática e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Pedrosa-Harand

Dept. de Botânica, UFPE

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Sandra Mendes da

Mapeamento citogenético em *Citrus*: análises evolutivas e integração com dados genômicos/ Sandra Mendes da Silva– Recife: O Autor, 2016.

102 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Andrea Pedrosa-Harand

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Vegetal, 2016.

Inclui referências

1. Genética vegetal 2. Tangerina 3. Filogenia I. Pedrosa-Harand, Andrea (orientadora) II. Título

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-201

SANDRA MENDES DA SILVA

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO EM *Citrus*: ANÁLISES EVOLUTIVAS E
INTEGRAÇÃO COM DADOS GENÔMICOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof^o. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza, Dept^o. Botânica, CCB, UFPE

Prof^a. Dra. Ana Christina Brasileiro-Vidal, Dept^o. Genética, UFPE

Prof^a. Dra. Ana Emília Barros e Silva, Dept^o. Ciências Biológicas, UFPB

Prof^o. Dr. Reginaldo Carvalho, Dept^o. Biologia, UFRPE

Membros suplentes:

Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho, Dept^o Botânica, UFPE

Prof^a. Dr^a. Neide Santos, Dept^o. Genética, UFPE

À minha Mãe e ao meu Irmão (Em memória)

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu Bom Deus pela vida!

Aos meus familiares, em especial minha mãe que sempre me incentivou a não desistir mesmo quando todas as circunstâncias me diziam não: Obrigada!

À FACEPE, pelo suporte financeiro, e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da UFPE.

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

Ao longo desses anos tive a oportunidade de compartilhar inúmeras experiências com pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

Inicialmente, quero fazer um agradecimento muito especial à minha orientadora Andrea Pedrosa-Harand, não apenas pela excelente orientação, mas pela ótima convivência no laboratório, pelos inúmeros conselhos de perseverança e apoio nos momentos mais difíceis. Tenho a certeza que você foi um dos principais pilares para a minha volta as atividades quando eu não mais acreditava ser possível. Meu coração será eternamente grato a todo carinho e paciência: Muito Obrigada, você é um exemplo pra mim, de força, dedicação e humanidade!

Gostaria também de agradecer a Marcelo Guerra pela oportunidade de poder trabalhar em um laboratório de alto nível. Muito Obrigada!

Agradeço a grande culpada por ter me apaixonado por |Citogenética: Ana Paula Moraes... Meu muito obrigado pelos ensinamentos iniciais no laboratório e por ter apresentado esse universo de pesquisa de forma simples e clara.

Agradeço a Artur Fonsêca pela grande amizade durante o doutorado, pelas conversas, conselhos, apoio e carinho (muito carinho!). Ganhei um irmão pra todas as horas!

Agradeço ao Gustavo e a Magdalena pela amizade e suporte nos momentos de dúvidas (Muitas dúvidas!).

Aos meus amigos do laboratório que conviveram comigo diariamente: Lili (minha rosa azul), Silvokleio, Lidiane, Mariana (minha brabinha), Nice, Tiago Ribeiro (afeto, hehehe), André, Tiago Esposito, Thallitha (Tha), Maria Eduarda (Duda), Jessica, Álex, Carol, Brena, Lívia, Daniela, Elivânia (sorriso). Muito Obrigada!

Não poderia deixar de agradecer ao Hildebrando, que mesmo me chamando de topeira atômica, sempre esteve disponível e não media esforços a me ajudar com as burocracias necessárias: Muito Obrigada!

RESUMO

Citrus é um gênero de grande importância econômica na fruticultura mundial. As espécies desse grupo apresentam $2n = 18$, e embora seus cromossomos sejam pequenos e similares, o grupo é bem caracterizado citogeneticamente. Recentemente, o sequenciamento genômico total foi obtido para alguns de seus representantes. Assim como as análises citogenéticas realizadas no grupo, esses dados são importantes para entender as complexas relações entre suas espécies puras e híbridas e auxiliar no seu melhoramento. Com o objetivo de ancorar os dados genômicos com o mapa citogenético disponível para a tangerina *Citrus reticulata* Blanco, espécie considerada parental de diversos híbridos de importância econômica como, por exemplo, a laranja-azedada (*Citrus aurantium* L.) e a tangerina *C. clementina* Hort. ex Tan., 13 novos clones genômicos BACs (cromossomos artificiais de bactérias) foram mapeados por hibridização *in situ* fluorescente (BAC-FISH). Adicionalmente, sete BACs previamente mapeados foram ancorados nos *scaffolds* através de suas sequências. Assim, o presente trabalho apresenta a correlação entre os *scaffolds* e cromossomos de tangerina, permitindo aprofundar estudos comparativos e de genômica estrutural no grupo. Além disso, o presente trabalho também analisou a origem da laranja-azedada por meio dos BACs 28A07 e 32G14, previamente mapeados em seus parentais (*C. reticulata* e *C. maxima*), bem como verificou a variabilidade cariotípica em nove acessos dessa espécie e em *C. natsudaidai*, espécie proximamente relacionada, por meio de bandeamento CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 5S e 45S. Os dados obtidos corroboram sua origem a partir de cruzamento de *C. reticulata* e *C. maxima*, porém indicam diversas alterações cromossômicas surgidas no híbrido após uma ou múltiplas origens.

Palavras-Chave: *C. reticulata*, *C. aurantium*, BAC-FISH, mapa físico, origem híbrida.

ABSTRACT

Citrus is a genus of great economic importance in world horticulture. The species of this group have $2n = 18$, and although their chromosomes are small and alike, the group is well characterized cytogenetically. Recently, the whole genome sequence of some of its representatives became available. As the cytogenetic analyses, these data are important for understanding the complex relationships between their pure and hybrid species and for assisting their breeding programs. Aiming to anchor the genomic data with the available cytogenetic map of the mandarin *Citrus reticulata* Blanco, a species considered ancestral to several hybrids of economic importance as, for example, sour orange (*Citrus aurantium* L.) and *C. clementine* Hort. Tan ex., 13 new genomic BAC clones (bacterial artificial chromosomes) were mapped by fluorescence *in situ* hybridization (BAC-FISH). In addition, seven previously mapped BACs were anchored in scaffolds through their sequences. Thus, this study shows the correlation between the mandarin scaffolds and chromosomes, allowing further comparative studies and structural genomics in the group. In addition, this study also examined the origin of sour orange using BACs 28A07 and 32G14, previously mapped in their ancestrals (*C. reticulata* and *C. maxima*), as well as the karyotype variability in nine accessions of this species and one of *C. natsudaidai*, a closely-related species, using CMA/DAPI banding and FISH with 5S and 45S rDNA probes. The data confirmed its origin from *C. reticulata* and *C. maxima*, but indicate various chromosomal changes arising in the hybrid after one or multiple origins.

Keywords: *C. reticulata*, *C. aurantium*, BAC-FISH, physical map, hybrid origin.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
2.1. O gênero <i>Citrus</i>	3
2.1.1. Origem e Distribuição geográfica.....	3
2.1.2. Importância Econômica.....	4
2.1.3. Taxonomia.....	5
2.1.4. Filogenia do Gênero <i>Citrus</i>	6
2.1.5. Estudos Genéticos e genômicos no gênero <i>Citrus</i>	9
2.1.5.1. Mapeamento Genético.....	9
2.1.5.2. Sequenciamento Genômico.....	10
2.2. Citogenética.....	11
2.2.1. Citogenética Clássica.....	11
2.2.2. Caracterização da Heterocromatina.....	13
2.2.3. Hibridização <i>in situ</i>	17
2.2.4. Mapeamento Citogenético.....	19
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
4. MANUSCRITOS.....	33
4.1. MANUSCRITO 1: Integração entre a sequência genômica e o mapacitogenético de tangerina (<i>Citrus reticulata</i> Blanco).....	34
4.2. MANUSCRITO 2: Variabilidade cariotípica da Laranja azeda (<i>Citrus aurantium</i> L.) e a origem do seu cariótipo heteromórfico.	63
5. CONCLUSÕES.....	90
6. Normas de envio à revista <i>Tree Genetics & Genomes</i>	92

1. APRESENTAÇÃO

O gênero *Citrus* L. (Rutaceae) compreende muitas espécies com grande importância econômica na fruticultura mundial, destacando-se especialmente pela produção de suco concentrado. No entanto, o grupo é ainda pouco resolvido do ponto de vista taxonômico (revisado pela última vez por Swingle e Reece 1967) e a divergência quanto ao número de espécies é atribuída a fatores relacionados às suas características reprodutivas, tais como a formação de embriões apomíticos, baixo isolamento reprodutivo entre seus representantes e alguns gêneros próximos, somado ao longo histórico de cultivo (Cameron e Frost, 1968; Davies e Albrigo, 1994; Moore, 2001).

Citogeneticamente, as espécies do gênero *Citrus* são reconhecidas por serem diploides com número básico $x = 9$ ($2n = 18$). Apresentam cariótipos simétricos formados por cromossomos pequenos, meta- ou submetacêntricos, que não podem ser reconhecidos por coloração convencional. No entanto, com a dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando as sondas para o DNAr 5S e 45S foi possível evidenciar marcas citológicas que permitiram caracterizar as várias espécies deste grupo, distinguindo as puras com cariótipo homomórficos daquelas híbridas que apresentam cariótipos heteromórfico, como a laranja-azeda (*C. aurantium*), por exemplo (Guerra, 1993; Carvalho *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2007 a,b). Além disso, essas técnicas podem auxiliar na confirmação dos possíveis parentais desses híbridos, além de possibilitar os estudos sobre variabilidade cariotípica intraespecífica entre cultivares.

Essas técnicas apresentam, no entanto, uma limitação quanto à identificação de todos os pares cromossômicos em *Citrus*, o que só foi possível após o emprego da FISH utilizando como sonda sequências genômicas cópia única clonadas em vetores BACs

(cromossomos artificiais de bactérias), Moraes e colaboradores (2008), utilizando 13 BACs selecionados a partir de uma biblioteca genômica de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., uma espécie relacionada ao gênero *Citrus*, conseguiram identificar seus nove pares de cromossômicos homólogos. Esse trabalho abriu novas perspectivas para a realização de estudos citoevolutivos por meio da comparação dos mapas citogenéticos entre os gêneros *Poncirus* e *Citrus* (Mendes *et al.*, 2011), embora o detalhamento da análise seja limitado pelo pequeno número de marcadores disponíveis e pelo fato da maioria dos BACs mapeados não serem relacionados a genes ou marcadores de interesse nem têm sua sequência conhecida.

Recentemente, Terol *et al.*, (2008) construíram três bibliotecas de BACs para a espécie *Citrus clementina* var. *Clemenules*, uma das tangerinas mais relevantes no mercado de frutas frescas. A disponibilidade dessas bibliotecas auxiliou no sequenciamento de alta qualidade do seu genoma total e outras espécies do grupo dos *Citrus* pelo Consórcio Internacional (Wu *et al.*, 2014). Além do mais, esses BACs podem ser usados no mapeamento citogenético para integrar a sequência genômica à estrutura cromossômica e como marcadores para possibilitar análises comparativas mais robustas.

Visando compreender a estrutura e evolução genômica dos citros, o presente projeto teve como objetivos: (1) a construção de um mapa citogenético para *Citrus reticulata*, possível parental de *C. clementina*, correlacionado às informações genômicas disponíveis, (2) a análise da variabilidade cariotípica entre as laranjas-azedas (*C. aurantium* L.), bem como (3) a confirmação de sua possível origem através de BACs previamente hibridizados nas espécies puras.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. O gênero *Citrus* L.

2.1.1. Origem e distribuição geográfica

o gênero *Citrus* L., o qual pertence a família Rutaceae, apresenta seu centro de origem no Sudeste da Ásia, chegando até o arquipélago da Malásia, tendo sido introduzido por populações humanas para outras áreas do mundo (Moore 2001). O gênero *Citrus* se distribui naturalmente em uma extensa região que inclui o sudeste da Ásia, leste da Índia, norte de Burma e sudeste da China, com exceção dos pomelos (*Citrus paradisi* Macf), que tiveram sua origem, mais recentemente, no Novo Mundo (Gmitter e Hu, 1990; Sauer, 1993; Moore, 2001). Seu cultivo se iniciou há aproximadamente três mil anos atrás, sendo a cidra (*Citrus medica* L.) a primeira espécie a ser introduzida na Europa (Webber, 1967, Moore, 2001). Por volta de 1.150 d.C., a laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e os limões (*C. limon* (L.) Burm.F.) foram introduzidos nos continentes Europeu e Africano, entretanto, suas origens ainda continuam desconhecidas. Acredita-se que os limões tenham se originado no Sudeste da Ásia e que aparentemente tenham tido a mesma rota de introdução na Europa que a laranja doce, por Cruzadas. As tangerinas (*C. reticulata* Blanco) apresentam sua origem a partir de tangerinas silvestres da Índia, sendo introduzidas na Europa no século XIX (Koller, 1994).

A introdução dos citros nas Américas se deu durante o período das grandes navegações, por meio de sementes ou partes de plantas trazidas da Ásia (Moore, 2001). No Brasil, essa introdução ocorreu em meados do século XVI pelas expedições

colonizadoras. Os primeiros relatos de cultivos datam de 1.540, na ilha Cananéia - São Paulo (Moreira 1991).

2.1.2. Importância econômica

Várias espécies de *Citrus* como as laranjas (*C. sinensis* L. Osbeck, *C. aurantium*), tangerinas (*C. reticulata* ‘Cravo’, *C. clementina* ‘Clemenules’, entre outras), pomelos (*Citrus paradisi* Macfadyen), cidra (*C. medica* L.), limas (*C. aurantifolia*) e limões (*C. limon* L. Burmann) são apreciadas por seus frutos comestíveis e óleos essenciais, com uma produção mundial excedendo 94 milhões de toneladas (FAO, 2015). Seus frutos podem ser consumidos *in natura* ou industrializados. Em todo o mundo, a produção anual de todas as espécies de citros se situa atualmente em torno de 94 milhões de toneladas, cobrindo uma área de aproximadamente 7,5 milhões de hectares. Isso é o resultado de um incremento de 50% da produção obtida durante o final dos anos 1980 e início dos anos 1990. Em torno de 60% de toda a produção de citros são laranja e 23% tangerinas, clementinas e satsumas (ponkans) (FAO, 2015).

No Brasil, a área plantada com frutas cítricas é de aproximadamente 1 milhão de hectares e a produção supera 19 milhões de toneladas, a maior do mundo há quase 20 anos (FAO, 2015). A produção se concentra na região sudeste, com destaque para São Paulo com 80% da produção brasileira. A região nordeste responde por 8,65% da produção nacional e 12,7% de área colhida. O Brasil produz um quarto da produção mundial de citros, sendo que 75% destes são destinados ao processamento para produção de suco concentrado. A China e os EUA são também grandes produtores (17,6 e 11 milhões de toneladas, respectivamente). Juntos, Brasil e EUA respondem por mais

de 90% da produção mundial de suco de laranja. Na região mediterrânea, em torno de 22 milhões de toneladas de citros são produzidas, sendo destinadas principalmente para o consumo de frutos frescos. Espanha, Itália, Egito, Turquia e Grécia são os líderes nessa região.

2.1.3. Taxonomia

O gênero *Citrus* pertence à tribo Citreae, da subfamília Aurantioideae que compõe a família Rutaceae. O gênero apresenta uma taxonomia bastante complexa devido às fracas barreiras reprodutivas que levam ao surgimento de híbridos viáveis entre as espécies e alguns gêneros próximos. Outro fator importante que colabora com essa complexidade é o fenômeno da poliembrionia nucelar, a qual forma embriões a partir do tecido nucelar materno, levando à perpetuação de híbridos como clones apomíticos, mantendo sua constituição genética. Esses fatores, somados ao longo histórico de cultivo e seleção de mutantes somáticos, são os principais fatores da complexidade taxonômica deste gênero (Araújo e Roque, 2005).

Os principais sistemas de classificação utilizados são os propostos por W. T. Swingle e T. Tanaka (revisados por Swingle e Reece, 1967). Swingle (1943) subdividiu o gênero em dois subgêneros totalizando 16 espécies: *Papeda*, onde estão as espécies mais primitivas e sem valor comercial, e *Citrus*, que inclui as espécies de valor econômico. Tanaka (1977), entretanto, subdividiu o gênero nos subgêneros *Archicitrus* e *Metacitrus*, reconhecendo 162 espécies. Através da utilização da taxonomia numérica (Barrett e Rhodes, 1976) e de marcadores bioquímicos (Potvin *et al.*, 1983; Handa *et al.*,

1986), *C. medica* ‘Ethrog’, *C. reticulata* Blanco e *C. grandis* Osbeck (atualmente *C. maxima* L.) têm sido propostas como as espécies verdadeiras do gênero que teriam originado as espécies híbridas. Diversos trabalhos posteriores, destacando-se a análise com os marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) e DNAP (DNA plastidial) (Nicolosi *et al.*, 2000), dão suporte a essa hipótese.

As espécies de *Citrus* podem também ser reunidas em grandes grupos informais, com mais alta afinidade entre si. Asíns *et al.* (1998), por exemplo, baseados na diversidade isoenzimática de 198 cultivares de *Citrus* e gêneros próximos, separaram as espécies comerciais em dois grupos: o das limas, limões, cidras e pomelos (formados por *C. aurantifolia* Christm, *C. limon* (L.) Burm. F., *C. limettioides* Tan., *C. medica*, *C. maxima*, e *C. paradisi*), e o das tangerinas e laranjas (formado por *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. aurantium*).

2.1.4. Filogenia do gênero *Citrus*

Com o aprimoramento das técnicas moleculares, foi possível introduzir nos estudos do grupo análises filogenéticas baseadas em marcadores moleculares ou sequenciamento de DNA para entender as relações evolutivas entre suas espécies. Tais ferramentas têm contribuído não apenas para compreender as relações taxonômicas e filogenéticas dos citros, como também para conhecer a variabilidade genética existente entre seus representantes, aprimorando programas de melhoramento genético (Herrero *et al.*, 1996).

Os primeiros estudos moleculares na subfamília Aurantioideae foram realizados com marcadores isoenzimáticos, os quais foram empregados para distinguir embriões nucleares daqueles zigóticos (Xiang e Roose, 1988). Isoenzimas também possibilitaram dividir as cultivares de *Citrus* em dois principais grupos: um formado pelas laranjas e tangerinas e outro pelas limas, limões, cidra e pomelos (Asíns *et al.*, 1998).

Os estudos filogenéticos consideram Aurantioideae (Rutaceae) como um grupo monofilético (Morton, 2003; Bayer *et al.*, 2009). A classificação de Swingle e Reece (1967), uma das mais aceitas, divide Aurantioideae em duas tribos: Clauseneae e Citreae. Essa última inclui a subtribo Citrinae a qual é composta por seis gêneros (*Fortunella*, *Eremocitros*, *Poncirus*, *Clymenia*, *Microcitrus* e *Citrus*). Em 2001, Samuel e colaboradores, baseando-se em sequências do espaçador intergênico plastidial e íntron *rps16* e dados fitoquímicos, corroboraram o monofiletismo da subfamília Aurantioideae, porém sugeriram que a sua divisão clássica em duas tribos (Clauseneae e Citreae) somente era justificada se os gêneros *Murraya* e *Merrillia* fossem transferidos para a tribo Citreae.

Vários marcadores de DNA, tais como RFLP(*Restriction Fragment Length Polymorphism*), e SSR(*Simple Sequence Repeat*) foram empregados nos estudos do gênero *Citrus* visando esclarecer as relações filogenéticas entre suas espécies (Fang *et al.*, 1994). Marcadores bioquímicos e moleculares suportaram a proposta anterior de apenas três espécies puras no gênero (*C. medica*, *C. reticulata* e *C. maxima*; Scora, 1975; Barret e Rhodes, 1976), sendo as demais consideradas espécies de origem híbrida (Moore, 2001). A origem dos híbridos também foi investigada com marcadores moleculares. Federici e colaboradores (1998), utilizando marcadores RFLP e RAPD, investigaram as relações filogenéticas de 88 acessos de 45 espécies de *Citrus* e seis

gêneros relacionados. Os autores concluíram que a cidra (*C. medica*) está envolvida na origem dos limões e limas; além disso, sugeriram que as tangerinas apresentam uma estreita relação genética e que a toranja tem relações com o subgênero *Papeda*. Análises utilizando outros marcadores (SCARs, SSRs e SNPs) corroboraram alguns desses achados, no entanto, as relações entre as espécies puras e espécies relacionadas apresentou divergência entre as várias análises (Nicolosi *et al.*, 2000; Barkley *et al.*, 2006; Ollitrault *et al.*, 2012a). Garcia-Lor e colaboradores (2013), utilizando marcadores SSR e InDel em espécies híbridas, observaram que as mesmas são como um mosaico de grandes fragmentos de DNA das espécies ancestrais, resultado de poucos eventos de recombinação. Esses mesmos autores, em 2013, utilizando marcadores moleculares do tipo SNPs, demonstraram que 44 acessos de citros puros ou verdadeiros, incluindo espécies de *Citrus*, *Papeda*, *Fortunella*, *Eremocitrus* e *Poncirus*, formaram clados com alto suporte. Como conclusão, eles apontam *C. reticulata* como grupo irmão de *Fortunella* e *Poncirus*, separado do grupo formado por *C. medica*, *C. maxima* e *C. micrantha*. Além disso, outras *Papedas* aparecem na base desse grande clado principal, mostrando que as mesmas não formam um grupo monofilético. Esses resultados corroboram parcialmente os resultados prévios de sequências gênicas plastidiais *rbcL*, porém discordam dos resultados encontrados por análises com marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (Barkley *et al.*, 2006; Pang *et al.*, 2007).

2.1.5. Estudos genéticos e genômicos no gênero *Citrus*

2.1.5.1. Mapeamento genético

Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento de marcadores moleculares viabilizou a construção de mapas genéticos para um número muito maior de espécies, inclusive de plantas. Sua construção inclui o estabelecimento de linhagens progenitoras e populações segregantes visando encontrar polimorfismos no nível do DNA. Através de análises estatísticas baseadas em frequência de recombinação é possível então estimar a ligação e a distância entre os diferentes marcadores (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os mapas genéticos estão entre as ferramentas moleculares mais importantes e têm sido construídos para várias espécies de interesse econômico como *Oryza sativa* (Harushima *et al.*, 1998), *Phaseolus vulgaris* (Gepts *et al.*, 2008) e *Poncirus trifoliata* (Gmitter *et al.*, 1996). Esses mapas fornecem um arcabouço para análises genômicas, facilitando a identificação de regiões que controlam caracteres de importância agrônoma.

Nos citros, vários tipos de marcadores genéticos vêm sendo utilizados na construção deste tipo de mapa, destacando-se RFLP, RAPD, AFLP e SSR (Liou *et al.*, 1990; Sankar e Moore, 2001; Simone *et al.*, 1998; Ling *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2007), possibilitando localizar genes e/ou locos de herança quantitativa (QTLs) associados, por exemplo, à tolerância ao frio (Cai *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2001) e à resistência ao vírus da tristeza (Gmitter *et al.*, 1996). Embora vários mapas de ligação tenham sido construídos para os citros, o baixo número de marcadores (pouco saturados) e a ocorrência do número de grupos de ligação diferentes do esperado dificultaram a compreensão de sua estrutura genômica. Recentemente, Ollitrault e colaboradores (2012) estabeleceram um mapa genético saturado de *C. clementina* com base em

marcadores SSR, SNP e Indels. Esse mapa tem sido referência para o grupo dos citros, pois facilitou a montagem do genoma total no projeto de sequenciamento.

2.1.5.2. Sequenciamento genômico

Em 2003, o Consorcio Internacional do Genoma de *Citrus* (ICGC) foi instituído com o objetivo de gerar uma sequência genômica completa de citros, visando auxiliar às pesquisas genéticas e seus programas de melhoramento. Para isso, várias ferramentas foram desenvolvidas: mapas genéticos de ligação integrados a mapas físicos, dados de ESTs, bibliotecas BACs (cromossomo artificial de bactéria), além de ferramentas de bioinformática (Gmitter *et al.*, 2012).

Inicialmente, *C. sinensis* cv. ‘Valencia’ foi selecionada como o genoma modelo para o sequenciamento, uma vez que essa espécie é amplamente conhecida, sendo uma das mais importantes economicamente. Esse acesso foi utilizado por um grupo independente de pesquisadores para o sequenciamento utilizando a plataforma Illumina GAII com o objetivo de se obter uma cobertura de 8-10× o tamanho do genoma. Em 2013, o projeto de sequenciamento deste genoma foi concluído e anunciado (Xu *et al.*, 2013). No entanto, devido a vários problemas relacionados a montagem de genomas altamente heterozigotos, o ICGC decidiu utilizar clones haploides de citros. Nesse contexto, três linhagens haploides da tangerina *Citrus clementina* ‘Nules’ foram geradas, caracterizadas e uma linhagem foi selecionada para sequenciamento (Aleza *et al.*, 2009). Recentemente, o ICGC publicou as sequências de nove espécies do gênero *Citrus* incluindo as sequências genômicas de *C. sinensis* e *C. clementina*. A principal diferença entre essas duas sequências genômicas, é que a primeira apresentou uma montagem mais fragmentada do que a da Clementina haploide. Em *C. clementina*, 301,4 Mb de *scaffolds* (L50 = 6,8 Mb) foram ancorados ao mapa genético da espécie,

representando 96% da montagem nos nove cromossomos dos citros, enquanto que a sequência do duplo haplóide de *C. sinensis* previamente publicado compreendia 327,8 Mb, mas um L50 de 1,8 Mb e uma ancoragem equivalente a 79%. Embora, encontramos diferenças quanto alguns parâmetros da montagem de sequências entre essas duas espécies, o número dos genes preditos nos dois casos é muito similar (~25.000), indicando uma boa cobertura dos espaços gênicos em ambas as montagens (Wu *et al.*, 2014).

2.2 Citogenética de *Citrus*

2.2.1 Citogenética clássica

A citogenética compreende os estudos relativos ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (Guerra, 1988). A utilização de dados citogenéticos na taxonomia vem sendo feita desde o início do século passado, como um dos instrumentos importantes na sistemática vegetal para a compreensão das relações de parentesco e dos mecanismos de evolução cromossômica, tanto em pequenas quanto em grandes categorias taxonômicas (Guerra, 1990).

O número cromossômico é o parâmetro mais utilizado na citogenética vegetal e a característica citológica para a qual se tem o maior número de informações. Variações nos números cromossômicos em citros são raras e se devem a poliploidia (multiplicação de todo o conjunto haplóide) (Araújo e Roque, 2005). Os primeiros estudos cromossômicos do gênero *Citrus* foram realizados por Strasburger em 1907. Nesse trabalho, o autor sugeriu $n = 8$ como o número cromossômico haplóide do gênero

(Raghuvanshi, 1962). Posteriormente Frost (1925) considerou o número cromossômico haploide como sendo $n = 9$. Essa diferença se deu possivelmente pelo pequeno tamanho dos cromossomos e pela técnica de preparação utilizada, levando a uma contagem equivocada. As espécies de citros não apresentam nenhuma variação numérica no nível diploide. Isso foi demonstrado por diversos trabalhos, inclusive por Guerra e colaboradores que realizaram um extenso estudo citogenético onde foram analisados 51 acessos de 20 espécies de citros, *Poncirus trifoliata* e sete híbridos interespecíficos (Guerra *et al.*, 1997).

Todas as espécies do gênero *Citrus* são diploides ($2n = 18$), com exceção do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tan.), que é triploide. (Araujo e Roque, 2005) A obtenção de híbridos triploides em citros é um objetivo importante do melhoramento, pois os frutos podem apresentar grande valor comercial por não produzir sementes. Indivíduos triploides são obtidos a partir da fusão de um gameta diploide ($2n$) com um gameta haploide (n). Em *Citrus*, tem sido mostrado que o gameta diploide é fornecido preferencialmente pela planta-mãe (Esen e Soost, 1971). O limão Tahiti é um triploide natural, provavelmente de origem híbrida (Carvalho *et al.*, 2005), que exemplifica bem as espécies poliploides com grande importância econômica.

Além do número e morfologia cromossômicos, os sítios ativos de DNAr, chamados regiões organizadoras de nucléolos (RONs), também podem ser detectados em coloração convencional como uma constrição secundária e, por serem frequentemente polimórficos, são intensamente estudados em citogenética quanto ao número, tamanho e localização no cromossomo (ver por exemplo Pedrosa *et al.*, 1997). Por isso, a RON pode ser bastante útil na caracterização de espécies e cultivares. Guerra *et al.* (1997), analisando 51 acessos de citros com coloração convencional Giemsa 2%,

observaram uma alta variação quanto ao número e posição da constrição secundária (RON). Em 19 acessos as constrições secundárias não foram evidentes, nos demais acessos variou de um a três por cariótipo, sendo localizadas na região de um a três pares do cromossomo maior, na região terminal/subterminal do cromossomo menor e/ou na região terminal sugerindo uma ativação cedo na intérfase, além de uma alta variação estrutural e heterozigidade do germoplasma dos citros

2.2.2 Caracterização da heterocromatina

Os genomas de plantas em geral apresentam uma grande fração de sequências repetitivas, podendo chegar a aproximadamente 90% do conteúdo total de DNA (Schwarzacher, 2003). Essas sequências podem estar dispostas tanto na forma dispersa, espalhadas por todo complemento genômico, quanto podem formar blocos de *repeats* em tandem. Embora a maioria seja não codificante, algumas famílias gênicas, como os sítios de DNAr são organizados em tandem, com unidades de repetição adjacentes umas às outras (Hemleben *et al.*, 2007).

Em Aurantioideae, os estudos com coloração convencional Giemsa ou Feulgen e bandeamento C demonstraram que muitas das espécies do grupo, apresentam cromossomos pequenos, similares e com grandes blocos heterocromáticos principalmente nas regiões terminais (Guerra, 1985). As técnicas de bandeamento foram informativas nas análises dos cromossomos das espécies do gênero *Citrus* porque facilitaram a caracterização dos mesmos. Contudo, a desvantagem da utilização desse método foi sua interferência na morfologia dos cromossomos. Além do mais, o padrão de bandas apresentou variações, inclusive em uma mesma lâmina.

Citologicamente, a heterocromatina também pode ser diferenciada quanto à sua composição por meio da utilização de corantes fluorescentes. Os fluorocromos mais utilizados no bandeamento cromossômico são o 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que cora preferencialmente regiões ricas em AT, e a cromomicina A₃ (CMA), corando preferencialmente regiões ricas em GC. Bandas obtidas com esses corantes são ditas DAPI⁺ e CMA⁺, respectivamente.

Em 1993, Guerra observou que a coloração CMA/DAPI é mais indicada nos estudos citogenéticos dos citros, que possuem grandes blocos CMA⁺/DAPI⁻, uma vez que preserva a morfologia cromossômica e por apresentar alta reprodutibilidade dos resultados. Os diferentes acessos de *Citrus* se apresentam extremamente polimórficos entre si em relação ao padrão de bandas heterocromáticas reveladas pela dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI permitindo, portanto, novas possibilidades para análises evolutivas no grupo (ver Guerra *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2007). De acordo com o número e a localização das bandas CMA⁺ nos cromossomos foi possível estabelecer uma classificação cromossômica para os citros. Inicialmente, cinco tipos foram descritos por Guerra (1993). Esses tipos cromossômicos foram posteriormente revistos e ampliados por Carvalho *et al.* (2005). Os tipos cromossômicos estão representados na Figura 1, sendo eles: tipo A (três bandas CMA⁺, duas terminais e uma proximal), B (duas bandas CMA⁺, uma terminal e uma proximal), C (duas bandas CMA⁺ terminais), D (uma banda terminal CMA⁺), E (uma banda CMA⁺ subterminal), F (sem banda), G (duas bandas CMA⁺, uma subterminal e uma terminal) e H (uma banda CMA⁺ proximal). Os tipos, A, B, C, E, G e H são raros e são ausentes em alguns acessos, por isso são úteis na diferenciação e são também chamados de cromossomos marcadores. Os tipos cromossômicos que aparecem em maior número e

em todos os acessos são o D e o F. Essa classificação foi bastante relevante, pois permitiu a diferenciação dos cariótipos das espécies puras, as quais apresentaram cariótipo homomórfico, como *Citrus reticulata* (2C+10D+6F), daquelas consideradas híbridas com cariótipo heteromórfico, como *C. sinensis* (2B+2C+7D+7F) (Guerra 2009).

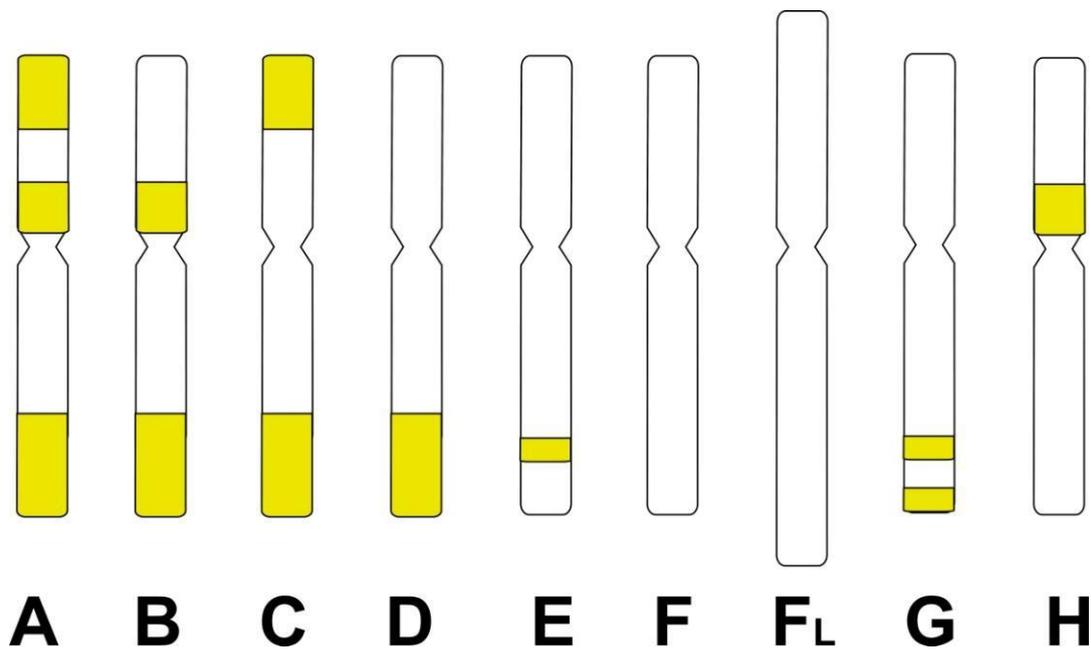


Figura 1: Tipos cromossômicos de *Citrus*, de acordo com o número e posição das bandas CMA⁺. As bandas CMA⁺ estão representadas em amarelo e os braços cromossômicos estão em branco (DAPI) (modificado a partir de Carvalho *et al.*, 2005).

Embora os blocos de heterocromatina sejam evidenciados como blocos contínuos em sua visualização citológica, estudos vêm demonstrando diferenças quanto a sua constituição, podendo conter aglomerados de DNA repetitivos intercalados com outras sequências (TAIC- *Arabidopsis* Sequencing Consortium 2000). Entre as sequências que podem estar presentes nessa fração, destacam-se as famílias de DNA satélites (DNAsat), essas podem ser cromossomo- específicos ou mesmo amplamente

distribuídas dentro do gênero (Hemleben *et al.*, 2007; Winterfeld and Röser 2007). A heterocromatina pode ser constituída não apenas por uma, mas por algumas famílias de DNA repetitivos distintas (Lim *et al.*, 2006).

Ingle e colaboradores (1973) observaram uma grande quantidade de DNA satélite (25%) em *Citrus*. Mais recentemente, algumas sequências satélites dos gêneros *Citrus* e *Poncirus* foram identificadas. Em 1992, Beridze e colaboradores conseguiram isolar o primeiro DNA satélite de *C. ichangensis*, o qual foi caracterizado com uma sequência consenso de 181pb e um alto conteúdo de GC (63%). Estudo posterior verificou a presença dessa família de DNA satélite em outras espécies, tais como *C. limon*, *C. sinensis*, *Poncirus trifoliata*, com variação tanto no tamanho do monômero (179–186 pb), quanto no conteúdo de GC (58.6%-68%) (Fann *et al.*, 2001). Essa grande representação, tanto nas espécies do gênero *Citrus* quanto nas do gênero *Poncirus*, e a grande quantidade de conteúdo GC sugeriam que essa família de DNA satélite seria o principal componente que constitui os blocos heterocromáticos CMA⁺. Barros e Silva *et al.* (2010) conseguiram comprovar que de fato esse DNA satélite, denominado CsSat181, fazia parte da maioria das bandas heterocromática CMA⁺/DAPI das espécies de *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*. Nesse trabalho, os autores observaram que alguns blocos não possuíam CsSat, nem sítios de DNAr 45S, sugerindo a possibilidade de que outras famílias de DNAsat possam estar relacionadas à formação das bandas heterocromáticas em Aurantioideae. A demonstração da composição dos blocos CMA⁺ foi possível com o uso da técnica de hibridização *in situ* fluorescente.

2.2.3 Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* (HIS) é uma das técnicas mais informativas usadas na citogenética atual. Consiste no isolamento de uma sequência de DNA marcada por uma molécula sinalizadora (sonda) e hibridizada no DNA ou RNA (alvo) existente nas células do organismo em estudo. Após o uso de fluorocromos, como molécula sinalizadora de sonda, a técnica de HIS ficou conhecida por FISH (fluorescent *in situ* hybridization) e se transformou em uma das técnicas mais informativas da citologia, sendo aplicada em áreas tão diversas quanto à biologia do desenvolvimento, a citotaxonomia, a citogenética clínica e o melhoramento genético (Guerra, 2004).

A técnica se baseia no fato de que o DNA é formado por duas fitas complementares, as quais podem ser facilmente separadas em fitas simples, ou desnaturadas, e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Se durante a renaturação do DNA cromossômico houver sonda disponível no meio em torno do cromossomo, as cópias de sondas, em quantidade muito maior, competirão com a fita de DNA cromossômico complementar e poderão ser hibridizadas *in situ*, isto é, no sítio exato onde aquela sequência ocorre naturalmente (Guerra, 2004).

As sequências mais comumente utilizadas no estudo do cariótipo são as de DNA repetitivo, em especial o DNA ribossomal (DNAr) 5S e 45S. Os sítios de DNAr 5S e 45S foram localizados por FISH em diversos gêneros como em *Hypochoeris* (Ruas *et al.*, 2005), *Phaseolous* (Pedrosa-Harand *et al.*, 2006) e *Poncirus* (Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007). Em *Citrus*, a utilização combinada da técnica de bandeamento CMA/DAPI juntamente com a hibridação *in situ* fluorescente possibilitou o aumento das marcas cromossômicas, levando a uma maior diferenciação dos cromossômicos em subtipos, como por exemplo, a identificação dos cromossomos F/5S para toranja, e D/5S-45S para

as tangerinas (Moraes *et al.*, 2007a). Em 2000, Pedrosa e colaboradores analisaram 10 cultivares de *Citrus sinensis* através do padrão de bandas CMA/DAPI e da localização dos sítios do DNAr 5S e 45S por hibridização *in situ*. Esses autores observaram um mesmo padrão de bandas CMA e a mesma distribuição dos sítios de DNAr para todas as cultivares, entretanto uma alta heterozigozidade cromossômica (heteromorfismo) foi encontrada, apoiando a conclusão de Barrett e Rhodes (1976) de que *C. sinensis* não é uma espécie verdadeira, e sim, um híbrido interespecífico. Matsuyama *et al.* (1996), através da FISH de DNAr e telomérico, caracterizou parte da heterocromatina constitutiva das regiões teloméricas dos cromossomos de *C. sinensis* 'Trovia', detectando nas extremidades dos cromossomos sequências teloméricas. Moraes *et al.* (2007) analisaram seis acessos de pomelos (*C. paradisi* Macf.) e, ao contrário do que se esperava, encontraram variações intraespecíficas quanto ao padrão de bandas e distribuição de sítios de DNAr 5S e 45S.

Outros dez acessos do grupo lima-limão-cidra-pomelo foram também analisados quanto ao padrão de bandas CMA/DAPI e à localização dos sítios de DNAr 5S e 45S (Carvalho *et al.*, 2005). As análises mostraram que as limas e limões foram heterozigóticos para todos os sítios de DNAr e que somente a cidra, *C. medica*, por possuir cariótipo homomórfico, poderia ser considerada uma espécie verdadeira, enquanto os outros nove acessos seriam híbridos.

As tangerinas são consideradas um grupo de espécies de *Citrus* que apresenta uma grande variação em caracteres morfológicos e moleculares, assim como no número de espécies. Moraes e colaboradores (2007), analisando 13 acessos de tangerinas através da coloração CMA/DAPI e da técnica de FISH com sondas de DNAr 5S e 45S, sugeriram que as tangerinas são citologicamente separadas em três grupos distintos: (1)

C. sunki e *C. reshi*, (2) tangerinas mediterrâneas, *C. deliciosa* e as espécies relacionadas a *C. tangerina* ‘Dancy’ e *C. reticulata* ‘Cravo’, (3) demais cultivares consideradas híbridos interespecíficos. Além disso, esses autores identificaram um cromossomo marcador para as espécies de tangerina: um cromossomo do subtipo D/5S-45S, bem como, sugeriram a ausência e presença do cromossomo B como um marcador citogenético adicional para distinguir entre os dois principais grupos de tangerinas.

2.2.4. Mapeamento citogenético

A utilização de marcadores cromossômicos formados a partir de clones de DNA genômico com grandes insertos cópia simples pela técnica de FISH tem possibilitado a identificação cromossômica e o estabelecimento de mapas citogenéticos em diversos grupos vegetais (Fransz *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001b; Kim *et al.*, 2005). Dentre os clones utilizados para essa estratégia se destacam os BACs (cromossomos artificiais de bactérias), os quais foram utilizados na construção de mapas em diversas espécies como batata (Dong *et al.*, 2000), arroz (Cheng *et al.*, 2001a, b) e sorgo (Kim *et al.*, 2005). Tão importante quanto a contribuição dessa estratégia para a identificação cromossômica e o estabelecimento de um mapa físico integrado à estrutura cromossômica é a possibilidade de se realizar mapeamentos comparativos utilizando os BACs marcadores de uma espécie em representantes de gêneros próximos. Esses marcadores permitem identificar as homeologias existentes, bem como possibilitam associar regiões envolvidas em rearranjos cromossômicos a eventos de evolução cariotípica. A FISH com sondas BACs foram utilizadas em pinturas cromossômicas em *Arabidopsis thaliana* (Lysak *et al.*, 2003), permitindo estabelecer os mecanismos responsáveis pela

redução do número cromossômico ancestral de Brassicaceae, $n = 8$, na origem do $n = 5$ em *Arabidopsis* (Lysak *et al.*, 2006).

Atualmente, várias bibliotecas de BACs estão disponíveis, principalmente para as espécies de grande interesse agrônomico como os citros (Gmitter *et al.*, 1996; Kami *et al.*, 2006). Moraes *et al.* (2008), utilizaram BACs da biblioteca genômica de *Poncirus trifoliata*, uma espécie próxima ao gênero *Citrus*, e conseguiram identificar os nove pares cromossômicos dessa espécie. Esses marcadores foram usados para propor uma nomenclatura integradora para os cromossomos dos citros (Costa Silva *et al.*, 2015).

Mendes *et al.* (2011), utilizando os BACs marcadores descritos anteriormente em *P. trifoliata* por Moraes *et al.* (2008), construíram o primeiro mapa citogenético para uma espécie dentro do gênero *Citrus*, *C. medica*. Além de identificar os cromossomos homeólogos, foi possível propor mecanismos de evolução cariotípica, tais como amplificação/contração das sequências repetitivas, entre essas duas espécies. Posteriormente essas marcas foram utilizadas em *C. reticulata* ‘Cravo’, outra espécie considerada pura dentro do gênero, e como em cidra foi verificado que o cariótipo de *C. reticulata* difere do cariótipo de *P. trifoliata*, mas é, no entanto, mais similar à este que à *C. medica* (Costa Silva *et al.*, 2015).

C. maxima ‘Pink’ também foi analisada nesse contexto e seu mapa foi estabelecido sendo utilizado em estudo comparativo com as demais espécies. Como resultado foi observado que nenhuma quebra de sintenia foi observada entre as espécies básicas do gênero e que os eventos de amplificação e/ou contração das bandas heterocromáticas CMA⁺ parecem ser frequentes entre as espécies de *Citrus*. Nesse mesmo trabalho, os autores investigaram os cromossomos 2 e 3 de *C. sinensis* ‘Valencia’ visando confirmar a origem e investigar as alterações cariotípicas envolvidas

na formação desse híbrido. Como resultado, os dados do mapeamento dos BACs específicos para os cromossomos 2 e 3 corroboram que toranja e tangerina sejam de fato os prováveis parentais de *C. sinensis*. No entanto, diferenças em relação ao padrão de bandas CMA/DAPI esperado são compatíveis com alterações na fração heterocromática do híbrido em relação aos parentais, e não simplesmente com uma origem mais complexa para esse híbrido como recentemente proposto, uma vez que a origem do cromossomo tipo B não seria explicada (Xu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013)

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL PK (1987). Karyotype of *Citrus tamurana* (Tan.). Chrim Inf Serv 42: 3-5.

ALEZA P, ROLDAN J, HERNÁNDEZ M, OLLITRAULT P, NAVARROL (2009).

Obtention and characterization of *Citrus Clementina* Hort ex Tan ‘Clemenules’ haploid lines to establish the reference whole *Citrus* genome sequence. BMC Plant Biol 9: 110.

ARAÚJO EF, ROQUE, N (2005). In: MATTOS JÚNIOR, D; NEGRI, JD.; PIO, R.M.;

POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). Citros. Campinas: IAC p 125-145.

ARMSTRONG SJ, FRANKLIN FCH, JONES GH (2001). Nucleolus-associated telomere

clustering and pairing preced meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. J. Cell. Sci 114: 4207-4217.

ESEN A, SOOST R K (1971). Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification, and possible use. Jour of Hered 62, 329-333.

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.

BARRET HC, RHODES AM (1976). A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. Syst Bot 1: 105–136.

BARKLEY NA, ROOSE ML, KRUEGER RR, FEDERICI CT (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theor Appl Genet 112: 1519–1531.

BAYER RJ, MABBERLEY DJ, MORTON C, MILLER CH, SHARMA IK, PFEIL BE, RICH S, HITCHCOCK R, SYKES S (2009). A molecular phylogeny of the orange

subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *Amer J Bot* 96: 668–685.

BRASILEIRO-VIDAL AC, DOS SANTOS-SEREJO JA, SOARES FILHO WS, GUERRA M (2007). A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica* 129: 273–279.

CAI Q, GUY CL, MOORE, GA (1994). Extension of the genetic linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation responsive loci. *Theor App Gen* 5: 606-614.

CAMERON JW, FROST HB (1968). Genetics, breeding and nucellar embryony in *Citrus*. In: W. Reuther, L. D. Batchelor, H. J. weber (Ends), *The Citrus industry: Anatomy, physiology, genetics and reproduction*, vol II (325-366). Berkeley, University of California Press.

CARVALHO R, SOARES FILHO WS, BRASILEIRO-VIDAL A C, GUERRA M (2005). The relationship among lemons, limas and citron: a chromosomal comparason. *Cytog Gen Res* 109: 276-282.

CHEN C, BOWMAN DK, CHOI YA (2007). EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Gen & Gen* 1: 1-10.

CHENG Z, BUELL CR, WING RA, GU M, JIANG J (2001a). Toward a cytological characterization of the rice genome. *Genet Res* 11: 2133-2141.

CHENG Z, PRESTING GG, BUELL CR, WING RA, JIANG J (2001b). High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosome anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* 157: 1749-1757.

COSTA SILVA S, MENDES S, SOARES FILHO W S, PEDROSA HARAND (2005).

Chromosome homologies between *Citrus* and *Poncirus* – the comparative cytogenetic map of mandarin (*C. reticulata*). *Tr Gen & Gen* 11: 811816.

DAVIES FS, ALBRIGO LG (1994). *Citrus*. *Crop Production Science in Horticulture* 2: 19-

43 Wallingford, CAB international.

DONG F, SONG J, NAESS SK ET AL (2000). development and applications of a set of

chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet* 101: 1001-1007.

ESEN A, SOOST RK (1971). Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification,

and possible use. *Jour of Hered*, 62.: 329-333.

FANG DQ, ZHANG W, XIAO S (1994). Isoenzymes and classification of citrus species in

China. *Acta Bot Sin* 36: 124-138.

FAO (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009) Annual

statistics. Rome, Italy.

FEDERICI CT, FANG DQ, SCORA RW, ROOSE ML (1998). Phylogenetic

relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor Appl Genet* 96: 812-822.

FERREIRA ME, GRATTAPAGLIA D (1998). Introdução ao uso de marcadores

moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN. 220.

FÔNSECA A, FERREIRA J, SANTOS TRB, MOSIOLEK M, BELLUCCI E, KAMI J,

GEPTS P, GEFFROY V, SCHWEIZER D, DOS SANTOS KGB E PEDROSA-

HARAND A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Chrom*

Res 18: 487-502.

- FRANSZ P, ARMSTRONG S, JONG JH (2000).** Integrated cytogenetics map of chromosome arm 4S of *Arabidopsis thaliana*: structural organization of heterochromatin knob and centromere region. *Cell* 100:367-376.
- FROST HB (1925).** The chromosomes of *Citrus*. *J Wash Acad Sci* 15: 1–2.
- GARCIA-LOR ANDRES, FRANCK CURK, HAGER SNOUSSI-TRIFA et al., (2013).**
A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *An Bot* 111: 1–19.
- GEPTS P, ARAGÃO F, BARROS E (2008).** Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrient. IN: Moore PH, Ming R (eds) *Genomics of Topical Crop Plants*. Springer, Berlin 113-143.
- 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 MS (1988).** Mitotic and meiotic analysis of a pericentric inversion associated with a tandem duplication in *Eleuterine bulbosa*. *Chromosoma* 97: 80-87.
- GUERRA M (1990).** A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. *Act Bot Bras* 4: 75-86.
- GUERRA M, PEDROSA A, BARROS E SILVA AE, CORNÉLIO MTM, SANTOS K, SOARES FILHO WS (1997).** Chromosome number and secondary

constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. *Rev Bras Genet* 20: 489-496.

GUERRA M, SANTOS KGB, BARROS SILVA AE EHRENDORFER F (2000).

Heterocromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae- A case of parallel chromosomal evolution. *Amer Jour Bot* 87: 735-747.

GUERRA M (2004). Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: GUERRA, M (Org.)

FISH- Conceitos e aplicações na citogenética. 1º Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1-32p.

GMITTER JR FG (1996). Origin, Evolution and breeding of the grapefruit. *Pl Breed Rev*

13: 345-363.

GMITTER JR FG, HU X (1990). The possible role of Yunnan, China in the origin of

contemporary *Citrus* species (Rutaceae). *Econ Bot* 44: 267-277.

GMITTER F G, et al., (2012). Citrus genomics. *Tree Genet. Genome* 8: 611-626.

HANDA T, YURI I, AND CHIAKI O (1986). "Phylogenetic study of Fraction I protein in

the genus *Citrus* and its close related genera. *Jap Jour of Gen* 61: 15-24.

HARUSHIMA Y et al (1998). A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers

using a single F2 population. *Genetics* 148: 479-494.

HESLOP-HARRISON JS, SCHWARZACHER T, ANAMTHAWAT-JONSSON K et al

(1991). In situ hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3: 109-115.

HERRERO R, ASINS MJ, CARBONELL EA, NAVARRO L (1996). Genetic

diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor Appl Genet* 92: 599-609.

- JACKSON SA, Z K CHENG H M, GOODMAN, J JIANG (2000).** Comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping of a 431-kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansion of the *Brassica rapa* genome. *Genetics* 156: 833-838.
- KAMI J, PONCET V, GEFFROY V, GEPTS P (2006).** Development of four phylogenetically-arrayed BAC libraries and sequence of the APA locus in *Phaseolus vulgaris*. *Theor Appl Genet* 112: 987-998.
- KIM JS, KLEIN PE, KLEIN RR et al (2005).** Molecular cytogenetic maps of *Sorghum* linkage group 2 and 8. *Genetics* 169: 955-965.
- KOLLER OC (1994).** *Citricultura: laranja, limão e tangerina*. Porto Alegre 1 Editora Rígel, 446.
- LING P, YU C, DENG Z et al (1999).** Citrus genome mapping with AFLP markers. *In Plant & Animal Genome*. VII Conference, p. 189, San Diego, Calif, USA.
- LIU PC (1990).** A molecular study of the *Citrus* genome through analysis of restriction fragment length polymorphism and isozyme mappinh. PhD. Dissertation, University of Florida, Gainesville, Fla, USA.
- LYSAK MA, PECINKA A, SCHUBERT I (2003).** Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromo Res* 15: 195- 204.
- LYSAK MA, BERR A, PECINKA A, SCHMID R, MCBREEN K, SCHUBERT I (2006).** Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proc Nat Acad Sci* 103: 5224-5229.

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.

MENDES S, MORAES AP, MIRKOV TE, PEDROSA-HARAND A (2011).

Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as evidenced by comparative cytogenetic mapping. *Chromosome Res* 19: 521-530.

MIRANDA M, IKEDA F, ENDO T, MORIGUCHI T, OMURA M (1997 a) Comparative

analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosome. *Chrom Res* 5: 86- 92.

MOREIRA CS, MOREIRA S (1991). História da citricultura no Brasil. In: **RODRIGUES**

O, VIÉGAS F, POMPEU JRJ (eds.) *Citricultura Brasileira*. Fundação Cargill. Campinas 1–18.

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

MORAES AP, LEMOS RR, BRASILEIRO-VIDAL AC, SOARES FILHO WS,

GUERRA M (2007a). Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenetics Genome Research* 119: 275-281

MORAES AP, SOARES FILHO WS, GUERRA M (2007b). Karyotype diversity and the

origin of grapefruit. *Chrom Res* 15: 115-121

MORAES AP, MIRKOV TE, GUERRA M (2008). Mapping the chromosome of

Poncirus trifoliata Raf. By BAC-FISH. *Cytog Gen Res* 121: 227–281.

MOZO TK, DEWAR P, DUNN JR, ECKER S, FISCHER. (1999). A complete BAC

based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. Nat Genet. 22: 271-275.

MORTON CM, GRANT M, BLACKMORE S (2003). Phylogenetic relationships of the Aurantioideae inferred from chloroplast DNA sequence data. Am J Bot 90: 1463-1469.

NICOLOSI E, DENG ZN, GENTILE A, LA MALFA S, CONTINELLA G, TRIBULATO E (2000). *Citrus* phylogeny and genetic origin important species as investigated by molecular markers. Theor Appl Genet 100: 1155–1166.

NICOLOSI E (2007). Origin and taxonomy. In: Kan, I. A. (ed) Citrus, Genetics and Biotechnology. CAB international, Wallingfort, 19-43.

OLLITRAULT P, JAVIER T, CHEN C (2012). A reference genetic map of *C. Clementine* hort. Ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. BMC Genomics 13: 593.

PANG XM, HU CG, DENG XX (2007). Phylogenetic relationship within *Citrus* and related genera as inferred from AFLP markers. Genet Res Crop Evol 54: 429-436.

PEDROSA A, GUERRA M, SOARES FILHO WS (1997). An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Cytobios 92:43–51.

PEDROSA A, SCHWEIZER D, GUERRA M (2000). Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theo App Gen* 100: 361-367.

PEDROSA A, SANDAL N, STOUGAARD J, SCHWEIZER D, BACHMAIR A (2002). Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. Genetics 161: 1661-1672.

PEDROSA-HARAND A, ALMEIDA CCS, MOSIOLEK M, BLAIR MW,

- SCHWEIZER D, GURRA M (2006).** Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theo App Gen* 112: 924-933.
- POTVIN C, BERGERON Y, SIMON JP (1983).** A numerical taxonomic study of selected Citrus species (Rutaceae) based on biochemical characters. *Systematic Botany* 127-133.
- RAGHUVANSHI SS (1962).** Cytogenetical evolution in genus *Citrus*. *Cytologia* 27: 172-187.
- RUAS CDF, VANZELA AL, SANTOS MO, FREGONEZI JN, RUAS PM, MATZENBACHER NI, DE AGUIAR-PERECIN ML (2005).** Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (Asteraceae) from Brazil *Gen Mol Bio* 28: 129- 139.
- SAMUEL R, EHRENDORFER F, CHASE MW (2001).** Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. *Plant Biol* 3: 77–87.
- SANKAR AA, MOORE GA (2001).** Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theor App Gen* 89: 206-214.
- SAUER JD (1993).** Historical geography of crop plants – A Select Roster. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 309.
- SCORA RW (1975).** On the history and origin of citrus. *Buly Botanical Club*, 102: 369-375.
- SIMONE M, RUSSO MP, PUELO G (1998).** Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. *Fruits*, 6:383-390.

- SWINGLE WT, REECE PC (1967).** The botany of *Citrus* and its wild relatives. IN:
REUTHER W, WEBER HJ, BATCHELOR LD (eds). The Citrus industry. History,
world distribution, botany and varieties, vol I. Berkeley: University Press, 190-430.
- SWINGLE WT (1943).** The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange
subfamily, 129–474. In: WEBBER, HJ, BATCHELOR LD (eds.). The citrus industry.
Vol. 1. Univ. of California, Berkeley.
- TALON M, GMITTER JR FG (2008).** *Citrus* Genomics. Int J Plant Genomics, 17p.
- TANAKA T (1977).** Fundamental discussion of *Citrus* classification. Studies Citrol.14: 1- 6.
- TEROL J, NARANJO MA, OLLITRAULT P, TALON M (2008).** Development of
genomic resources for *Citrus Clementina*: Characterization of three deep-coverage BAC
libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. BMG Genomics 9: 423- 431.
- WEBBER HJ (1967).** History and development of the *Citrus* industry. In: **REUTHER
W, WEBBER HJ, BATCHELOR LD** (eds) The *Citrus* industry. History world
distribution, botany and varieties, vol I. Berkeley: University of California Press, 1–
39.
- WU G ALBERT, SIMON PROCHNIK, JERRY JENKINS (2014).** Sequencing of diverse
mandarin, pummel and orange genomes reveals complex history of admixture during
citrus domestication. Nature 32: 656-662.
- XIANG C, ROOSE ML (1988).** Frequency and characteristics of nucellar and zygotic
seedlings in 12 citrus rootstocks. Sci Hortic 37: 47-59.
- XU Q, CHEN LL, RUAN X (2013).** The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*).
Nature Genetics 45: 59- 66.

YANG ZN, YE XR, CHOI S, MOLINA J, MOONAN F, WING RA, ROOSE M, L. E

T.E. MIRKOV (2001). Construction of a 1.2 Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Genome 44: 382-393.

YAMAMOTO M, TOMINAGA S (2003). High chromosomal variability mandarins

(*Citrus* spp.) revealed by CMA banding Euphytica 129: 267-274.

YAMAMOTO M, ABKENAR AA, MATSUMOTO R, NESUMI H, YOSHIDA T,

KUNIGA T, KUBO T, TOMINAGA S (2007). CMA banding patterns of chromosomes in major *Citrus* species. J Japan Soc Hort Sci 76: 36-40

ZWICK MS, HANSON RE, McKNIGHT TD (1997). A rapid procedure for isolation of

Cot-1 DNA from plants. Genome 40: 138-142.

Manuscritos

Manuscrito1

INTEGRAÇÃO ENTRE A SEQUÊNCIA GENÔMICA E O MAPA CITOGENÉTICO DE TANGERINA

(Citrus reticulata Blanco)

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

Integração entre a sequência genômica e o mapa citogenético de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco)

Mendes S¹, Régis T¹, Terol, J², Soares Filho W S³, Tálon M², Pedrosa-Harand A¹

¹Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal- Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife - PE, Brazil; ²Centro de Genómica y Postcosecha, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, Spain; ³Embrapa Cassava & Fruits, Cruz das Almas - BA, Brazil

Resumo

Citrus é um gênero de grande importância econômica na fruticultura mundial. Apesar do pequeno tamanho do genoma de suas espécies, apenas recentemente o sequenciamento genômico foi obtido para alguns de seus representantes. Assim como as análises citogenéticas prévias realizadas no grupo, esses dados são importantes para entender as complexas relações entre suas espécies e auxiliar seus programas de melhoramento. Com o objetivo de ancorar os dados genômicos com o mapa citogenético já disponível para a tangerina *Citrus reticulata* Blanco, espécie considerada parental de diversos híbridos de importância econômica, 14 novos clones genômicos BACs (cromossomos artificiais de bactérias) foram utilizados em hibridização *in situ* fluorescente (BAC-FISH), 13 destes apresentando marcação única. Além disso, sete BACs previamente mapeados tiveram seus terminais sequenciados, permitindo a sua correlação com *scaffolds* e consequente integração dos cromossomos com os dados genômicos. Assim, o presente trabalho apresenta a correlação entre todos os *scaffolds* e cromossomos de tangerina, permitindo aprofundar estudos comparativos e de genômica estrutural no grupo.

Abstract

Citrus is a genus of great economic importance in world fruit production. Despite the small size of the genome of their species, only recently genomic sequencing was obtained for some of their representatives. Like the previous cytogenetic analyzes in the group, these data are important for understanding the complex relationships between their species and assist their breeding programs. In order to anchor the genomic data with cytogenetic map now available for Tangerine *Citrus reticulata* Blanco, species considered parental several hybrids of economic importance, 14 new genomic clones BACs (*artificial chromosomes of bacteria*) were used in fluorescence in situ hybridization (BAC-FISH), 13 of these presenting unique marking. In addition, seven previously mapped BACs were sequenced terminals allowing its correlation with scaffolds and subsequent integration of chromosomes with genomic data. Thus, this study shows the correlation between all scaffolds and tangerine chromosomes, allowing further comparative studies and structural genomics in the group.

Introdução

O gênero *Citrus* (L.) é conhecido por apresentar várias espécies com grande importância econômica, destacando-se a laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), o limão (*Citrus limon* (L.) Burm.) e as tangerinas (*C. reticulata* Blanco, *C. clementina* Hort. Ex. Tanaka). Além disso, o gênero se destaca devido à grande variabilidade morfológica e uma taxonomia bastante complexa, sendo apenas poucas espécies consideradas puras ou verdadeiras, tais como *C. medica* ‘Ethrog’ (cidra), *C. maxima* (Brum.) Merr. (toranja) e algumas tangerinas (*C. deliciosa* Ten. ‘Comum’ ou ‘Montenegrina’, *C. reticulata* Blanco ‘Cravo’, *C. sunki* (Hayata) Hort. ex Tan e *C. reshni* Hort. ex Tanaka). As demais espécies são híbridas, formadas a partir de cruzamentos entre essas e/ou com espécies de gêneros próximos, como, por exemplo, *C. clementina*, formada pelo cruzamento entre *C. sinensis* e *C. reticulata* ‘Murcott’ (Moore, 2001, Moraes *et al.*, 2007, Aleza *et al.*, 2009, Ollitrault *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2014).

Nos últimos anos várias ferramentas têm sido utilizadas na tentativa de esclarecer as relações dentro do gênero, incluindo o emprego de marcadores moleculares, tais como isoenzimas, SNPs, SCARs, RFLP, SSRs e RAPD (Federice *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000; Barkley *et al.*, 2006; Ollitrault *et al.*, 2012a; Garcia *et al.* 2013). Além disso, diversos mapas genéticos, bibliotecas BAC (cromossomo artificial de bactéria), mapas citogenéticos e mais recentemente o sequenciamento de diferentes genomas (Barkley *et al.*, 2006; Terol *et al.*, 2008; Guerra, 2009; Ollitrault *et al.*, 2012b; Xu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014) tem sido realizados para dar suporte aos programas de

melhoramento e também têm contribuído para o melhor entendimento da evolução do gênero.

Os estudos citogenéticos em *Citrus* permitiram a caracterização cariotípica de muitas espécies (Guerra, 2009). No geral, o gênero apresenta $2n = 18$ e número básico $x = 9$, com cromossomos pequenos e morfológicamente similares, sendo a maioria metacêntricos e submetacêntricos (Guerra *et al.*, 1997). A utilização de coloração CMA/DAPI e o uso da FISH (hibridização *in situ* fluorescente) com sondas de DNA ribossomal (DNAr) 5S e 45S tornou possível diferenciar as espécies puras, com cariótipo homomórfico, daquelas híbridas que apresentam cariótipos heteromórficos, baseando-se no número e posição dos blocos CMA⁺ e de sítios de DNAr. Em vista disso, os cromossomos de citros foram classificados em nove tipos básicos: A (três bandas CMA⁺, duas terminais e uma proximal), B (uma banda CMA⁺ terminal e outra proximal), C (duas bandas CMA⁺ terminais), D (uma banda CMA⁺ terminal), E (uma banda subterminal), F (sem banda), F_L (sem banda sendo o maior do complemento), G (duas bandas CMA⁺, uma subterminal e uma terminal) e H (uma banda CMA⁺ proximal), com subtipos de acordo com o número e localização dos sítios de DNAr 5S e 45S, como por exemplo, os subtipos F/5S encontrados nas toranjas e D/5S-45S nas tangerinas (Pedrosa *et al.*; 2000, Carvalho *et al.*; 2005; Brasileiro-Vidal *et al.*; 2007; Moraes *et al.*; 2007 a, b). No entanto, embora essas técnicas tenham sido bastante importantes para a caracterização de acessos e espécies em *Citrus*, elas se mostraram limitadas quanto à identificação dos cromossomos homólogos e homeólogos.

Atualmente, uma abordagem que tem contribuído para os estudos genômicos é a técnica de mapeamento físico com clones de grandes insertos, tais como BACs. A técnica de FISH utilizando BACs como sondas (BAC-FISH), tem sido aplicada

principalmente na construção de mapas citogenéticos em espécies que apresentam genomas pequenos (Fonsêca *et al.*, 2010). Tais mapas, associados a mapas genéticos, mapas de *contigs* e dados genômicos são ferramentas importantes nos projetos de sequenciamento, contribuindo para avaliar os possíveis *gaps* na montagem (Cheng *et al.*, 2001) e permitindo identificar quais BACs são eucromáticos e potencialmente ricos em genes (Wang *et al.*, 2006). Além disso, essas análises têm sido bastante eficientes e têm trazido informações quanto à organização e evolução cromossômica em várias espécies de plantas (Fransz *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001b; Kim *et al.*, 2005; Fonsêca *et al.*, 2010). Em 2007, Moraes e colaboradores, utilizando o mapeamento através da FISH com sondas BAC associados com a localização dos sítios de DNAr 5S e 45 e o padrão de distribuição das bandas CMA⁺, conseguiram identificar os nove pares de cromossomos homólogos da espécie *Poncirus trifoliata*, utilizando para isso 13 BACs de uma biblioteca genômica dessa espécie. Posteriormente, esses BACs foram mapeados nas espécies *Citrus medica* ‘Ethrog’ (Mendes *et al.*, 2011) e *C. reticulata* ‘Cravo’ (Costa Silva *et al.*, 2015), permitindo identificar os nove pares cromossômicos e correlacioná-los com os homeólogos das espécies previamente mapeadas. Foi verificado que os cariótipos de *C. medica* e *C. reticulata* diferem do cariótipo de *P. trifoliata* devido à presença de expansões/contrações dos blocos heterocromáticos, além de possíveis inversões. Embora esses trabalhos tenham trazido importantes avanços nos estudos cromossômicos para o gênero *Citrus*, não havia correlação desses marcadores cromossômicos com mapas genéticos ou dados genômicos.

Em 2013, Xu e colaboradores publicaram a sequência genômica da laranja doce (*Citrus sinensis*). Para reduzir a complexidade na montagem de um genoma altamente heterozigoto, os autores utilizaram uma linhagem duplo-haploide gerada a partir de

cultura de antera da laranja doce ‘Valencia’. Como resultados foram gerados 16.890 *contigs* maiores que 500 pb (N50 = 49,89 kb) e 4.811 *scaffolds* maiores que 500 pb (N50 = 1,69 Mb), representando 320,5 Mb dos estimados 367 Mb do genoma, numa cobertura de 87,3%. Desses, 239 Mb foram ancorados no mapa genético através de 160 *scaffolds*, permitindo o estabelecimento de nove pseudocromossomos ordenados com base no tamanho dos grupos de ligação. Quatro dos nove pseudocromossomos foram correlacionados aos cromossomos através da anotação de sequências de DNAr 5S ou 45S ou de um DNA satélite de 107 pb, além disso esses resultados foram confirmados por FISH (Xu *et al.*, 2013).

Recentemente, Wu e colaboradores (2014) sequenciaram os genomas de nove acessos do gênero *Citrus* (*C. clementina* haploide, *C. reticulata* ‘Ponkan’, *C. reticulata* ‘Willowleaf’, *C. reticulata* ‘Murcott’, *C. maxima* ‘Chandler’, *C. maxima* ‘Low-acid’, *C. sinensis* e *C. aurantium* ‘Seville’), tendo como base a linhagem haploide da tangerina *C. clementina*, para a qual três bibliotecas BACs haviam sido construídas (Terol *et al.*, 2008). Os dados de sequência de *C. clementina* corresponderam a 301,4 Mb (contig L50 = 119 kb e *scaffold* L50 = 6,8 Mb) e forneceram uma cobertura ancorada do genoma estimada em 96%. A disponibilidade das bibliotecas BACs para tangerinas juntamente com os dados de sequência tornou possível, no presente trabalho, integrar os dados citogenéticos e genômicos pela primeira vez no gênero. Para isso, o mapa citogenético de *C. reticulata* ‘Cravo’, espécie considerada básica e um dos parentais de *C. clementina*, foi expandido e utilizado para ancorar o genoma de *C. clementina*.

Materiais e Métodos

Material vegetal

Sementes de *Citrus reticulata* ‘Cravo’ foram obtidas do Banco de Germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas-BA, Brasil.

Preparações citológicas e coloração CMA/DAPI

Pontas de raízes obtidas de sementes germinadas foram pré-tratadas em 8-hidroxiquinoleína (2 mM) por 24 h a 10°C, fixadas em etanol-ácido acético (3:1 v/v) por 2-24 h e estocadas a -20 °C. As preparações citológicas foram feitas por esmagamento de acordo com Moraes *et al* (2007a).

Após seleção, as lâminas foram envelhecidas por três dias e posteriormente coradas com CMA (0,1 mg/ml) por 1h e contracoradas com DAPI (1µg/ml) por 30 min (Moraes *et al.*, 2007a). Após dois a três dias, as melhores células foram capturadas em microscópio de epifluorescência Leica acoplado à câmara Cohu utilizando o software QFISH (Leica). As lâminas foram descoradas em etanol-ácido acético (3:1 v/v) por 30 minutos, seguido de etanol absoluto por 1h, secas e estocadas a -20 °C até utilização na FISH.

Hibridização *in situ* fluorescente

Foram utilizados como sondas 14 clones BACs de *C. clementina* var. Clemenules (Terol *et al.*, 2008, Tabela 1) . As sondas de BACs foram obtidas por *mini-*

prep utilizando o *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen) e marcadas com Cy3-dUTP (GE) por *nick translation* (Roche).

O procedimento de hibridização *in situ* fluorescente foi realizado de acordo com Pedrosa *et al.* (2002), exceto a lavagem de estringência que foi realizada com $0,1\times$ SSC à 42 °C. As preparações foram contracoradas com DAPI (2µg/mL) em Vectashield (Vector) e as metáfases selecionadas foram capturadas como descrito acima. As imagens foram sobrepostas, coloridas artificialmente e editadas uniformemente para brilho e contraste utilizando o programa Adobe Photoshop. As rehibridizações foram realizadas seguindo o protocolo Heslop-Harrison *et al.*, (1992).

Medições cromossômicas

Para estabelecer a posição de cada clone BAC ao longo do cromossomo, o sinal do BAC foi medido em relação ao telômero do braço oposto e essa distância foi usada no cálculo da posição relativa ao tamanho cromossômico total, em uma média de 15 a 20 cromátides por BAC, usando o programa Adobe Photoshop. O tamanho de cada cromossomo foi baseado nas medições de Costa Silva *et al.*, (2015) para o mesmo acesso. Os cromossomos foram numerados de acordo com a nomenclatura proposta para os citros (Costa Silva *et al.*, 2011). O idiograma foi gerado usando um macro desenvolvido no PowerPoint e posteriormente redesenhados no programa Corel Draw.

Sequenciamento e análise de sequências

Seis BACs marcadores de *P. trifoliata* previamente mapeados citogeneticamente em *C. reticulata* (24C13, 21L13, 28A07, 02C12, 28A05, 01B09, Costa Silva *et al.*, 2015) foram purificados como descrito acima e tiveram seus terminais sequenciados com os primers M13F (5´d[GTAAAACGACGGCCAG]3´) e M13R (5´d[CAGGAAACAGCTATGAC]3´) na Macrogen Inc. (Seoul, Coreia) ou na Plataforma de Sequenciamento de DNA, do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva, Departamento de Genética- CCB – UFPE (Recife, Brasil). O BAC 59C23 havia sido previamente selecionado para o mapeamento físico do loco CTV. As sequências foram utilizadas para posicionamento dos respectivos BACs nos *scaffolds* correspondentes através de BLAST contra o genoma de *C. clementina* disponível na plataforma Phytozome v1.3. Os BACs de *C. clementina* mapeados citogeneticamente também tiveram seus terminais sequenciados para confirmar sua identidade, exceto três BACs para os quais o sequenciamento não foi conclusivo, sendo provisoriamente identificados com BAC1, 2 e 3.

Resultados

Os resultados do bandeamento CMA/DAPI (Fig. 1 e 2) obtidos nesse trabalho para *C. reticulata* ‘Cravo’ (2C + 10D +4F +2FL) corroborou os dados publicados previamente sobre sua fórmula cariotípica (Carvalho *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2007a,b; Costa e Silva *et al.*, 2015).

Um total de 14 BACs foi hibridizado em cromossomos metafásicos de *Citrus reticulata* ‘Cravo’ (Tabela 1). Treze clones BACs apresentaram sinal único em

diferentes tipos cromossômicos e puderam ser mapeados (Tabela 1). Sete desses BACs hibridizaram na região terminal do braço longo de dois diferentes cromossomos do tipo F. Enquanto os BACs 3, 09D09, 11P02, 17K23, 21H01 e 29H23 hibridizaram no cromossomo 8 (Fig. 1a-b, Fig. Suplementar 1a-f), o BAC 42H16 hibridizou no cromossomo 9 (Fig. 1c-d). Já os BACs 1 (Fig. 2c-d) e 2 (Fig. 2e-f) hibridizaram no cromossomo 1, tipo F_L. Quatro BACs marcaram três cromossomos diferentes tipo D: o BAC 32G14 hibridizou na região terminal do braço curto no cromossomo 6 (Figura 2a-b) e o BAC 03F24 hibridizou no cromossomo 2 no braço longo adjacente à banda CMA⁺ (Fig. Suplementar 2c-d); enquanto os BACs 32G18 e 33D18 marcaram o cromossomo 4 (Fig. Suplementar 2a-b). Com esses resultados, foi verificado que apenas um dos novos BACs mapeados no presente trabalho apresentou sinal único próximo a bandas CMA⁺ (03F24). Um clone BAC (CCH3030J12) mostrou marcação dispersa em todo complemento e não pode ser mapeado (Fig. suplementar 2e-f).

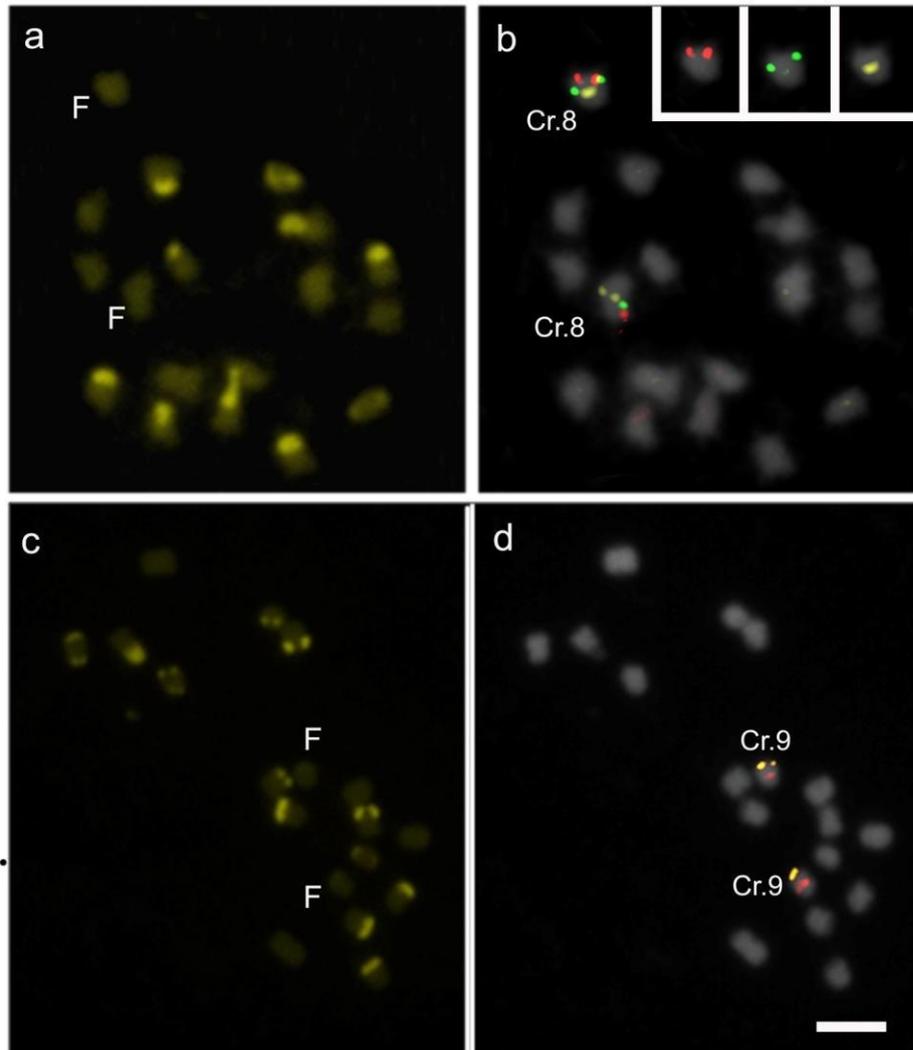


Figura 1. Coloração CMA/DAPI e FISH com BACs de *Citrus clementina* e *Poncirus trifoliata* em cromossomos metafásicos de *C. reticulata* 'Cravo'. Em (a) e (c), bandeamento CMA. (b) BACs 09D09 (verde), 17K23 (vermelho) e BAC 3 (amarelo). Em (d) BAC 42H16 (amarelo) e o BAC de *P. trifoliata* 59C23 (vermelho). Barra em (d) = 5 μ m.

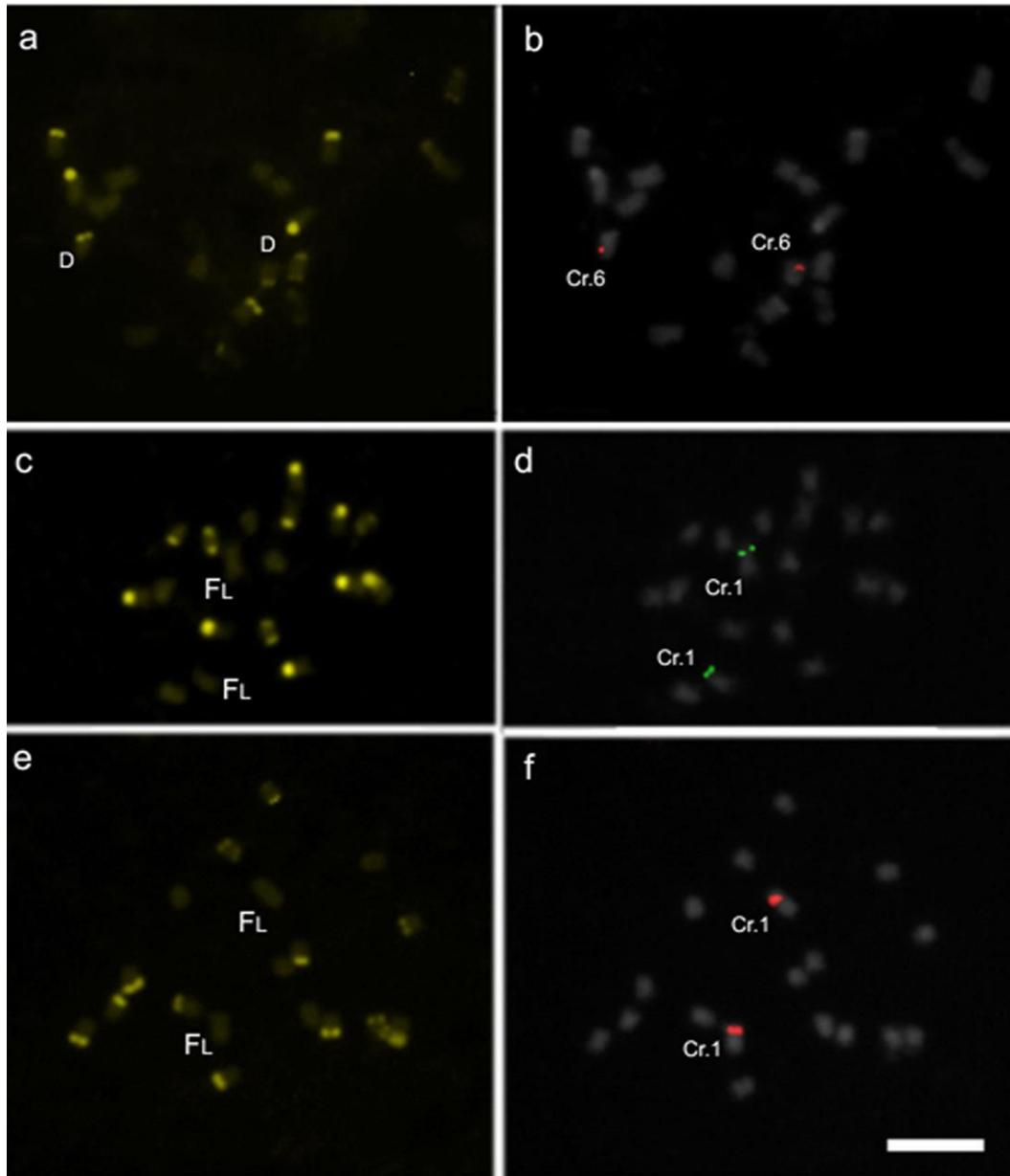


Figura 2. Coloração CMA/DAPI e FISH com clones BACs de *Citrus clementina* em cromossomos metafásicos de *C. reticulata* 'Cravo'. Em (a), (c) e (e) bandeamento CMA; (b) BAC 32G14, (d) BAC 1 e (f) BAC 2. Barra em (d) = 5 μ m.

Adicionalmente, sete BACs de *P. trifoliata* previamente mapeados em *C. reticulata* 'Cravo' (Costa Silva *et al.*, 2015) puderam ser ancorados no genoma de *C. clementina* com base nas suas sequências. Dessa forma, 20 pontos de ancoragem

puderam ser estabelecidos, permitindo a associação de sete *scaffolds* com seus respectivos cromossomos (Fig. 3, Tabela 1). O cromossomo 1 (FL), previamente identificado pelo BAC 24C13, foi correlacionado ao *scaffold* 3, que teve sua orientação confirmada pelos BACs 1 e 2. O cromossomo 2 (tipo D) foi integrado em um ponto em cada braço ao *scaffold* 4 pelos BACs 21L13 e 03F24. O cromossomo 3 (tipo C) correspondeu ao *scaffold* 8, de acordo com o BAC 28A07. O cromossomo 4 (tipo D) foi ancorado em três pontos na região terminal do *scaffold* 2 através dos clones 02C12, 32G18 e 33D18. O cromossomo 6 (tipo D) foi correlacionado ao *scaffold* 1 pelos BACs 32G14 e 28A05. Já os cromossomos 8 e 9 (tipo F) foram correlacionados aos *scaffold* 5 e 7, respectivamente, sendo o primeiro integrado em seis pontos (BACs 3, 01B09, 09D09, 17K23, 11P02 e 29H23) no braço longo e um ponto no braço curto (21H01) e o segundo em dois pontos (42H16 e 59C23). O clone 30J12, do *scaffold* 9, não pode ser mapeado, pois apresentou marcação dispersa em todo complemento. No geral foi observada conservação de colinearidade e congruência na posição dos BACs entre cromossomos e *scaffolds*, sendo necessário reorientar os *scaffolds* 1, 2, 4 e 7 de modo que 0 Mb correspondesse ao início do braço curto. Não foi observada correlação entre os tamanhos dos *scaffolds* e os tamanhos físicos dos cromossomos (Figura 3).

Tabela 1: Localização física dos marcadores clones BACs de *C. clementina* nos cromossomos de *C. reticulata* ‘Cravo’ em seus respectivos *scaffolds*

Cromossomo/ Scaffold	Tipo cromos- sômico	Clones	Posição no scaffold^a	Posição no cromossomo	n
Cromossomo 1	FL	24C13 ^d	0,07	0,08 ^b	
<i>Scaffold</i> 3		BAC 1 ^c	0,17	0,23±0,09	20
		BAC 2 ^c	-	0,39±0,10	20
Cromossomo 2	D	21L13 ^d	0,15	0,12 ^b	
<i>Scaffold</i> 4*		CCL003F24	0,88	0,77±0,08	19
Cromossomo 3	C	28A07 ^d	0,89	0,80 ^b	
<i>Scaffold</i> 8					
Cromossomo 4	D	CCER1032G18	0,08	0,15±0,06	20
<i>Scaffold</i> 2*		CCL033D18	0,12	0,19±0,04	19
		02C12 ^d	0,20	0,19 ^b	
Cromossomo 6	D	28A05 ^d	0,01	0,07 ^b	
<i>Scaffold</i> 1*		CCER1032G14	0,28	0,25±0,03	19
Cromossomo 8	F	CCL021H01	0,10	0,36±0,04	19
<i>Scaffold</i> 5		BAC 3 ^c	-	0,59±0,08	19
		CCER1017K23	0,81	0,75±0,08	18
		CCL011P02	0,81	0,68±0,08	19
		01B09 ^d	0,91	0,82 ^b	
		CCH3029H23	0,92	0,83±0,04	20
		CCH3009D09	0,96	0,83±0,04	18
Cromossomo 9	F	59C23 ^d	0,38	0,57 ^b	
<i>Scaffold</i> 7*		CCH3042H16	0,79	0,80±0,08	20

^a Para permitir comparação entre as posições no cromossomo e no *scaffold*, foram calculadas posições relativas no *scaffold*, considerando a posição em Mb e o tamanho total do *scaffold* e convencionando o início do braço curto como 0 Mb. Quando necessário, o início e fim do *scaffold* foram invertidos (indicado por *)

^b (Costa Silva *et al.*, 2015)

^c BACs provisoriamente sem identificação

^d BACs de *P. trifoliata* (Moraes *et al.*; 2008)

n amostragem

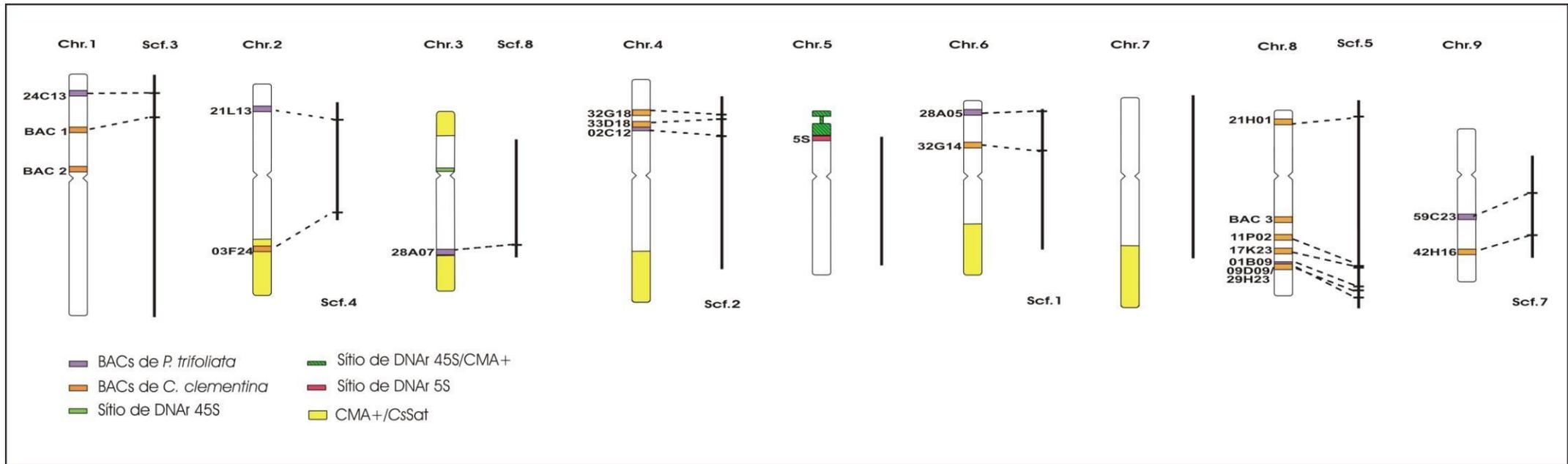


Figura 3: Idiograma mostrando a correlação entre *scaffolds* e cromossomos de *Citrus reticulata* ‘Cravo’ (modificado de Costa Silva *et al.*, 2015), ancorados por BACs de *P. trifoliata* (roxo, previamente mapeados) e *C. clementina* (em laranja)

Discussão

Nesse trabalho, a utilização de BACs no mapeamento citogenético e seu sequenciamento parcial (sequências de terminais de BACs - BES) permitiu pela primeira vez a integração da sequência do genoma de *Citrus* com seus cromossomos, o que representa um avanço no conhecimento genômico do grupo. Atualmente já se tem disponível as sequências genômicas de várias espécies cítricas, sendo o genoma de *C. clementina* o que apresentou uma melhor qualidade de sequência (Wu *et al.*, 2014). De fato, a concordância geral observada entre a posição das sequências nos cromossomos e nos *scaffolds* indica uma boa qualidade na montagem dos mesmos. A incongruência encontrada quanto ao tamanho de alguns *scaffolds* e os respectivos cromossomos (Figura 3) pode ser em parte explicada pela grande quantidade de heterocromatina localizada principalmente nas regiões terminais dos cromossomos, variável mesmo entre espécies de tangerinas (Moraes *et al.*, 2007b).

Estudos anteriores mostraram que as espécies de *Citrus* apresentam genomas pequenos que variam aproximadamente de 360 Mb em *C. reticulata* a 400 Mb em *C. paradisi* por genoma haploide (Doležel *et al.*, 1992; Ollittraut *et al.* 2003). Essas espécies apresentam cerca de 20% do genoma constituído por sequências repetidas em tandem localizadas principalmente nas regiões terminais dos cromossomos (Mendes *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015). A principal sequência apresenta um monômero de 181 pb e rico em GC (>60%), denominado de CsSat, que forma grande parte dos blocos heterocromáticos CMA⁺ presentes em espécies de *Citrus* e espécies de gêneros próximos (Fann *et al.*, 2001; Barros e Silva *et al.*, 2010). Além disso, as análises das sequências genômicas realizadas pelo Consórcio Internacional do Genoma de *Citrus* tem demonstrado a partir das anotações que 45% do genoma dos citros são sequências

.....
repetitivas, tais como retrotransposons LTR, que são em parte excluídas da montagem do genoma (Wu *et al.*, 2014).

No sequenciamento da laranja doce ‘Valencia’, Xu e colaboradores (2013) utilizaram as sequências do DNAr 5S e 45S e de um DNA satélite de 107 pb presentes na montagem do genoma para correlacionar quatro dos nove pseudocromossomos aos cromossômicos da espécie. Os pseudocromossomos 1 (SWO1) e 8 (SWO8) que apresentaram DNAr 45S na região proximal foram considerados correspondentes aos dois cromossomos tipo B. O pseudocromossomo 6 (SWO6), contendo a sequência do DNAr 5S e 45S na região distal, correspondeu a um cromossomo tipo D. Já o pseudocromossomo 7 (SWO7), com sequências de DNA satélite abundantes em ambos os terminais, correspondeu a um cromossomo tipo C. No entanto, a correlação entre os pseudocromossomos de *C. sinensis* e *C. clementina* (Wu *et al.*, 2014), juntamente com os dados do presente trabalho, mostram que apenas a correspondência entre SWO6 (cromossomo 5) e um cromossomo D e entre SWO8 (cromossomo 3) e um cromossomo B são compatíveis com os dados de BAC-FISH. De fato, a correspondência entre os *scaffolds* SWO6 e 6 de *C. clementina*, permite relacionar esses *scaffolds* ao cromossomo 5 e o *scaffold* 9, por exclusão, ao cromossomo 7, embora tais resultados necessitem de confirmação com sequências únicas. O pseudocromossomo SWO7 corresponde ao cromossomo 2, do tipo D e não C em *C. sinensis* (Costa Silva *et al.*, 2015). O cromossomo 3 é heteromórfico em *C. sinensis*, formado por um B/45S e por um C (Costa Silva *et al.*, 2015). Provavelmente o duplo-haploide sequenciado apresentou esse cromossomo como um B/45S (Xu *et al.*, 2013). O cromossomo C em homozigose do duplo-haploide, provavelmente corresponderia ao pseudocromossomo SWO4 (cromossomo 6), enquanto o segundo B em homozigose corresponderia ao

SWO9, não SWO1 (cromossomo 7), uma vez que esses pares são provavelmente D/C e D/B (derivado de um A), respectivamente, na laranja doce, considerando os tipos cromossômicos de *C. reticulata* e *C. maxima*, seus parentais (Costa Silva, 2012). A correspondência entre os demais cromossomos e *scaffolds* (ou pseudocromossomos) de *C. sinensis* também foi estabelecida no presente trabalho (Tabela 2).

Tabela 2: Correlação dos cromossomos de *Citrus* com os respectivos *scaffolds* de *C. clementina* e *C. sinensis* e tipos cromossômicos

Cromossomos	<i>Scaffolds</i> de <i>Citrus clementina</i>	<i>Scaffolds</i> de <i>Citrus sinensis</i> ^a	Tipo cromossômico de <i>C. reticulata</i>	Tipo cromossômico de <i>C. sinensis</i>
1	3	SWO5	FL	
2	4	SWO7	D	[C] ^b /D ^c
3	8	SWO8	C	(B/45S) ^b , C e B/45S ^c
4	2	SWO2	D	
5	(6) ^d	SWO6	D	D/45S ^b
6	1	SWO4	D	(D/C)
7	(9) ^d	SWO9	D	(D e B/45S)
8	5	SWO3	F	
9	7	SWO1	F	[B/45S] ^b

.....
.
^a Baseado na correspondência com os *scaffolds* de *C. clementina* (Wu *et al.*, 2014)

^b Xu *et al.* (2013)

^c Costa Silva (2012)

^d Entre parênteses, correlações não confirmadas por BAC-FISH

A integração entre os dados genômicos e citogenéticos alcançada no presente trabalho permitirá avançar ainda mais no entendimento da origem e evolução de outros acessos de citros, unindo os dados cromossômicos (Mendes *et al.*, 2011; Silva, 2012; Silva *et al.*, 2015) e genômicos (Wu *et al.*, 2014) disponíveis no grupo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia) pelo apoio financeiro ao presente trabalho.

.....
.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO EF, ROQUE N (2005).** Taxonomia dos citros In: MATTOS JÚNIOR D, NEGRI JD, PIO RM, POMPEU JÚNIOR J (eds.). Citros. Campinas: IAC, p.125–145.
- BARKLEY NA, ROOSE ML, KRUEGER RR, FEDERICI CT (2006).** Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor Appl Genet* 112:1519–1531. doi:10.1007/s00122-006-0255-9.
- BARROS SILVA AE, MARQUES A, SANTOS, KG, GUERRA M (2010).** The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Research*, 18(4), 503-514.
- BRASILEIRO-VIDAL AC, DOS SANTOS-SEREJO JA, SOARES FILHO WS (2007).** A simple chromosomal marker can reliably distinguish *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica* 129:273–279.
- CARVALHO R, SOARES FILHO WS, BRASILEIRO-VIDAL AC, GUERRA M (2005).** The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* 109:276–282.
- CHENG Z, PRESTING GG, BUELL CR, WING A, JIANG J (2001).** High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosome anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics*, 157:1749–1757.

- CORNÉLIO M, FIGUEIRÔA A, SANTOS KGB (2003).** Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst Evol* 240:149–16.
- COSTA E SILVA S, MENDES S, SOARES FILHO WS, PEDROSA-HARAND (2015).** Chromosome homologies between *Citrus* and *Poncirus*—the comparative cytogenetic map of mandarin (*Citrus reticulata*). *Tree Genetics & Genome* 11: 81.
- COSTA SILVA S, MARQUES A, DOS SANTOS SOARES FILHO W, MIRKOV T E, PEDROSA-HARAND A, GUERRA M (2011).** The cytogenetic map of the *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. a nomenclature system for chromosomes of all citric species. *Tropical Plant Biology*, 4(2), 99-105.
- DOLEŽEL J, SGORBATI, S, & LUCRETTI S. (1992).** Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia plantarum*, 85(4), 625-631.
- 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.
- 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.
- FRANZ PF, ARMSTRONG S, DE JONG JH, PARNELL LD, DRUNEN CV, DEAN C, ZABEL P, BISSELING T, JONES GH** Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*. *Cell*, 100:367–376.

-
- FÔNSECA A, FERREIRA J, SANTOS TRB, MOSIOLEK M, BELLUCCI E, KAMI J, GEPTS P, GEFFROY V, SCHWEIZER D, DOS SANTOS KGB E PEDROSA- HARAND A (2010).** Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris*). Chromosome Research 18:487-502.
- GARCIA-LOR A, FRANCK C, HAGER S et al., (2013).** A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. Annals of Botany 111: 1–19.
- GUERRA M, PEDROSA A, BARROS E SILVA AE, CORNÉLIO MTM, SANTOS K, SOARES FILHO WS (1997).** Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. Rev Bras Genet, 20:489–496.
- GUERRA M (2009).** Chromosomal variability and the origin of *Citrus* species. In: Mahoney CL, Springer DA (Eds) Genetic Diversity. Nova Science Publishers, Inc, New York.
- HESLOP-HARRISON JS, HARRISON GE, LEITCH IJ (1992).** Reprobing of DNA:DNA *in situ* hybridization preparations. Trends Genet 8:372–373.
- KIM JS, KLEIN PE, KLEIN RR et al (2005).** Molecular cytogenetic maps of Sorghum linkage group 2 and 8. Genetics 169: 955-965.
- 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.
- MENDES S, MORAES AP, MIRKOV TE, PEDROSA-HARAND A (2011).** Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution

.....
between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as evidenced by comparative cytogenetic mapping. *Chromosome Res*, 19:521–530.

MORAES AP, SOARES FILHO WS, GUERRA M (2007a). Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res* 15:115–121.

MORAES AP, LEMOS RR, BRASILEIRO-VIDAL AC et al., (2007b). Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenet Genome Res* 119:275–281.

MORAES AP, MIRKOV TE, GUERRA M (2008). Mapping the chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. by BAC-FISH. *Cytogenet Genome Res* 121:277–281.

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

MOZO T, DEWAR K, DUNN P, ECKER JR, FISCHER S, KLOSKA S, ALTMANN T (1999). A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature genetics*, 22(3), 271-275.

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.

OLLITRAUT A (2003). *Les systèmes portuaires halieutiques de la façade atlantique française* (Doctoral dissertation, Nantes).

OLLITRAUT P, TEROL J, GARCIA-LOR A, BÉRARD A, CHAUVEAU A, FROELICHER, Y, TALON M (2012a). SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the *Citrus* genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC genomics*, 13(1), 13.

-
- OLLITRAULT P, JAVIER T, CHEN C et al., (2012b).** A reference genetic map of *C. clementine* hort. Ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics* 13: 593.
- PEDROSA A, SCHWEIZER D, GUERRA M (2000).** Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor Appl Genet*, 100:361–367.
- PEDROSA A, SANDAL N, STOUGAARD J, SCHWEIZER D, BACHMAIR A (2002).** Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672.
- TEROL J, NARANJO MA, OLLITRAULT P, TALON M (2008).** Development of genomic resources for *Citrus Clementina*: Characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,00 BAC end sequences. *BMC genomics*, v. 9, n. 1, p. 423.
- YAMAMOTO M, TOMINAGA S (2003).** High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. *Euphytica* 129:267–274.
- WU GA, SIMON P, JERRY J et al., (2014).** Sequencing of diverse mandarin, pummel and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature* 32: 656–662.
- XU Q, CHEN LL, RUAN X et al., (2013).** The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics* 45: 59-66.

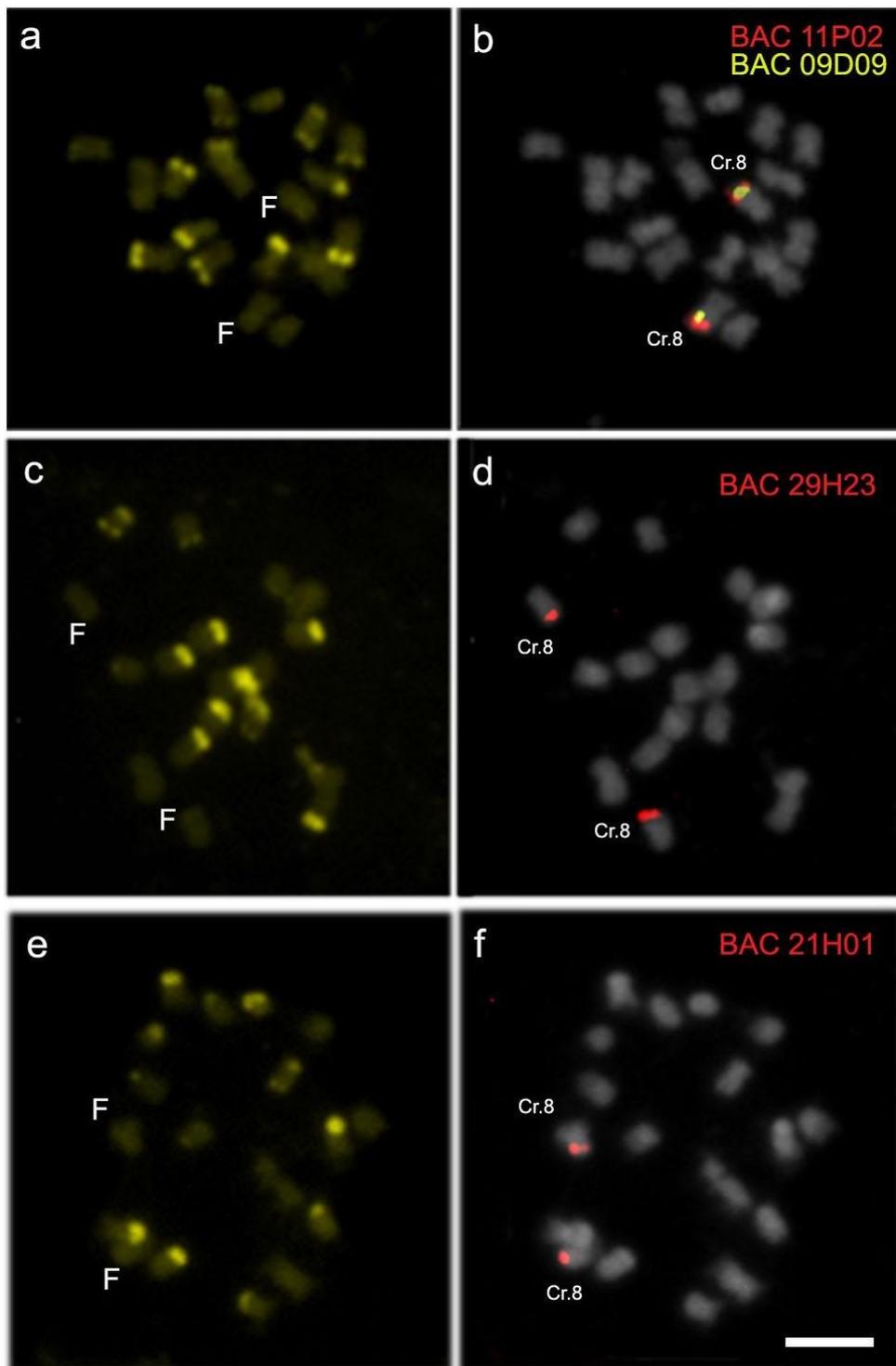


Figura Suplementar 1: FISH com BACs de *C. clementina* em cromossomos metafásicos de *C. reticulata*. Em (a), (b) e (c), bandeamento CMA. Em (b), BACs 11P02 (vermelho) e 09D09 (amarelo). Em (d), BAC 29H23. Em (f) BAC 21H01. Barra em (f) = 5 μ m.

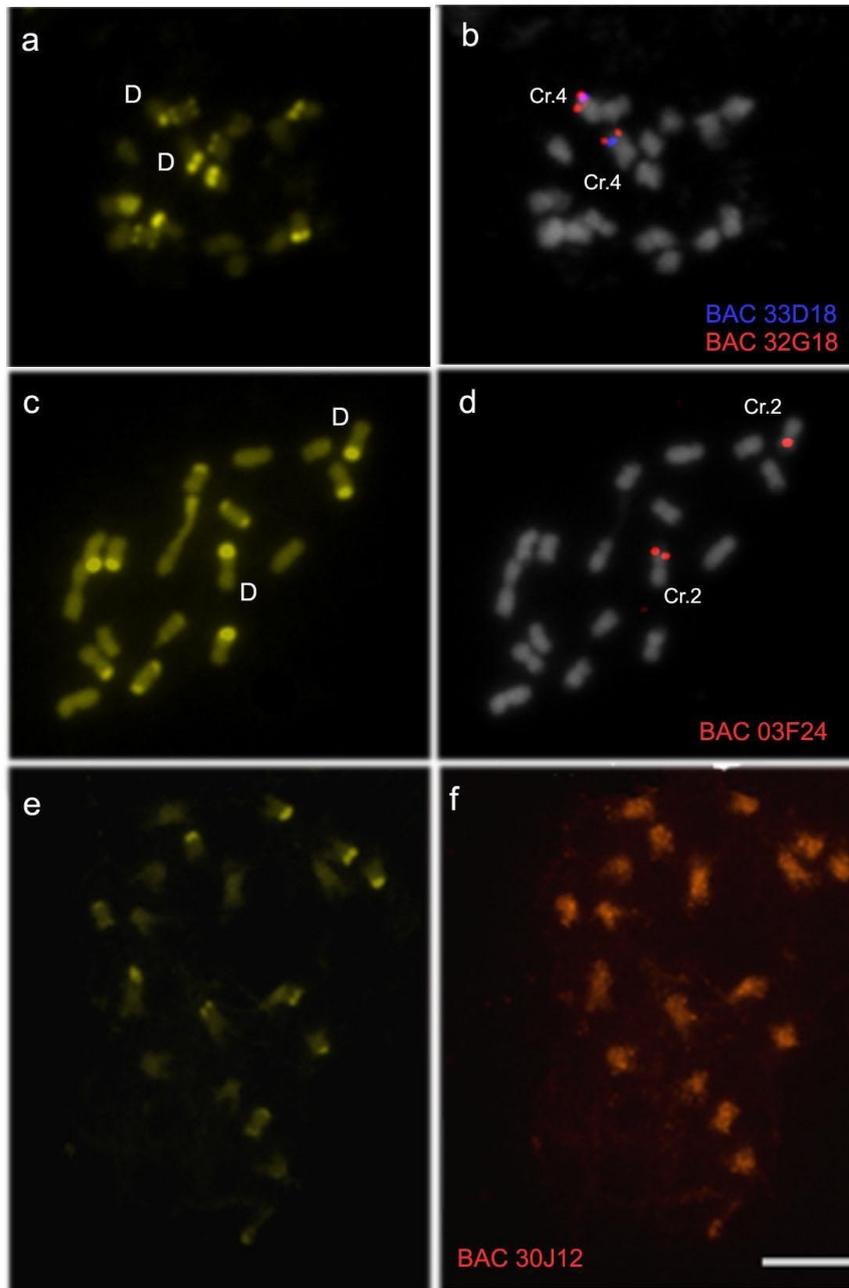


Figura Suplementar 2: FISH com BACs de *C. clementina* em cromossomos metafásicos de *C. reticulata*. Em (a), (c) e (e), bandeamento CMA. Em (b), BACs 32G18 (vermelho) e 33D18 (azul). Em (d), BAC 03F24; Em (f) BAC 30J12. Barra em (f) = 5 μ m.

.....

.

Manuscrito 2

**VARIABILIDADE CARIOTÍPICA DA LARANJA-AZEDA
(*Citrus aurantium* L.) E A ORIGEM DO SEU CARIÓTIPO
HETEROMÓRFICO**

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

.....

.

VARIABILIDADE CARIOTÍPICA DA LARANJA-AZEDA (*Citrus aurantium* L.) E A ORIGEM DO SEU CARIÓTIPO HETEROMÓRFICO

Mendes S¹, Guerra S¹, Soares Filho W S², Guerra M¹, Pedrosa-Harand A¹

¹Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal- Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife - PE, Brazil; ²Embrapa Cassava & Fruits, Cruz das Almas - BA, Brazil

Resumo

A laranja-azeda (*Citrus aurantium* L.) é uma das espécies de destaque na citricultura mundial. Assim como a laranja-doce (*Citrus sinensis* Osbeck.), tem origem a partir do cruzamento entre tangerinas e toranjas. Visando investigar a origem e variabilidade de seu cariótipo, nove cultivares de *C. aurantium* e uma cultivar de *Citrus natsudaidai* Hayata, proximamente relacionada à *C. aurantium*, foram analisados utilizando dupla coloração sequencial CMA e DAPI e FISH com sondas de DNAr 5S/45S e BACs (cromossomos artificiais de bactérias) marcadores. Os acessos de laranja azeda analisados apresentaram quatro fórmulas cariotípicas distintas, mas seis entre nove acessos tiveram como fórmula 1A + 1B + 1C + 8D + 7F. *Citrus natsudaidai* apresentou fórmula 2A + 1C + 6D + 9F. Os acessos ‘Standard’, ‘Sem espinho’, ‘Variegada’ e *C. natsudaidai* apresentaram três sítios de DNAr 45S em diferentes cromossomos. Os acessos ‘Sem espinho’ e ‘Variegada’ apresentaram dois sítios de DNAr 5S também em diferentes

.....
.
cromossomos. A presença de um cromossomo tipo A/45S e de um cromossomo F/5S reforça que *C. aurantium* seria um híbrido derivado de *C. maxima*. Já um cromossomo D/5S-45S dá suporte a *C. reticulata* como segundo parental. No entanto, várias alterações cromossômicas, aconteceram após o evento de hibridação, que poderiam ser em parte explicadas por redução de blocos heterocromáticos, em parte poderiam sugerir origem múltipla para alguns acessos.

Introdução

A laranja-azedada (*Citrus aurantium* L.) apresenta grande importância na citricultura mundial, sendo produzida principalmente na Europa. Na medicina, é destinada para tratar resfriados, febres, desordens hepáticas, problemas digestivos, etc, sendo utilizada também na preparação de comidas, por pintores em construções, como aromatizante, e até em rituais espirituais (Wu *et al.*, 2014).

Diferentes marcadores moleculares têm demonstrado que a laranja-azedada é um híbrido originado a partir do cruzamento entre tangerinas (*C. reticulata* Blanco) e toranjas (*C. maxima* (Burm.) Merrill) (Moore, 2001; Garcia-Lor *et al.*, 2013), o que foi confirmado a partir do sequenciamento genômico total dessas três espécies (Wu *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Citrus* apresentam cromossomos similares, pequenos e número bastante estável ($2n = 18$), mas são amplamente variáveis quanto à distribuição (quantidade e localização) de blocos heterocromáticos. Nove tipos cromossômicos foram reconhecidos por meio de bandeamento CMA/DAPI e estão presentes em diferentes quantidades nas espécies do gênero: A (três bandas CMA⁺, duas bandas terminais e uma proximal), B (duas bandas CMA⁺, uma banda terminal e uma proximal), C (duas bandas CMA⁺ terminais), D (uma banda CMA⁺ terminal), E (uma banda intersticial) F (sem bandas), F_L (sem banda, sendo o maior do complemento), G (duas bandas intersticiais) e H (uma banda CMA⁺ proximal) (Carvalho *et al.*, 2005, Guerra, 2009). Os tipos A, B, C, E, G e H são menos frequentes e, portanto, utilizados como cromossomos marcadores, enquanto que os tipos D e F são os mais comuns estando sempre presentes nos cariótipos. Essa

.....
.
classificação permitiu distinguir as espécies verdadeiras, com cariótipos homomórficos, daquelas híbridas as quais apresentam cariótipos heteromórficos no que se diz respeito à localização e números de bandas (Moraes *et al* 2007a; Guerra, 2009). Dentre os híbridos, a laranja-azeda apresentou fórmulas cariotípicas heteromórficas e variáveis: 2A+1C+7D+8F (Guerra, 1993), 1B+2C+8D+7F (Befu *et al.*, 2002) e 1A+1B+1C+7D+8F (Cornélio *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2007). Uma vez que nem todos os acessos utilizados foram identificados, a extensão da variabilidade cariotípica apresentada pela espécie não pôde ser investigada.

Além do bandeamento cromossômico CMA/DAPI, o número e a localização dos sítios de DNAr 5S e 45S fornecem dados que proporcionam marcadores cromossômicos adicionais nas análises. A utilização dessas técnicas em conjunto, possibilitou definir subtipos cromossômicos característicos de determinadas espécies como o subtipo cromossômico D/5S-45S, presente nas tangerinas, e o subtipo F/5S, característico das toranjas (Moraes *et al.*, 2007a e b). A identificação de todos os cromossomos homólogos e homeólogos, no entanto, só foi possível com a introdução na FISH com sondas genômicas de cópia única em vetores com grandes insertos (100-300 kb), tais como os cromossomos artificiais de bactérias (BAC) (Mendes *et al.*, 2010; Costa Silva *et al.*, 2012). Em *Citrus medica* L. (2B+ 8D + 8F), uma das espécies puras do grupo, os nove pares cromossômicos foram identificados com marcadores da biblioteca de BAC de uma espécie relacionada, *Poncirus trifoliata*. Além disso, a análise desse estudo em comparação com o mapeamento de *P. trifoliata* permitiu também propor os principais mecanismos envolvidos na evolução cromossômica no grupo (Mendes *et al.*, 2011). Recentemente, Costa Silva (2012), analisou a possível origem da laranja-doce a

.....
partir de *C. reticulata* e *C. maxima*, baseando-se no reconhecimento com BACs marcadores dos cromossomos homeólogos de seus possíveis parentais identificados em trabalhos anteriores (Nicolosi *et al.*, 2000; Moore 2001) e corroborados com estudos genômicos mais recentes (Wu *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013). Embora no geral compatível, os cromossomos tipo B de *C. sinensis* não foram conservados em relação aos seus parentais, sugerindo modificações a partir de cromossomos tipo A oriundos de *C. maxima*.

No presente trabalho, a suposta variabilidade intraespecífica em *C. aurantium* foi reavaliada por meio da análise dos padrões de bandas CMA⁺ e sítios de DNAr 5S e 45S em nove acessos da espécie e em um acesso de *Citrus natsudaidai*, incluída por Swingle como uma variante de *C. aurantium* (Swingle e Reece, 1967). O cariótipo mais comum identificado para *C. aurantium* foi então investigado com marcadores BAC cromossomo–específicos previamente utilizados nos supostos parentais visando esclarecer o relacionamento entre esses cariótipos.

Material e métodos

Material vegetal

Sementes de diferentes cultivares de *C. aurantium* e de *C. natsudaidai* foram obtidas do banco de germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, (Cruz das Almas, Bahia, Brasil) e do Texas A & M University (College Station, Texas, EUA), além de um acesso comercial (Tabela 1). Plantas jovens

foram mantidas em jarros no Jardim Experimental do Departamento de Botânica da UFPE.

Tabela 1: Acessos de *C. aurantium* e *C. natsudaidai* analisados, com suas respectivas procedências

Espécie	Cultivar	Procedência
<i>C. aurantium</i>	Australiana	Texas A&M University
	Chinesa	Texas A&M University
	Comum	CNPMF
	Double cálice	CNPMF
	Jacarandá	CNPMF
	Sem espinho	CNPMF
	Smooth flat Seville	CNPMF
	Standard	Texas A&M University
	Variegada	Comercial
<i>C. natsudaidai</i>		CNPMF

Preparação das lâminas

Meristemas radiculares foram pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 24 h a 10 °C, fixados em etanol/ácido acético (3:1, v/v) por 24 h à temperatura ambiente e estocados no freezer a -20 °C para posterior análise. Para preparação das lâminas, as raízes foram lavadas com água destilada e digeridas com uma solução de celulase 2% (Onozuka) e pectinase 20% (Sigma) por 2 h à 37 °C.

.....
.
Posteriormente, os meristemas foram lavados com água destilada e esmagados em uma gota de ácido acético 45%. As lâminas foram congeladas em nitrogênio líquido para a remoção das lamínulas e então coradas com DAPI (2 g/ml): glicerol (1:1, v/v) para seleção das melhores preparações. Em seguida, foram descoradas em etanol:ácido acético (3:1, v/v) por 30 min à temperatura ambiente e transferidas para etanol absoluto por 1-24 h.

Dupla coloração com CMA e DAPI

Após envelhecimento de três dias, as lâminas foram coradas com CMA (0,5 mg/ml) por 1 h, contracoradas com DAPI (1 µg/ml) por 30 min, montadas em meio de montagem e guardadas por mais três dias no escuro à temperatura ambiente. As melhores células foram analisadas em microscópio de epifluorescência Leica DMLB e capturadas através do Software Leica QFISH, utilizando uma câmera de vídeo Cohu-CCD. Em seguida, as lâminas foram descoradas para serem posteriormente utilizadas na hibridização *in situ*.

Hibridização *in situ*

As sondas D2 (fragmento de 500 pb do DNAr 5S de *Lotus japonicus*; Pedrosa *et al.*, 2002) e R2 (fragmento de 6,5 kb com unidade de repetição do 18S-5,8S-25S de *Arabidopsis thaliana*; Wanzenböck *et al.*, 1997) foram utilizadas para localização dos sítios de DNAr 5S e 45S, respectivamente. Adicionalmente, os BACs 28A07, marcador do cromossomo 3, e 32G14, marcador do cromossomo 6,

.....
.

foram utilizados como marcadores cromossomo-específicos em *C. aurantium* ‘Comum’. Esses BACs foram previamente mapeados em *C. maxima* e *C. reticulata*, sendo um da biblioteca genômica de *Poncirus trifoliata* (28A07) e um BAC (32G14) da biblioteca de *C. clementina* hibridizado em *C. reticulata* (Costa Silva *et al.*, 2015; Mendes *et al.*, em andamento). As sondas foram marcadas com biotina-16-dUTP (Roche), Cy3-dUTP (GE) ou digoxigenina-11-dUTP (Roche) por *nick translation* (Roche ou Invitrogen). A hibridização das sondas de DNAr seguiu o protocolo de Jiang *et al.* (1995) com modificações, enquanto os BACs foram hibridizados segundo (Mendes *et al.*, 2011) A mistura de hibridização foi constituída de 50% formamida (v/v), 10% sulfato de dextran (v/v), 2× SSC, e 2–5 ng/μL de sonda. O banho de estringência foi realizado a temperatura de 42 °C em 0,1× SSC. A sonda marcada com biotina foi detectada com anticorpo anti-biotina produzido em camundongo (Dako) e os sinais amplificados com anticorpo contra anticorpos de camundongo desenvolvido em coelho conjugado com TRITC (Roche). Para a sonda marcada com digoxigenina, a detecção foi realizada com o anticorpo anti-digoxigenina-FITC de ovelha e a amplificação com anticorpo anti-IgG de ovelha conjugado com FITC (Roche). As preparações foram coradas com DAPI (2 g/mL) e montadas em Vectashield (Vector). As imagens das células foram adquiridas como indicado anteriormente.

Resultados

As cultivares analisadas apresentaram 18 cromossomos meta a submetacêntricos e o padrão de coloração CMA/DAPI permitiu realizar uma melhor caracterização dos cariótipos. Todo o complemento se mostrou uniformemente corado com DAPI, exceto nas regiões onde se localizaram as bandas CMA⁺/DAPI⁺. Estas foram identificadas preferencialmente na região terminal do braço longo dos cromossomos, caracterizando o tipo cromossômico D como mais frequente. Os cromossomos tipo A e C foram observados em todos os acessos, embora com heteromorfismo no tamanho das bandas (Fig. 1, 2 e 3). Em *C. aurantium*, todos os acessos apresentaram cromossomos tipo A com a banda proximal e uma das bandas terminais fracas, enquanto que em *C. natsudaidai* todas mostraram a mesma intensidade (Fig. 2). Para o tipo cromossômico B, identificado em sete dos acessos, a banda CMA⁺ proximal foi sempre menor que a banda terminal (Fig. 3). Em todos os cariótipos foi observado um par F_L (o maior cromossomo F, sem bandas ou com uma banda bem pequena no braço longo, Fig. 1a). Com base no padrão de bandeamento, cinco fórmulas cariotípicas (Figura 3), contendo cinco tipos cromossômicos distintos, foram identificadas: 'Variegada', 1A + 1C + 7D + 9F; 'Chinesa' 1A + 1B + 2C + 6D + 8F; 'Smooth Flat Seville' com 2A + 1C + 8D + 7F; 'Comum', 'Jacarandá', 'Standard', 'Sem espinho', 'Double calice' e 'Australiana' com 1A + 1B + 1C + 8D + 7F; e *Citrus natsudaidai* com fórmula 2A + 1C + 6D + 9F (Fig. 3). A fórmula 1A + 1B + 1C + 8D + 7F foi a mais comum para a espécie, sendo observada em seis dos nove acessos.

A distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S foi analisada nas cultivares ‘Variegada’, ‘Sem espinho’, ‘Standard’ e em *C. natsudaidai* (Fig. 3). Os sítios de DNAr 45S foram identificados em número de três e coincidiram com as bandas CMA⁺ localizadas nas regiões proximais de cromossomos A e B ou nas regiões terminais de cromossomos C e D. Em ‘Variegada’ eles foram observados nos cromossomos A, C e no maior par cromossômico D (Fig. 1 e 2). Enquanto que em ‘Sem espinho’ e ‘Standard’ foram mapeados nos mesmos cromossomos, A, B e num par de D (Fig. 1-3). Em *C. natsudaidai*, dois sítios estavam nos cromossomos A e outro num D (Fig. 2-3).

Os sítios de DNAr 5S foram mapeados apenas nas cultivares ‘Variegada’ e ‘Sem espinhos’. Esses sítios apresentaram variação quanto ao tipo cromossômico nos quais estavam presentes. Em ‘Variegada’ eles foram identificados em posição subterminal em dois dos cromossomos portadores do DNAr 45S, C e D (Fig. 2-3). Esse cromossomo D foi denominado D/5S-45S (ver Carvalho *et al.*, 2005). Já na cultivar ‘Sem espinho’, um sítio foi localizado no cromossomo F e outro no tipo D também portador do DNAr 45S (Fig. 1 e 3).

Visando entender a origem do cariótipo mais frequente de *C. aurantium* L., foram utilizados dois BACs marcadores para os cromossomos 3 (28A07) e 6 (32G14) na variedade ‘Comum’. O BAC 28A07 apresentou marcação adjacente à banda CMA⁺ no braço longo do cromossomo A e de um D. Já o BAC 32G14 marcou os braços curtos em cromossomos tipo C e D.

Discussão

Variabilidade no padrão de bandeamento e sítios de DNAr

O uso combinado da dupla coloração com CMA/DAPI e mapeamento dos sítios de DNAr 45S e 5S permitiu realizar a caracterização citogenética de nove acessos de *C. aurantium* L.. Seis tipos cromossômicos (A, B, C, D, F e F_L) foram identificados compondo quatro diferentes fórmulas cariotípicas. A maioria dos acessos (seis de um total de nove) apresentou o mesmo conjunto (1A+1B+1C+8D+7F) descrito anteriormente por Cornélio *et al.*, (2003) e diferiu apenas no número de cromossomos D e F quando comparado com a fórmula cariotípica (1A+1B+1C+7D+8F) proposta por Yamamoto *et al.*, (2007).

Para *C. natsudaidai*, uma pequena contradição com o cariótipo descrito na literatura por Yamamoto *et al.*, (2005) foi encontrada. Esses autores reportaram uma fórmula que corresponderia, usando a nomenclatura proposta por Carvalho *et al.*, 2015, a 1A+2C+7D+8F, enquanto que no presente trabalho foi encontrado 2A+1C+6D+9F. Essa diferença pode ser devido ao não uso do DAPI como contra-corante, levando a um menor contraste das bandas CMA⁺, onde um cromossomo tipo A com a banda proximal fracamente corada tivesse sido erroneamente reconhecido como um cromossomo tipo C. Contudo, a existência de um polimorfismo intraespecífico, como observado para *C. aurantium*, não pode ser descartado.

Recentemente, Barros e Silva *et al.* (2010) demonstraram que os blocos CMA⁺, exceto os que correspondem ao DNAr 45S, apresentam, em sua maioria, a mesma constituição, sendo compostos por sequências de DNA satélite, denominado CsSat. A distribuição desse DNA satélite, e consequentemente dos tipos cromossômicos, variou entre acessos, sugerindo expansão e contração no número de repetições desse DNA satélite. Esse aumento ou diminuição pode estar relacionado à atuação da recombinação ectópica, mediados ou não pelas unidades de repetição presentes em diferentes cromossomos. Uma vez que a sintenia entre as espécies básicas tem sido mantida (Mendes *et al.*, 2011; Costa Silva, 2012; Costa Silva *et al.*, 2015), rearranjos estruturais provavelmente não estão envolvidos, e a expansão e a contração de sequências de CsSat foram propostos para explicar as diferenças na quantidade dos diferentes tipos cromossômicos encontrados entre as espécies puras do gênero. É possível que esse mesmo mecanismo também explique a diferença observada entre os tipos cromossômicos da laranja-doce e seus parentais, *C. maxima* e *C. reticulata* (Costa Silva, 2012). Uma vez que na laranja-azedada foram observadas diferenças entre cultivares da mesma espécie, isso significaria que as mudanças nos blocos heterocromáticos seriam mais rápidas e frequentes que as mudanças associadas à especiação das espécies puras do gênero ou ao surgimento da laranja doce, que manteve seu cariótipo inalterado em todas as variedades analisadas (Pedrosa *et al.*, 2000).

A localização do DNA ribossomal mostrou uma conservação numérica dos sítios entre todos os espécimes analisados. Para o 45S, dois dos três loci identificados estavam presentes em cromossomos tipo A (A/45S) e D, independente da fórmula cariotípica encontrada no acesso. Nesse mesmo cromossomo D também

.....
.
foi identificado um sítio de DNAr 5S (D/5S-45S) nos dois acessos analisados ('Variegada' e 'Sem espinho'), ambos com fórmula cariotípica distinta. Essa distribuição de DNAr em cromossomos tipo D foi anteriormente relatada para outras espécies híbridas do gênero (Pedrosa *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 207b), tendo sido herdado a partir do cromossomo 5 de *C. reticulata* (Costa Silva *et al.*, 2015). O 5S também foi identificado em um cromossomo tipo F (F/5S) de 'Sem espinho', cultivar que apresentou a fórmula cariotípica frequentemente encontrada em *C. aurantium*, mostrando também que ele pode estar presente em todos os acessos de laranja-azedada com mesma fórmula cariotípica. De fato, esse cromossomo tipo F (F/5S) é o homeólogo em *C. maxima* do D/5S-45S, e é esperado nos híbridos que se originaram a partir dessa espécie, tais como *C. sinensis* (Pedrosa *et al.*, 2000), *C. paradisi* e no tangelo 'Orlando' (Moraes *et al.*, 2007) e *C. aurantium*.

A identificação de um cromossomo C/5S-45S na cultivar Variegada se mostra como um dado novo para *Citrus* e levanta a hipótese de que podem existir outras espécies puras no gênero *Citrus* ou em gêneros proximamente relacionados que poderiam ter participado da formação de híbridos com *C. aurantium*. De fato, esse mesmo tipo cromossômico foi recentemente detectado em *Fortunella obovata* (Barros-e-Silva *et al.*, 2013), intimamente relacionada às espécies de *Citrus* (Garcia-Lor *et al.*, 2013a), o que mostra que ele pode estar bem representado em outros grupos menos estudados.

A origem dos cariótipos de C. aurantium e C. natsudaidai

Comparando as quatro fórmulas cariotípicas encontradas nos nove acessos de *C. aurantium*, com aquelas dos seus supostos parentais (*C. maxima* e *C. reticulata*), foi observada a presença de cromossomos A, tipo cromossômico ausente em várias espécies cítricas (Cornélio *et al.*, 2003; Yamamoto e Tominaga, 2003; Carvalho *et al.*, 2005) mas presente em *C. maxima* (4A+2C+4D+8F) e em outros supostos híbridos envolvendo esta espécie (Moraes *et al.*, 2007) (Fig.3). A ocorrência de cromossomos A também na amostra investigada de *C. natsudaidai* fornece um novo indício de que essas duas espécies sejam de fato proximamente relacionadas, como proposto por Swingle (Swingle e Reece, 1967). Nesse caso, parece provável que *C. natsudaidai* seja mais um dos numerosos híbridos de *C. maxima* com alguma das outras espécies de citros.

A presença dos cromossomos D/5S-45S e F/5S na cultivar ‘Sem espinho’ também reforça a relação de parentesco entre *C. aurantium* com *C. reticulata* e *C. maxima*, embora esse padrão precise ser confirmado em outras cultivares de laranja-azeda. Os dados cariotípicos concordam, portanto, com a conclusão de vários autores usando dados bioquímicos e moleculares de que *C. aurantium* seria um híbrido derivado de *C. maxima* e *C. reticulata* (Moore, 2001). Recentemente, Garcia-Lor e colaboradores (2013) realizaram um estudo filogenético que se baseou numa análise de 42 marcadores SNPs identificados em 27 genes nucleares e corroboraram os dados anteriores que *C. aurantium* é um híbrido natural interespecífico entre *C. reticulata* e *C. maxima*. Além disso, o sequenciamento do genoma de *C. aurantium* ‘Seville’ e a análise comparativa com outros oito genomas indicam que a laranja-azeda é um híbrido F1 do cruzamento dessas duas espécies.

A FISH com BACs marcadores em *C. aurantium* ‘Comum’ permitiu identificar a origem dos cromossomos marcadores (A, B e C) da espécie a partir da comparação com os cromossomos de seus parentais *C. reticulata* e *C. maxima* (Fig. 3). A marcação do BAC 28A07 nos tipos cromossômicos A e D em *C. aurantium* demonstra que o cromossomo tipo A é o cromossomo 3, o qual foi herdado de *C. maxima* (Costa Silva, 2012). Já em *C. reticulata* esse mesmo BAC hibridizou em cromossomo tipo C, diferente do observado em *C. aurantium* ‘Comum’. No entanto, o cromossomo C de *C. aurantium* não corresponde ao cromossomo 3 e é na verdade originário do cromossomo 6 de *C. maxima*, também um C, como mostrou o BAC 32G14 (Fig. 5). Esse resultado sugere possivelmente uma redução da banda CMA⁺ fraca do braço curto do cromossomo 3 herdado de *C. reticulata*, dando origem a um cromossomo tipo D em *C. aurantium* ‘Comum’. Em ‘Chinesa’, dois cromossomos C foram observados, não estando claro se um deles seria o cromossomo 3 tipo C original. No entanto, essa cultivar apresenta um número diferente de Ds e Fs em relação ao esperado, indicando ao menos outras alterações em relação aos parentais. Já os dois cromossomos tipo A presente em ‘Smooth flat Seville’ (2A + 1C + 8D + 7F) poderiam ser os cromossomos 3 e 7 originais, sem a mudança do cromossomo 7 de A para B como observado na maioria dos demais acessos. No entanto, mesmo nesse acesso, apenas um cromossomo tipo C, não dois, são observados (Fig. 3).

Desse modo, fica evidente que em ambos os híbridos já estudados, laranja-doce e laranja azeda (Costa Silva, 2012 e presente trabalho) a formação do híbrido está associada à mudança na distribuição da heterocromatina. Como *C. aurantium* ‘Seville’ é um híbrido F1 mantido de forma assexuada (Garcia-Lor *et al.*, 2013),

.....
.
essas mudanças podem estar associadas diretamente ao evento de hibridação. No caso de *C. aurantium*, as mudanças afetaram cromossomos de ambos os parentais, mas também envolveram os cromossomos 3 e 7, os mais variáveis entre as espécies básicas analisadas (Costa Silva *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2011; Costa Silva *et al.*, 2015).

.....
.
Referências bibliográficas

BARROS SILVA AE, MARQUESA, DOS SANTOS KG, GUERRA M (2010).

The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Research*, 18(4), 503-514.

BARROS E SILVA AE, DOS SANTOS SOARES FILHO W, GUERRA M

(2013). Linked 5S and 45S rDNA Sites Are Highly Conserved through the Subfamily Aurantioideae (Rutaceae). *Cytogenetic and genome research* 140: 62-69.

BEFUM, KITAJIMAA, HASEGAWA K (2002). Classification of the citrus

chromosomes with same types of chromomycin A banding patterns. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*.

BRASILEIRO-VIDAL AC, DOS SANTOS-SEREJO JA, SOARES FILHO

WS, GUERRA M (2007). A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genética* 129:273-279.

CARVALHO R, SOARES FILHO WS, BRASILEIRO- VIDAL AC,

GUERRA M (2005). The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* 109:276-282

CORNÉLIO MTMN, FIGUEIRÔA ARS, SANTOS KGB, CARVALHO R,

SOARES FILHO WS, GUERRA M (2003). Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst. Evol.* 240:149-161.

-
- COSTA SILVA S, MARQUES A, DOS SANTOS SOARES FILHO W, MIRKOV TE, PEDROSA-HARAND A, GUERRA M (2011).** The cytogenetic map of the *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.—a nomenclature system for chromosomes of all citric species. *Tropical Plant Biology*, 4(2), 99-105.
- COSTA E SILVA S, MENDES S, SOARES FILHO W S, PEDROSA-HARAND (2015).** Chromosome homologies between *Citrus* and *Poncirus*—the comparative cytogenetic map of mandarin (*Citrus reticulata*). *Tree Genetics & Genome* 11: 811.
- GARCIA-LOR A, FRANCK C, HAGER ST (2013).** A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Annals of Botany* 111: 1–19.
- GUERRA M (1993).** Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71:234-241.
- GUERRA M (2009).** Chromosomal variability and the origin of *Citrus* species. In: Mahoney CL, Springer DA (Eds) *Genetic Diversity*. Nova Science Publishers, Inc, New York.
- JIANG J, GILL BS, WANGT GL, RONALD PC, WARDT DC (1995).** Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *PNAS* 92:4487-4491.
- MENDES S, MORAES AP, MIRKOV TE, PEDROSA-HARAND A (2011).** Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin

-
- distribution between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as evidenced by comparative cytogenetic mapping. *Chromosome Res*, 19:521–530.
- MOORE GA (2001).** Oranges and limons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trend Genet* 17:536-540.
- MORAES AP, SOARES FILHO WS, GUERRA M (2007).** Karyotype diversity and origin of grapefruit. *Chromosome Research* 15:115-121.
- NICOLOSI E, DENG ZN, GENTILE A, LA MALFA A, 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.) Obeck]. *Theor Appl Genet* 100:361-367.
- SWINGLE WT, REECE PC (1967).** The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Weber HJ, Batchelor LD (eds). *The Citrus industry*. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, 190-430.
- WU G, SIMON P, JERRY J et al., (2014).** Sequencing of diverse mandarin, pummel and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature* 32: 656–662.
- YAMAMOTO M, TOMINAGA S (2003).** High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. *Euphytica* 129:267-274

.....
.
YAMAMOTO M, KUBO T, TOMINAGA S (2005). CMA banding patterns of chromosome of Mid and Late maturing Citrus and Acid Citrus grown in Japan. *J. Japan. Soc. Hort. Sci* 6:476-478.

YAMAMOTO M, ABKENAR AA, MATSUMOTO R, NESUMI H, YOSHIDA T, KUNIGA T, KUBO T, TOMINAGA S (2007). CMA Banding Patterns of Chromosomes in Major *Citrus* Species. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 76: 36–40.

XU Q, CHEN LL, RUAN X *et al.*, (2013). The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics* 45: 59-66.

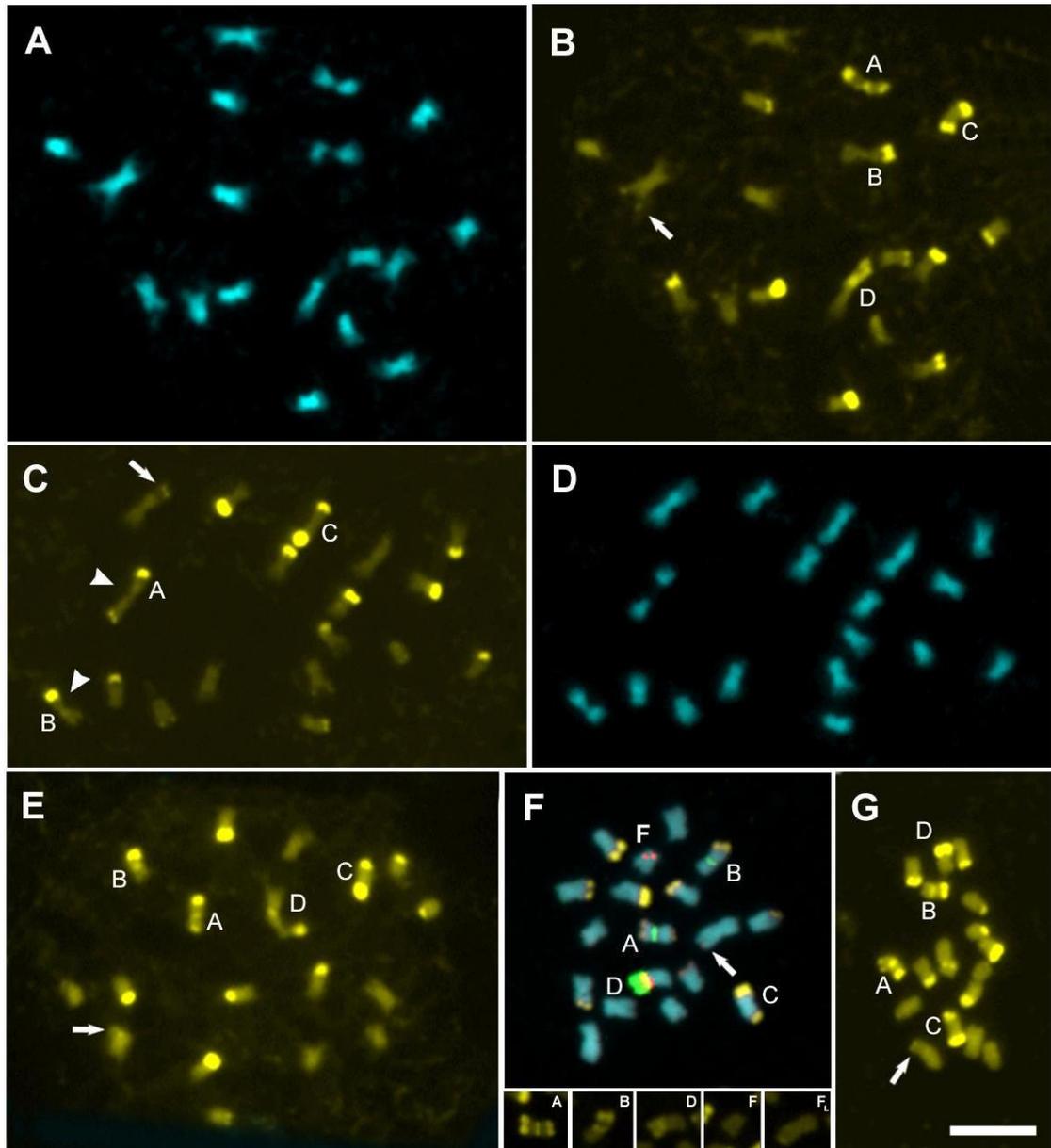
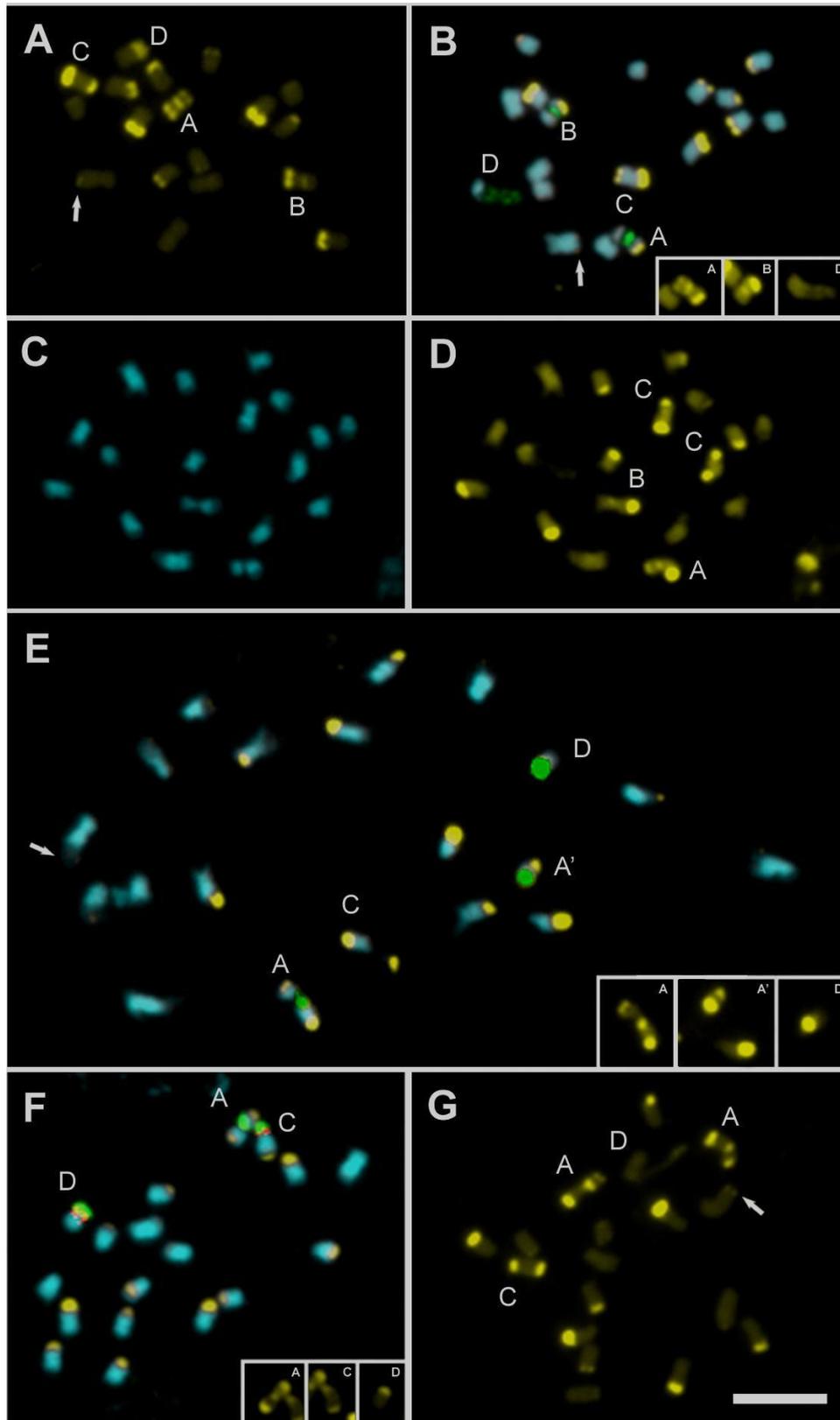


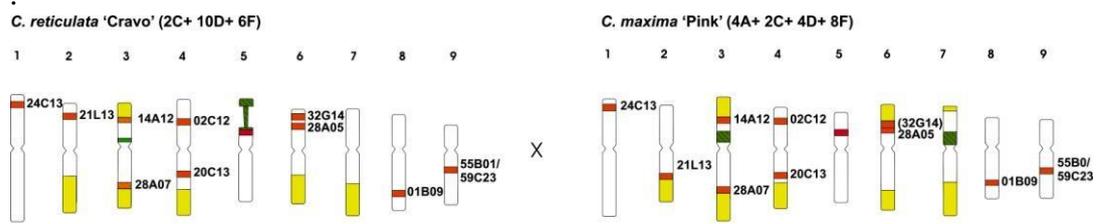
Figura 1. Padrão de bandeamento CMA⁺ e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S em *Citrus aurantium*. **A-B:** ‘Australiana’. **C-D:** ‘Double calice’. **E:** ‘Comum’. **F:** ‘Sem espinho’. **G:** ‘Jacarandá’. Fotografias mostram metáfases com bandeamento CMA⁺, cromossomos corados com DAPI, sítios de DNAr 5S em vermelho e DNAr 45S em verde. Letras maiúsculas indicam os tipos cromossômicos. Cabeça de seta e setas indicam um gap no DAPI e pequenos blocos CMA⁺ terminal em um dos cromossomos F_L, respectivamente. Detalhes em **F** mostram bandas CMA⁺ de cromossomos tipo A, B, C, F e F_L. Barra em **G** corresponde a 10 µm.



.....

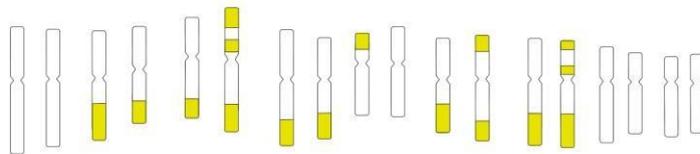
.

Figura 2. Padrão de bandeamento CMA⁺ e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S em *Citrus aurantium* e *C. natsudaidai*. **A-B:** ‘Standard’. **C-D:** ‘Chinesa’. **E:** *Citrus natsudaidai*. **F:** ‘Variegada’. **G:** ‘Smooth flat Seville’. Fotografias mostram metáfases com bandeamento CMA⁺, cromossomos corados com DAPI, sítios de DNAr 5S em vermelho e DNAr 45S em verde. Letras maiúsculas indicam os tipos cromossômicos. Setas indicam pequenos blocos CMA⁺ terminal em um dos cromossomos F_L. Detalhes em **B** mostram bandas CMA⁺ de cromossomos tipo A, B, D, em **E** mostra o tipo A e D e em **F**, os tipos A, C e D. Barra em **G** corresponde a 10 μm.

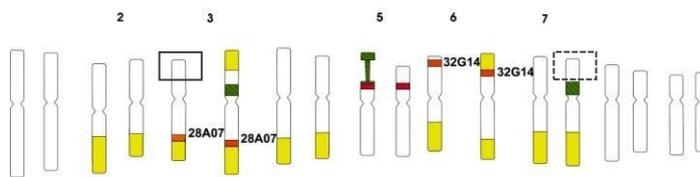


F1

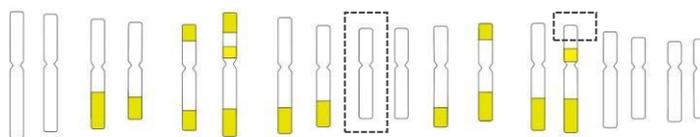
C. aurantium 'Smooth Flat Seville' (2A+ 1C+ 8D+ 7D)



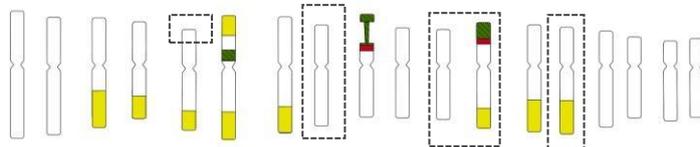
C. aurantium 'Comum' (1A+ 1B+ 1C+ 8D+ 7D)



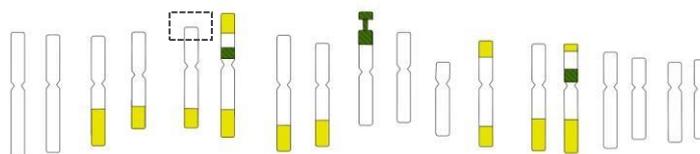
C. aurantium 'Chinesa' (1A+ 1B+ 2C+6D+ 8F)



C. aurantium 'Variegada' (1A+ 1C+7D+ 9F)



C. natsudaikai (2A+ 1C+6D+ 9F)



.....

.

Figura 3. Representação esquemática da distribuição cromossômica das bandas CMA⁺,(amarelo) dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) e dos BACs marcadores (laranja) nos cromossomos dos acessos de *C. aurantium* e *C. natsudaidai* analisados em comparação aos cariótipos das espécies parentais *C. reticulata* (modificado de Costa Silva *et al.*, 2015) e *C. maxima* (modificado de Costa Silva, 2012). A fórmula cariotípica de ‘Comum’ é a mesma das variedades ‘Jacarandá’, ‘Standard’, ‘Sem espinho’, ‘Double Calice’ e ‘Australiana’, porém a posição dos sítios de DNAr 45S só foi confirmada para ‘Sem espinho’ e ‘Standard’ e do DNAr 5S para ‘Sem espinho’. Quadrados indicam mudança confirmadas (linhas contínuas) ou sugeridas (linhas tracejadas) no bloco CMA⁺ ou no tipo cromossômico em relação aos parentais. A localização do BAC 32G14 no cromossomo 6 foi confirmada em *C. reticulata*, mas não em *C. maxima*.

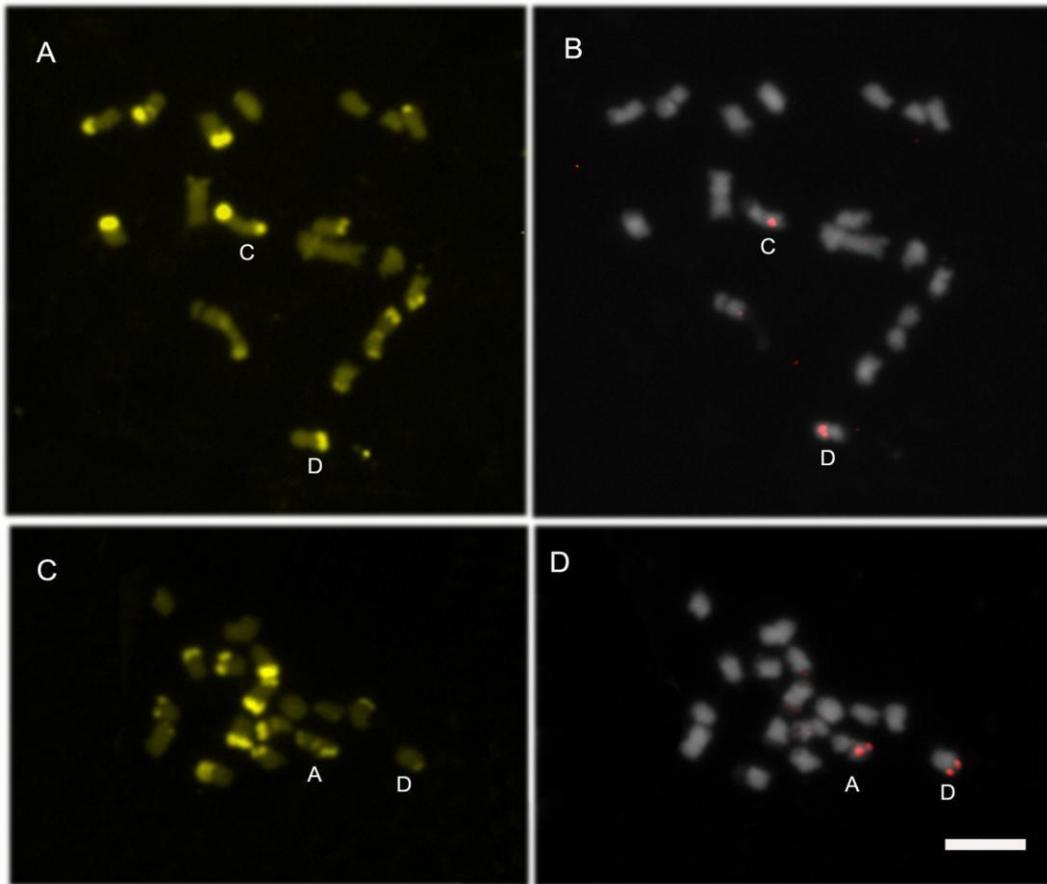


Figura 4. Hibridização dos BACs cromossomo-específicos em *C. aurantium* ‘Comum’ em comparação aos tipos cromossômicos revelados pelos blocos CMA⁺. Em **A** e **C**, padrão de bandeamento CMA⁺. Em **B** e **D**, marcação dos BACs 17K23 e 28A07 respectivamente. Barra em **F** corresponde a 10 μ m.

.....

.

CONCLUSÕES

.....

CONCLUSÕES

1. Os clones BACs são uma ferramenta bastante útil na integração de mapas citogenéticos e sequências genômicas, como demonstrado em *C. reticulata*.
2. A integração dos dados citogenéticos com os dados genômicos demonstraram uma congruência na montagem dos genomas das espécies cítricas, particularmente o da espécie *C. clementina*, aqui investigado.
3. O bandeamento CMA/DAPI e a FISH com sondas de DNAr 5S e 45 demonstraram uma grande variabilidade cariotípica nos nove acessos de *C. aurantium* e em *C. natsudaidai*, possivelmente resultantes de reduções dos blocos heterocromáticos formados por sequências CsSat.
4. A presença de um cromossomo tipo A/45S e um tipo F/5S confirmam a origem de *C. aurantium* a partir de *C. maxima*. Já o cromossomo tipo D/5S-45S confirma a participação de *C. reticulata* na origem desse híbrido.
5. A FISH com BACs marcadores em *Citrus aurantium* ‘Comum’ permitiu inferir a origem dos cromossomos marcadores da espécie a partir da comparação com os cromossomos previamente mapeados de seus parentais *C. reticulata* e *C. maxima*. O cromossomo 7 seria um tipo A, enquanto o B é o cromossomo 3 e o C, o cromossomo 6.
6. Todos os acessos de *C. aurantium* revelaram diferenças na distribuição da heterocromatina em relação ao esperado a partir de um cruzamento dos seus parentais, sugerindo alterações cromossômicas após a hibridização.
7. Embora a hipótese de contração/expansão de sequências repetitivas seja a mais provável para explicar as diferenças entre o híbrido e seus parentais, não podemos descartar as hipóteses da presença de eventos eventuais de reprodução sexuada entre híbridos, ou de sua origem múltipla envolvendo eventualmente outras espécies, particularmente no caso de *C. aurantium* ‘Variegada’.

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

Instructions for Authors

Editorial procedure

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

Manuscript Submission

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

Permissions

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

Online Submission

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

Language

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

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

· Edanz Editing Global

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

.....
.
Types of papers

• **Original papers:**

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

• **Reviews:**

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

• **Opinion papers:**

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

• **Short communications:**

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

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

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

Keywords

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

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format

.....
.
(older Word versions).

· Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

· LaTeX macro package (zip, 182 kB) Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

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

Footnotes

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

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

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

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

Scientific style

· Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

· Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

· Genus and species names should be in italics.

· Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Data Submission Standards

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

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

Final acceptance of a manuscript into TGG is contingent on all relevant accession

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

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

Nucleotide sequences

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

- DNA Data Bank of Japan
- European Molecular Biology Laboratory
- GenBank

Next-Generation Sequencing Reads

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

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

- Short Read Archive
- Transcriptome Shotgun Assembly Sequence Database

Sequence Alignments

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

- PopSet

Protein sequences

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

- SwissProt
- Protein Information Resource

SNPs

Single nucleotide polymorphisms must be deposited into dbSNP.

- dbSNP

Genetic Maps

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

For forest tree species, submit all maker/position data to the TreeGenes database.

Please contact tg-help@ucdavis.edu for submission assistance.

For horticulture tree species, please follow instructions and submit all marker/position

data to the Genome Database for Rosaceae (GDR) or the Citrus Genome Database.

Please contact tgg@bioinfo.wsu.edu for submission assistance.

- TreeGenes database
- Genome Database for Rosaceae
- Citrus Genome Database

.....

·

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

Supplemental files in the form of marker/genotype data, phenotype data, and environmental descriptors should be submitted to the relevant organism database. For forest tree species, submit all formatted files to the TreeGenes Database. Please contact tg-help@ucdavis.edu for submission assistance.

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

- TreeGenes database
- Genome Database for Rosaceae
- Citrus Genome Database

Gene Expression data

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

- Microarray Gene Expression Data Society
- ArrayExpress
- Gene Expression Omnibus

Computational modeling

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

- Systems Biology Markup Language
- BioModels database Other Supplemental Data

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

- Dryad

References

Citation

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

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

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

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

- Journal article

-
- .
- Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
- Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
- Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
- Article by DOI
- Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
- South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London
- Book chapter
- Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
- Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
- Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California
- Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN
- List of Title Word Abbreviations, see
- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php
- For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
- EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

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

Artwork

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

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.

-
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
 - Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
 - Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

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

Combination Art

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

Color Art

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

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

-
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

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

Figure Placement and Size

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

Permissions

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

Accessibility

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

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

Electronic Supplementary Material

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

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title,

.....
journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

· To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

· Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

· Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

· A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

· Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

· If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

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

Collecting Multiple Files

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

Numbering

· If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

· Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.

· Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

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

Processing of supplementary files

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

Accessibility

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

· The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

· Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk) After acceptance Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

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

Open Choice

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

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

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

Proof reading

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

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

Online First

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

Integrity of research and reporting

Ethical standards

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

Conflict of interest

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For

.....

.
each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list. If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.