

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

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO COMPARATIVO ENTRE *Poncirus trifoliata*
(L.) Raf. E *Citrus medica* L. UTILIZANDO FISH-BAC**

SANDRA MENDES DA SILVA

RECIFE
2010

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

**MAPEAMENTO CITOGÊNÉTICO COMPARATIVO ENTRE *Poncirus trifoliata*
(L.) Raf. E *Citrus medica* L. UTILIZANDO FISH-BAC**

Dissertação de mestrado apresentada por Sandra Mendes da Silva ao curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Florística e Sistemática

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Pedrosa-Harand

(Depto. Botânica, UFPE)

RECIFE
2010

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

S586m Silva, Sandra Mendes da

Mapeamento citogenético comparativo *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e *Citrus medica* L. utilizando FISH-BAC / Sandra Mendes da Silva. – Recife: O Autor, 2013.

66 f. : il., fig.

Orientadora: Andrea Pedrosa-Harand

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Vegetal, 2013.
Inclui bibliografia e anexos

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

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-106

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

**MAPEAMENTO CITOGÊNÉTICO COMPARATIVO ENTRE *Poncirus trifoliata*
(L.) Raf. E *Citrus medica* L. UTILIZANDO FISH-BAC**

COMISSÃO EXAMINADORA

Membro titulares:

Profa.. Dra. Andrea Pedrosa- Harand (orientadora), Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Profa. Dra. Ana Brasileiro-Vidal, Depto. de Genética, CCB, UFPE

Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela, Depto. Biologia Geral, UEL

Membros suplentes:

Prof. Dr. Marcus Alves, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof. Dr. Reginaldo Carvalho, Depto. Genética, UFRPE

DEDICATÓRIA

À minha mãe
Dedico

AGRADECIMENTOS

Em especial:

À minha mãe que apesar das dificuldades enfrentadas para me educar durante a infância, me ensinou a persistir e nunca desistir dos meus objetivos. Amo você, sempre!

Enfim...

Muitas foram as pessoas que colaboraram, seja direta ou indiretamente, com a realização deste trabalho, a todas quero expressar aqui minha gratidão:

À CAPES pela bolsa sem a qual eu não conseguiria prosseguir nos estudos.

Ao Prof. Marcelo Guerra por ter me dado a oportunidade inicial de trabalhar no laboratório com pessoas altamente capacitadas.

À Andrea Pedrosa pela excelente orientação, paciência nos momentos difíceis e acima de tudo, pela confiança em mim. Você foi essencial na minha vida acadêmica.

À Ana Paula Moraes por ter me iniciado na citogenética, que apesar das broncas e puxões de orelha sempre me dava suporte em todas as minhas atividades. Muito obrigada, você foi realmente muito importante pra mim!

À Silvokleio Costa pela amizade, paciência, companheirismo e muito, muito incentivo (*sniff...*).

À Luiz Gustavo e Magdalena Vaio pela ajuda técnica e conselhos nas horas de muitas dúvidas.

Aos meus amigos do laboratório: Aretuza, Liliane, Joana, Artur, Lidiane, Tiago, Gabi, André, Ana Emília, Fernando, Eliene, Leonardo e Nice.

Muito obrigada!

RESUMO

Vinte e cinco BACs de uma biblioteca genômica de *Poncirus trifoliata* ($2n = 18$, 4B+8D+4F+2F_L), previamente mapeados nesta espécie, foram hibridizados *in situ* para construir o primeiro mapa citogenético comparativo para uma espécie de citros, a cidra (*Citrus medica* L., $2n = 18$, 2B+8D+6F+2F_L). Esta foi escolhida, pois é considerada uma das seis espécies verdadeiras do gênero e teria originado alguns dos principais híbridos de importância econômica. Dentre os BACs utilizados, 14 apresentaram sinal único, quatro dos quais apresentaram marcação no único par cromossômico do tipo B (cr. 3), sendo dois no braço curto (14A12 e 32D14) e dois no braço longo (28A07 e 27P09). Esses BACs hibridizaram em braços opostos em um cromossomo tipo B de *P. trifoliata*. Seis BACs hibridizaram em cromossomos tipo D: 21L13 (cr. 2), 02C12, 20C13 (cr. 4), 24E07, 55B01 e 59C23 (cr. 9). Destes, apenas a posição e o tipo cromossômico de 02C12 e 20C13 coincidem com sua localização em *P. trifoliata*. Os BACs 20C12 e 28A05 (cr. 6) apresentaram marcação em cromossomo tipo F em cidra e D em *P. trifoliata*. Diferentemente, os BACs 01B09 (cr. 8) e 24C13 (cr. 1) marcaram cromossomos do tipo F e FL respectivamente, em ambas as espécies. Sete BACs apresentaram marcação dispersa e quatro não mostraram sinal em cidra, embora tenham apresentado sinal único em *P. trifoliata*. Os resultados obtidos por meio das análises de homeologia sugerem que ampliações e desamplificações de sequências repetitivas que compõem os blocos CMA⁺ sejam os principais responsáveis pela diferenciação cromossômica entre esses dois gêneros altamente sintênicos.

Palavras-chave: BAC, Homeologia, FISH, *Citrus medica*, *Poncirus trifoliata*

ABSTRACT

Twenty five BAC clones from a genomic library of *Poncirus trifoliata* ($2n = 18$, 4B+8D+4F+2F_L), previously mapped in this species, were used as probes for fluorescent *in situ* hybridization in order to construct a comparative cytogenetic map of citron (*Citrus medica* L., $2n = 18$, 2B+8D+6F+2F_L), the first one for a *Citrus* species. Citron was chosen because it is one of the six considered true species of the genus and it is thought to have originated some of the most economically important hybrids. Fourteen BACs gave unique signals. Among them, four mapped on the B chromosome pair (chr. 1), two were located on the short chromosome arm (14A12 and 32D14) and two on the long arm (28A07 and 27P09). Although these BAC clones also mapped to a B chromosome in *P. trifoliata*, they hybridized to the opposite chromosome arms in the latter species. BAC clones 21L13 (chr. 2), 02C12, 20C13 (chr. 3), 24E07, 55B01 and 59C23 (chr. 7) hybridized to D chromosomes. Among these clones, only 02C12 showed the same localization and labeled the same chromosome type in *P. trifoliata*. BAC clones 20C12 and 28A05 (chr. 4) hybridized to F chromosomes in citron and D in *Poncirus*. Only BACs 01B09 (chr. 8) and 24C13 (chr. 9) hybridized to F and F_L chromosomes, respectively, in both species. Seven BACs showed a dispersed hybridization signal and four other BACs did not hybridize in citron, although they presented unique signals in *P. trifoliata*. Analyses of homoeology suggest that amplifications and deletions of repetitive DNA sequences that constitute the CMA⁺ blocks are the main cause for the chromosome differences observed between these two highly syntenic genera.

Key words: BAC, Homoeology, FISH, *Citrus medica*, *Poncirus trifoliata*

Sumário

1. Apresentação	11
2. Revisão da Literatura.....	13
2.1. Citogenética Vegetal.....	14
2.1.1. Bandeamento.	14
2.1.2. Bandeamento com fluorocromos	15
2.1.3. Hibridização in situ.....	16
2.1.4. Bibliotecas genômicas e mapeamento físico	18
2.1.5. Citogenética molecular comparativa	18
2.2. O gênero Citrus.....	19
2.2.1. Origem e distribuição geográfica.....	19
2.2.2. Importância econômica.....	20
2.2.3. Taxonomia do gênero Citrus.	20
2.2.4. Citogenética do gênero Citrus.	22
2.2.5. Bandeamento Cromossômico e FISH em Citrus.	22
3. Referências Bibliográficas.....	25
4. Manuscrito a ser submetido à revista Chromosome Research.	35
5- CONCLUSÕES.....	61
6. Anexos.....	63

1. Apresentação

Citrus é um dos gêneros economicamente mais importantes para a fruticultura mundial, sendo as laranjas, os limões, as tangerinas e os pomelos as culturas de maior destaque. No entanto, os estudos taxonômicos desse gênero são bastantes controversos devido à dificuldade de delimitação de suas espécies (Nicolosi, 2007). Esta complexidade é resultante da fraca barreira reprodutiva entre seus representantes, permitindo a formação de híbridos interespecíficos, associada com a frequente poliembrião nucelar, assim como seu longo histórico de cultivo e seleção de mutantes somáticos (Moore, 2001).

Citogeneticamente, as espécies de *Citrus* ($2n = 18$) são caracterizadas por apresentarem cromossomos pequenos (1 a 3,5 μm) e morfológicamente similares (submetacêntricos e metacêntricos) (Guerra *et al.*, 2000). Porém, o número e posição dos blocos CMA⁺ permitiram reconhecer os principais tipos cromossômicos: A, com duas bandas terminais e uma proximal; B, com uma banda terminal e outra proximal; C, com bandas terminais; D, com uma banda terminal; e F, sem bandas (Carvalho *et al.*, 2005). A caracterização cariotípica deste gênero tem sido refinada pela localização de sequências de DNAr 5S e 45S utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

Os resultados citogenéticos obtidos, assim como os estudos taxonômicos, bioquímicos e moleculares, indicam que a cidra (*Citrus medica* L. – 2B+8D+6F+2FL), a toranja (*C. maxima* Burm. – 4A+2C+4D+8F) e quatro tangerinas (*C. reticulata*, *C. deliciosa*, *C. reshi* e *C. sunki*.) são as espécies básicas do gênero (Barret e Rhodes, 1976; Moore, 2001; Moraes *et al.*, 2007a). Essas também são denominadas puras ou verdadeiras e possuem cariótipos homomórficos, enquanto que os demais representantes são híbridos e apresentam cariótipos heteromórficos.

Apesar desses avanços, entretanto, até recentemente os estudos citogenéticos realizados no gênero *Citrus* e em gêneros correlacionados, não possibilitavam a identificação cromossômica individual e, portanto, estudos de homeologia envolvendo esses gêneros não eram possíveis. Recentemente, foi estabelecido um mapa citogenético para *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (4B+8D+4F+2FL), espécie proximamente relacionada ao gênero *Citrus*, utilizando FISH de BACs (Cromossomos Artificiais de Bactéria). Essa abordagem permitiu reconhecer seus nove pares cromossômicos (Moraes *et al.*,

2008) e disponibilizou marcadores cromossômicos para a realização de estudos sobre homeologias e evolução cromossômica dentro dos citros.

Dessa maneira, o presente trabalho, teve como objetivo estabelecer um mapa citogenético comparativo para um espécie de citros utilizando BACs oriundos de uma biblioteca genômica de *P. trifoliata* em cidra, bem como elucidar homeologias cromossômicas existentes entre as duas espécies, de forma a contribuir para a compreensão da evolução cromossômica do grupo.

2. Revisão de Literatura

2.1. Citogenética Vegetal

Os primeiros estudos citogenéticos de plantas estavam restritos à determinação do número e da morfologia cromossômica com o uso de colorações convencionais (revisado por Guerra, 2000). Entretanto, nas espécies de vegetais com cromossomos semelhantes em tamanho e morfologia, estas análises convencionais eram limitadas. Como a caracterização do conjunto cromossômico de uma espécie é essencial para a pesquisa citogenética, novas técnicas visando contornar essas limitações foram desenvolvidas. A introdução das técnicas de bandeamento cromossômico ocorreu por volta de 1970 e possibilitou a exploração de novos enfoques na caracterização cromossômica pela coloração diferencial de determinadas regiões. Baseando-se no padrão de distribuição das bandas foi possível identificar os pares de homólogos (Schwarzacher *et al.*, 1980).

2.1.2. Bandeamento

As técnicas de bandeamento cromossômico são valiosas na diferenciação cariotípica e expandem de forma significativa as análises citogenéticas. Casperson *et al.* (1968), por exemplo, realizaram um estudo pioneiro com o desenvolvimento do bandeamento Q (quinacrina), o qual revela bandas nas regiões cromoméricas. Esses autores conseguiram identificar os 23 cromossomos humanos (revisado por Darlington e La Cour, 1976). Essa técnica, bem como a técnica de bandeamento G, na qual as regiões que condensam mais cedo são mais fortemente coradas, são importantes nos estudos de citogenética humana para detectar pequenas variações cromossômicas. Uma técnica de bandeamento inverso ao bandeamento G é o bandeamento R, que cora as regiões intercromoméricas. Essas técnicas de coloração diferencial permitiram ampliar as análises de caracterização e evolução cariotípica em diversas espécies (Friebe *et al.*, 1996)

Dentre vários tipos de bandeamento pode-se destacar o bandeamento C descrito por Vosa (1985). Esta técnica é amplamente empregada na citogenética vegetal e se caracteriza por revelar blocos de heterocromatina constitutiva que permanecem condensados durante todo o ciclo celular e se distribuem preferencialmente nas regiões terminais e/ou proximais dos cromossomos (Guerra, 2000; Summer, 2003). A análise

do padrão das bandas C tem sido utilizada para a caracterização dos cromossomos homólogos, assim como nas análises cariotípicas de muitas espécies vegetais. Um exemplo disso foi realizado em triticale, híbrido resultante do cruzamento entre trigo e centeio, no qual a análise com bandeamento C permitiu a identificação dos cromossomos das espécies parentais devido à variação na distribuição dos blocos de heterocromatina (Seal e Bennett, 1982). Várias outras espécies também tiveram seus cromossomos caracterizados utilizando esta técnica de bandeamento (Aguilar-Perecin, 1985; Ortolani et al., 2007). Guerra (1985), por exemplo, sugeriu a separação dos gêneros *Dictamnus* e *Ruta* em tribos distintas, após detectar divergências no padrão de bandas C, bem como outras características citológicas. Buitendijk e Ramanna (1996) utilizaram a técnica de bandeamento C para caracterizar o cariótipo de oito espécies brasileiras e chilenas do gênero *Alstroemeria*, todas com $2n = 16$. Nesta análise foi observado um número variável de grandes bandas intercalares e teloméricas nas espécies chilenas, enquanto nas espécies brasileiras apenas blocos pequenos foram observados, indicando que os genomas dos dois grupos evoluíram diferentemente.

No entanto, o bandeamento C apresenta limitações importantes, uma delas relacionada à conservação da morfologia cromossômica, pois atua fortemente nos cromossomos levando a perda de DNA e proteínas, principalmente nas regiões eucromáticas (Summer, 2003).

2.1.2. Bandeamento com fluorocromos

Como as regiões de heterocromatina são úteis na caracterização de cariótipos, muitas técnicas nas últimas décadas têm sido aprimoradas para a visualização desta fração dos genomas. Os estudos citogenéticos passaram a incorporar o uso de fluorocromos, que são corantes que apresentam propriedades fluorescentes base-específicos que permitem caracterizar sequências repetitivas pela proporção de pares de bases GC (guanina/citosina) e AT (adenina/timina). O uso de fluorocromos tem permitido distinguir alguns tipos de heterocromatina em plantas (Schweizer, 1976). Dentre os fluorocromos que apresentam afinidade pelas bases AT se destacam o DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), o Hoechst 33258 e a quinacrina, enquanto que a cromomicina A₃ (CMA) e a mitramicina apresentam afinidade por regiões ricas em GC (Schweizer e Ambros, 1994; Sumner, 2003). Dos fluorocromos citados acima, os mais

largamente utilizados em citogenética de plantas são o CMA e o DAPI, principalmente na forma de dupla coloração. Existem várias vantagens em usar esse tipo de bandeamento com fluorocromos em relação ao bandeamento C, dentre essas se destacam a possibilidade de se conservar a morfologia e estrutura cromossômica, o uso relativamente mais rápido e altamente reproduzível, além de permitir uma análise da fração heterocromática de forma mais detalhada em virtude da coloração diferencial de cada fluorocromo (Guerra, 1993).

O uso em conjunto dos dois fluorocromos CMA/DAPI tem permitido comparar cariótipos e esclarecer relações evolutivas em vários gêneros vegetais (Roser, 1994, 1995; Moraes *et al.*, 2007a,b). Hizume *et al.* (1989), por exemplo, conseguiram caracterizar e identificar todos os cromossomos de *Pinus densiflora* e *P. thunbergii*. Outro exemplo da contribuição valiosa do uso do bandeamento CMA/DAPI foi o estudo realizado por Guerra *et al.* (2000), sobre o padrão de bandeamento em espécies da subfamília Aurantioideae. Nesse trabalho, os autores encontraram que as espécies *Murraya paniculata* e *Murraya koenigii* apresentavam padrões de bandas CMA muito diferentes, levando-os a sugerir, portanto, a inclusão da última espécie no gênero *Bergera*, dentro da subtribo *Clauseninae*, enquanto que *Murraya paniculata* seria classificada junto com o gênero *Merrillia*, dentro da subtribo *Merrilliinae*.

2.1.3. Hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* (HIS) foi desenvolvida por Gall e Pardue (1969) e a sua aplicação significou grandes avanços nos estudos citogenéticos (Jiang e Gill, 2006). Essa técnica consiste no pareamento de segmentos de DNA/RNA (sonda ou sequência repórter) com um segmento de nucleotídeos complementar (DNA-alvo) dentro da célula, permitindo, se presente, verificar sua exata localização. Para a detecção da sonda na preparação é necessário que esta sequência esteja marcada para sua identificação. Inicialmente, essa marcação era feita com moléculas radioativas, mas recentemente tem sido empregado com muito mais frequência fluorocromos, sendo, portanto, denominada de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Vários tipos de sequências podem ser utilizadas como sonda em uma FISH, sendo as sequências repetitivas em tandem, tais como o DNAr 5S e 45S, sequências centroméricas e teloméricas, as mais utilizadas. Além dessas, as sequências repetitivas dispersas e as de

cópia única ou de poucas cópias também podem ser empregadas. A utilização dessa última fração como sonda somente foi possível devido ao aprimoramento da técnica de FISH, fato que permitiu a detecção de segmentos de tamanho pequeno (Guerra, 2004).

Nos últimos anos, vários trabalhos citogenéticos em plantas vêm utilizando a técnica de FISH com diferentes enfoques (Jacobs *et al.*, 2000; Pedrosa *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2009). Carvalho e Guerra (2002), por exemplo, sugeriram uma forte estabilidade cariotípica nos 34 acessos analisados no gênero *Manihot*. Esses autores detectaram em todos os acessos a presença de quatro cromossomos com uma banda CMA⁺ na região subterminal e seis sítios de DNAr 45S revelados por FISH, sendo quatro desses sítios co-localizados com os blocos CMA⁺.

Em seu trabalho, Melo e Guerra. (2003) realizaram um estudo citotaxonômico em 20 espécies silvestres e cultivadas de *Passiflora* com números básicos secundários $x = 6$, $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$. Esses autores sugeriram a partir da variabilidade no número de sítios 5S e 45S que as espécies com $x = 6$ representam o genoma ancestral para o gênero e que as espécies com $x = 9$, 10 e 12 apresentam origem tetraplóide com disploidia reducional bem como silenciamento de alguns sítios, principalmente os de 5S.

Vaio *et al.* (2005) estudaram a origem de alotetraplóides no gênero *Paspalum* (Poaceae) utilizando a técnica de FISH com sondas de DNAr 5S e 45S e observaram que os sítios 5S eram conservados quanto ao número e à localização, ao contrário do encontrado para os sítios 45S. A localização deste último permitiu sugerir a origem dos materiais analisados, resultados que foram confirmados com estudos de filogenia baseados em DNA cloroplastidial.

Outro avanço nos estudos citogenéticos foi a introdução do uso de vetores com capacidade de clonar grandes insertos para contornar a limitação da técnica em detectar segmentos pequenos. Dentre vários vetores utilizados destacam-se os clones BACs (Cromossomos Artificiais de Bactérias), os quais permitem clonar insertos variando 100-350 kb e são altamente estáveis (Jackson *et al.*, 1999). A técnica FISH utilizando esses clones BACs tem se estabelecido como uma ferramenta bastante útil na identificação individual dos pares cromossômicos e tem sido largamente utilizada em estudos citogenéticos de várias espécies de plantas (Jiang *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004).

2.1.4. Bibliotecas genômicas e mapeamento físico

A construção de bibliotecas genômicas de grandes insertos é indispensável para a análise estrutural do genoma, além de se configurar como uma fonte de sequências para o mapeamento cromossômico (Hasterok *et al.*, 2006). Vários vetores podem ser utilizados para a clonagem de grandes insertos, tais como os BACs, YACs (Cromossomo Artificial de Levedura) e PACs (Cromossomo Artificial derivado de P1) (De Jong *et al.*, 1999). Dentre esses, os vetores BACs são os mais utilizados por serem mais estáveis (Jackson *et al.*, 1999). Atualmente, bibliotecas genômicas de BACs de várias espécies vegetais têm sido construídas (Song *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Terol *et al.*, 2008). Essas bibliotecas são indispensáveis para o mapeamento físico, o qual representa as distâncias em pares de bases de determinadas sequências de DNA (Guerra, 2004). Dentre várias alternativas utilizadas para construção de mapas físicos, a utilização da FISH para localização de sequências de DNA ao longo dos cromossomos se configura como uma abordagem eficaz. A introdução de clones BAC nessas abordagens tem permitido a localização de sequência de DNA de cópias únicas em diversas espécies (Jiang e Gill, 2006). Essa metodologia permitiu realizar o mapeamento de várias espécies vegetais, tais como: *Oryza sativa* (Cheng *et al.*, 2001), *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.*, 2002), *Brassica oleracea* L. (Howell *et al.*, 2002), *Poncirus trifoliata* (Moraes *et al.*, 2008) entre outras. Kim *et al.* (2002), por exemplo, conseguiram identificar os dez pares cromossômicos de *Sorghum bicolor* (L.) Moench com a utilização de 22 clones BACs em FISH.

2.1.5. Citogenética molecular comparativa

A incorporação de técnicas de biologia molecular ampliou consideravelmente as análises citogenéticas, principalmente no que diz respeito aos estudos de evolução cromossômica e genômica comparativa tanto em animais quanto em vegetais (Jackson *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Wimmer *et al.*, 2002; Iovene *et al.*, 2008). Uma estratégia muito utilizada em análises comparativas é o uso de BACs heterólogos que possuem sequências conservadas entre espécies proximamente relacionadas. Atualmente, sondas cromossomo-específicas para várias espécies, tanto animais quanto vegetais, têm sido disponibilizadas. Nos estudos de mamíferos e outros vertebrados,

tem-se realizado análises comparativas com a técnica de ZOO-FISH, a qual utiliza sequências de DNA de uma espécie para pintar cromossomos de outras espécies. Essa variação da FISH permite, de forma mais refinada, a confirmação das interpretações de homeologias a partir de comparações de padrões de bandas G e R, revelando muitos rearranjos cromossômicos que levaram a reorganização nos genomas de diferentes espécies (Richard *et al.*, 1996; Volleth *et al.*, 2002; Hass *et al.*, 2008). Sem dúvida, a maior contribuição desta técnica para as análises citogenéticas foi a possibilidade de detectar blocos de segmentos homeólogos. Esse enfoque tem permitido a compreensão, por exemplo, da evolução de espécies dentro do gênero *Akodon* (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998a).

Em plantas, o aumento no número de mapas cromossômicos resultou, conseqüentemente, em um aumento significativo de marcadores que ficaram disponíveis para os estudos comparativos de espécies filogeneticamente relacionadas, possibilitando, dessa forma, além de uma análise cariotípica mais detalhada, contribuições para a elucidação de eventos de evolução cromossômica (Pedrosa *et al.*, 2002; Mandakova e Lysak, 2008; Iovene *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008). Dentre vários exemplos do uso de BACs junto com a técnica de FISH em estudos comparativos, as análises nos gêneros *Arabidopsis* e *Brassica* são sem dúvida referenciais em plantas. Esses estudos têm sugerido inúmeras interrupções de colinearidade e sintenia entre esses gêneros, e também a presença de duplicações dentro das espécies de *Brassica* (Jackson *et al.*, 2000; Mandakova and Lysak, 2008).

2.2. O gênero *Citrus*

2.2.1. Origem e distribuição geográfica

Com exceção dos pomelos (*Citrus paradisi* Macf), que tiveram sua origem recente no novo mundo, todas as outras espécies do gênero *Citrus* tiveram sua origem atribuída a uma extensa região do Sudeste da Ásia, incluindo o leste da Índia, norte do Myanmar e sudeste da China (Moore, 2001). Os primeiros relatos da influência dos citros foram datados em 800 a.C. nas culturas chinesa e indiana. A cidra foi a precursora dos citros no Ocidente e foi descrita pelos macedônios na Pérsia como a “maçã das ilhas Medes”, pois apresentava boa aparência, além de resistência a patógenos, sendo, portanto, ideal para viagens prolongadas (Koller, 1994; Moore, 2001). A introdução de várias espécies de *Citrus* como a laranja-azedada (*Citrus aurantium* L.), a laranja-doce [*C.*

sinensis (L.) Osb.] e os limões na Europa e África se deu por volta de 1150 d.C. e significou um avanço considerável nas áreas de plantio (Scora, 1975).

Na América, as grandes navegações exploradoras foram as responsáveis pela introdução de várias espécies de citros (Moore, 2001). No Brasil, os citros foram introduzidos em meados do século XVI com as primeiras expedições colonizadoras. Atualmente, os citros são cultivados em diversas partes do mundo por serem bem adaptados a diferentes condições climáticas, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais (Moreira e Moreira, 1991; Gmitter, 1995).

2.2.2. Importância econômica

O gênero *Citrus* engloba frutíferas de grande importância mundial, destacando-se, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais (Gmitter, 1995). As espécies de maior interesse sócio-econômico são principalmente as laranjas-doce e as tangerinas, seguidas dos limões e pomelos. Além da utilidade de seus frutos na alimentação humana, tanto *in natura* como industrializados, as plantas cítricas também são fontes de óleos essenciais e pectina, além disso, se extraem óleos das folhas para cosméticos e o bagaço é usado na preparação de ração (Koller, 1994).

O Brasil deteve em 2007 uma posição de destaque na citricultura mundial, produzindo um número expressivo de mais de 18 milhões toneladas de frutos se destacando, portanto, como o maior produtor do mundo seguido pelos países Estados Unidos, México, Índia e China (FAOSTAT, 2007). No Brasil, as regiões de maior produção estão nos estados de São Paulo, com um total de 79% de toda produção de laranja no país, Minas Gerais, Bahia, Sergipe e Rio Grande do Sul (Zanon *et al.*, 2008).

Visando melhorar as variedades com características favoráveis ao cultivo, muito tem se investido nos últimos anos com programas de melhoramento genético nos citros (Calixto *et al.*, 2004).

2.2.3. Taxonomia do gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* apresenta uma taxonomia bastante complexa em função de vários fatores, destacando-se, principalmente, sua biologia reprodutiva. A presença da

poliembrião nucelar, que é a formação de vários embriões a partir da nucela (tecido materno diplóide), permite a estabilidade genética com formação de híbridos apomíticos. Outros fatores como fracas barreiras reprodutivas entre o gênero *Citrus* e gêneros próximos, que permitem o estabelecimento de híbridos interespecíficos férteis, além de uma longa história de cultivo, podem contribuir de forma significativa para a dificuldade na delimitação das espécies dentro do gênero (Barret e Rhodes, 1976).

Os dois principais sistemas de classificação taxonômica utilizados são bastante controversos quanto ao número de espécies reconhecidas. O primeiro sistema, proposto por Walter T. Swingle (1943) indicou apenas 16 espécies distribuídas em dois subgêneros: *Papeda*, constituído por seis espécies primitivas e sem valor comercial, e *Citrus*, com 10 espécies todas de importância econômica. Posteriormente, o taxonomista Tyôzaburô Tanaka (1954) propôs o segundo sistema, o qual ampliou o número de espécies para 162, e estas foram divididas em dois subgêneros, *Archicitrus* e *Metacitrus* (revisados por Swingle e Reece, 1967). A principal diferença entre esses dois sistemas está relacionada com a classificação das tangerinas: o primeiro sistema as classificou como *C. reticulata*, enquanto que o segundo as separou em 36 espécies independentes.

A falta de um consenso quanto ao número de espécies observada entre esses dois sistemas reflete a alta complexidade do gênero. Vários outros autores se empenharam na tentativa de esclarecer esse problema. Barret e Rhodes, (1976), por exemplo, baseando-se em análises filogenéticas de dados bioquímicos e morfológicos de 146 acessos, concluíram a presença de apenas três espécies verdadeiras ou puras no gênero *Citrus*, sendo as demais híbridas. Asíns *et al.* (1998), sugeriram 198 cultivares de *Citrus* a partir de estudos isoenzimáticos, porém, com dois grupos principais, um formado pelas laranjas e tangerinas e outro que inclui as limas, limões, a cidra e o pomelo.

No geral, esses estudos, juntamente com análises citogenéticas, propõem apenas *C. medica* (cidra), *C. grandis* (toranja) e quatro tangerinas (*C. deliciosa*, *C. reticulata*, *C. reshni* e *C. sunki*) como espécies biológicas ou puras (Moore, 2001; Carvalho *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2007a,b). As outras espécies, tais como as laranjas e limões, são derivadas de cruzamentos, não só dessas espécies puras, mas também de cruzamentos entre essas e os híbridos formados (Moore, 2001). Muitos outros estudos têm sido realizados com o objetivo de compreender essa problemática e contribuir para os estudos taxonômicos e evolutivos do grupo (Federici *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000).

2.2.4. Citogenética do gênero *Citrus*

Strasburguer (1907) e Osawa (1912) foram os responsáveis pelos primeiros estudos cromossômicos do gênero *Citrus*, os quais sugeriram o número cromossômico haplóide $n = 8$ (citado por Krug, 1943). Frost (1925) reportou pela primeira vez $n = 9$ como o número cromossômico haplóide em meiócitos de laranja doce e pomelo. Essa divergência é explicada pelas limitações das técnicas da época, bem como pelas características cromossômicas do gênero. Mais recentemente, Guerra *et al.* (1997) analisaram 51 acessos de 20 espécies de citros, incluindo *Poncirus trifoliata* e sete híbridos interespecíficos. Estes autores encontraram somente $2n = 18$, sem detectar variação cromossômica numérica, apenas diferenças em relação ao número e posição das constrições secundárias entre os acessos analisados.

As espécies de *Citrus* são todas diplóides, apresentando número cromossômico constante $2n = 18$, exceto o limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tan., $2n = 3x = 27$) e outros poliplóides que ocorrem ocasionalmente no gênero (Araújo e Roque, 2005). A poliploidia pode ocorrer naturalmente devido, principalmente, à formação de gametas não-reduzidos, duplicação do complemento cromossômico em células somáticas ou ainda pela indução de cruzamentos entre diplóides divergentes e tetraplóides (Lee, 1988). A forma triplóide, que é obtida a partir de fusão de um gameta diplóide com um gameta haplóide, bem como por outras técnicas, se configura como a forma de maior interesse no melhoramento dos *Citrus*, pois permite a formação de frutos sem sementes (Krug, 1943; Latado *et al.*, 2007).

2.2.5. Bandeamento Cromossômico e FISH em *Citrus*

O fato dos cromossomos de *Citrus* serem pequenos (1 a 3,5 μm) e morfologicamente similares (Guerra *et al.*, 1997) dificultou as análises com coloração convencional. Com a introdução das técnicas de bandeamento, as análises cromossômicas tornaram-se mais confiáveis e permitiram um melhor detalhamento cariotípico das espécies dentro do gênero.

Análises baseadas em bandeamento C no gênero *Citrus*, por exemplo, demonstraram a presença de numerosos blocos heterocromáticos, principalmente nas regiões terminais e proximais dos cromossomos (Guerra, 1985). Como esta técnica pode

afetar a morfologia do cromossomo, bem como estar sujeita a variações no padrão de bandas entre metáfases de uma mesma lâmina, os estudos citogenéticos passaram a incorporar o bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI, o qual, além de ser mais prático e conservar a morfologia cromossômica, revelou um padrão que frequentemente se correlaciona às bandas C e se mostrou altamente reproduzível (Guerra, 1993).

O bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI permitiu distinguir os cromossomos quanto ao número e posições de blocos heterocromáticos, estabelecendo os seguintes tipos cromossômicos: A (duas bandas terminais e uma proximal), B (bandas proximal e terminal), C (duas bandas terminais), D (uma banda terminal), E (uma banda intersticial), F (sem bandas), F_L (cromossomo F grande), G (bandas subterminal e uma terminal) e H (uma banda proximal). Os tipos cromossômicos D, F e F_L são os mais comuns, enquanto os tipos A, B, C, E, G e H são mais raros, não sendo encontrados em todos os acessos e, quando presentes, estão em pequeno número (Cornélio *et al.*, 2003; Yamamoto e Tominaga, 2003; Carvalho *et al.*, 2005). Miranda *et al.* (1997a), analisaram espécies dos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* quanto ao padrão de distribuição das bandas CMA⁺ e detectaram que os tipos cromossômicos citados acima não eram exclusivos do gênero *Citrus*, sendo, portanto, comuns entre os dois primeiros gêneros citados e mais divergente nos acessos de *Fortunella*. Esse tipo de análise permitiu demonstrar o alto polimorfismo cromossômico presente nas espécies cítricas, descrever citogeneticamente diversos acessos e demonstrar a origem híbrida da maioria dos materiais devido aos heteromorfismos observados entre os homólogos (Carvalho *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2007b).

A FISH com as sondas DNAr 5S e 45S aliadas ao bandeamento CMA/DAPI adicionou mais oito tipos cromossômicos e possibilitou a diferenciação de vários acessos dentro do gênero *Citrus*, bem como de gêneros próximos, contribuindo, dessa forma, para a compreensão das relações evolutivas (Miranda *et al.*, 1997b; Roose *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2005, Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007). Em 1996, Matsuyama e colaboradores estudaram *C. sinensis* com sondas de DNAr 26S e DNA telomérico mostrando que os sítios de DNAr nessa espécie é co-localizado com blocos de DNA repetitivo que compõem as bandas CMA⁺. Posteriormente, Pedrosa *et al.* (2000) demonstraram que os sítios de DNAr 5S e 45S em diferentes variedades de *C. sinensis* são constantes, bem como as bandas CMA⁺.

Análises de distribuição dos sítios 5S e 45S, aliadas à coloração CMA/DAPI, reforçaram a condição homomórfica das espécies consideradas verdadeiras e confirmaram a origem híbrida para aquelas espécies que apresentaram uma condição

heteromórfica sendo, portanto, consideradas híbridos intra- ou intergenéricos (Carvalho *et al.*, 2005, Yamamoto e Tominaga, 2003; Moraes *et al.*, 2007a,b). Moraes *et al.* (2007b) analisaram seis acessos de pomelos 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 localização dos sítios de DNAr 5S e 45S (Carvalho *et al.*, 2005). As análises mostraram que a limas e limões são heterozigóticos para todos os sítios de DNAr e que a cidra, *C. medica*, é provavelmente um dos parentais dos outros acessos analisados.

Uma limitação da técnica de bandeamento CMA/DAPI, mesmo quando aliada à FISH com sondas de DNAr 5S e 45S, é a impossibilidade da identificação de todos os pares cromossômicos dentro do gênero *Citrus*. Para contornar esse problema, os avanços na biologia molecular com a introdução de vetores com capacidade de clonar grandes insertos, principalmente os BACs, foram fundamentais. Moraes *et al.* (2008) conseguiram identificar todos os pares cromossômicos de *P. trifoliata* pelo uso de uma biblioteca BAC. Esses marcadores serão fontes valiosas para identificação cromossômica de outras espécies de citros, bem como possibilitarão inferir homeologias e contribuir para a elucidação da evolução cromossômica nesse grupo.

3. Referências Bibliográficas

3. Referências Bibliográficas

Aguiar Perecin MLR C-banding in maize. I. Band patterns. *Caryologia* 38: 23-30 (1985).

Araujo EF, Roque N. In: Mattos Júnior D, Negri JD, Pio RM, Pompeu Júnior J. (Org.). *Citros*. Campinas: IAC, p. 125-145 (2005)

Asíns MJ, Mestre PF, Herrero R, Navarro L, and Carbonell EA: Molecular markers: a continuously growing biotechnology area to help *Citrus* improvement. *Fruits* 53: 293- 302 (1998).

Barret HC, Rhodes AM A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany* 1: 105-136 (1976).

Brasileiro-Vidal AC, Santos-Serejo JA, Soares Filho WS, Guerra M: A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetic* 129: 273-279 (2007).

Buitendijk JH, Ramanna MS Giemsa. C-banded karyotypes of eight species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany* 78: 449-457 (1996).

Calixto MC, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ, and Vieira MLC: Somatic hybridization between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandes* (L.) Osbeck. *Pesq. Agropec. Brasília*, v. 39, n. 7, p. 721-724. (2004).

Carvalho R, Guerra M: Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas* 136: 159-168 (2002).

Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC and Guerra M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet. Genome Res.* 109: 276-282 (2005).

Cheng Z, Presting GG, Buell CR, Wing A, Jiang J: 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 (2001).

Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M: Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst. Evol.* 240:149-161 (2003).

Darlington CD, La Cour LF The handling of chromosomes. 6° ed. Plymouth: Clarke, Doble & Brendon Ltd. 1976. 201p (1976).

De Jong JH, Fransz P, Zabel P: Hight resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trends in Plant Science* 4: 258-262 (1999).

Dong F, Song J, Naess SK et al: development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet* 101: 1001-1007 (2000).

FAOSTAT, 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/DesktopDefault.aspx>. Acesso 25 de maio de 2010.

Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML: Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 812-822 (1998).

Friebe B, Endo TR, Gill BS Chromosome-banding methods. In: Fukui K, Nakayama S. *Plant Chromosomes – Laboratory Methods*. pp.123-154. CRC Press, Tokyo (1996).

Frost HB: The chromosomes of *Citrus*. *J Wash Acad Sci* 15: 1-2 (1925).

Gall J, Pardue ML: Formation and detection of RNA-DNAhybrid molecules in *Drosophila*. *Chromosome Res*, v. 6, p. 335-336 (1969).

- Gmitter FG Jr: Origin, evolution, and breeding of the grapefruit. *Plant Breed Rev* 13:345-363 (1995).
- Guerra M. Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin patterns. *Caryologia* 38: 335-346 (1985).
- Guerra M: Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, Edinburgh, v. 71, p. 234-241 (1993).
- Guerra M, Pedrosa A, Barros e Silva AE, Cornélio MTM, Santos K and Soares Filho WS: Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. *Brazilian Journal of Genetics* 3: 489-496 (1997).
- Guerra M, Santos K G B, Silva A E B and Ehrendorfer F. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae – A case of parallel chromosomal evolution. *Amer. J. Bot.* 87: 735-747 (2000).
- Guerra M: Patterns of heterochromatin distribution in plan chromosomes. *Genet Mol bio* 23; 1029-1041 (2000).
- Guerra M: Hibridização *in situ*: princípios básicos In: FISH – Conceitos e aplicações na citogenética. p. 33–60. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto (2004).
- Hass I, Sbalqueiro IJ, and Muller S: Chromosomal phylogeny of four Akodontini species (Rodentia, Cricetidae) from southern Brasil established by Zoo-FISH using *Mus musculus* (Muridae) painting probes. *Chromosome Research* 16: 75-88 (2008).
- Hasterok R, Marasek A, Donnison IS, Armstead I, Thomas A, King IP, Wolny E, Idziak D, Draper J, Jenkins G: Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial

- chromosome landing with fluorescence *in situ* hybridization. *Genetics* 173:349-362 (2006).
- Hizume M, Ohgiku A and Tanaka A: Chromosome banding in the genus *Pinus* II. Interspecific variation of fluorescent banding patterns in *P. densiflora* and *P. thunbergii*. *Bot Mag Tokyo* 102:25-36 (1989).
- Howell EC, Barker GC, Jones GH, Kearsey MJ, King GJ, Kop EP, Ryder CD, Teakle GR, Vicente JG, Armstrong SJ: Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. *Genetics* **161**:1225-1234 (2002).
- Iovene M, Wielgus SM, Simon PW, Buell CR and Jiang J: Chromatin structure and physical mapping of chromosome 6 of Potato and comparative analyses with Tomato. *Genetics* 180: 1307-1317 (2008).
- Jackson SA, Dong F, Jiang J: Digital mapping of bacterial artificial chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *The Plant Journal* 17: 581-587 (1999).
- Jackson SA, Cheng Z, Wang ML, Goodman HM, Jiang J: Comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping of a 431-Kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansions of the *Brassica rapa* genome. *Genetics* 156: 833-838 (2000).
- Jacobs MD, Gardner RC, Murray BG: Cytological characterization of heterochromatin and rDNA in *Pinus radiata* and *P. taeda*. *Plant Systematics and Evolution* 223: 71-79 (2000).
- Jiang J, Gill BS, Wangt GL, Ronald PC, Ward DC: Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosome. *PNAS* 92:4487-4491 (1995).
- Jiang J, Gill BS: Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49: 1057-1068 (2006).

Kim JS, Childs KL, Islam-Faridi MN, Menz MA, Klein *et al.* RR: Integrated karyotyping of sorghum by *in situ* hybridization of landed BACs. *Genome* **45**: 402–412 (2002).

Krug, CA: Chromosome number in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. *Bot Gaz* 104: 602-611(1943).

Koller OC. *Citricultura*: laranja, limão e tangerina. Porto Alegre 1º Editora Rígel, 446p. (1994).

Latado RR, Cristofani-Yaly M, Carvalho CR, Machado MA: Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. *Pesq. Agropec. Bras.* Vol. 42 no. 10 (2007).

Lee LS: *Citrus* polyploidy – origins and potential for cultivar improvement. *Aust J Agric Res* 39: 735- 747 (1988).

Mandáková T and Lysak MA: Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in $x=7$ Crucifer Species (Brassicaceae). *The Plant Cell* 20: 2559- 2570 (2008).

Matsuyama T, Akihama T, Ito Y, Omura M, Fukui K: Characterization of heterochromatic regions in „Trovita“ orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by the fluorescent staining and FISH methods. *Genome* 39: 941-945 (1996).

Melo NF and Guerra M: Variability of the 5S and 45S sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome number. *Ann Bot* 92:309-316 (2003).

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

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

- Moraes A P, Lemos R R, Brasileiro-vidal A C, Santos Soares Filho W and Guerra M
Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid a accessions of
mandarin. *Cytogenet Genome Res.* 119: 275-281. (2007a)
- Moraes AP, Soares Filho WS, and Guerra M. karyotype diversity and the origin of
grapefruit. *Chromosome Res.* 15: 115-121 (2007b).
- Moraes AP, Mirkov TE, Guerra M. Mapping the chromosome of *Poncirus trifoliata*
Raf. By BAC-FISH. *Cytogenet Genome Res.* 121:227-281 (2008).
- Moreira CS, Moreira, S: História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUES, O.;Viégas
F, Pompeu J R J (eds.). *Citricultura Brasileira*. Fundação Cargill. Campinas. 1-
18 (1991).
- Moore GA Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular
markers. *Trends Genet.* 17: 536-540 (2001).
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E: *Citrus*
phylogeny and genetic origin f important species as investigated by molecular
markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1155-1166 (2000).
- Nicolosi E. Origin and taxonomy. In: Khan, I. A. (ed) *Citrus, Genetics and
Biotechnology*. CAB international, Wallingfort, pp 19-43 (2007).
- Ortoloni FA, Mataqueiro MF, Moro JR: Caracterização citogenética em *Schumbergera
truncata* (Haworth) Moran e *Schumbergera x buckleyi* (T. Moore) Tjaden
(Cactaceae). *Acta bot. Bras.* 21 (2): 361- 367 (2007).
- Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M: Cytological heterozygosity and the hybrid origin of
sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Theor. Appl. Genet.* 100: 361-367
(2000).
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A: Chromosomal map of the
model legume *Lotus japonicas*. *Genetics*, v. 161, p. 1661-1672 (2002).

- Pedrosa-Harand A, Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Shweizer D, Guerra M
extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean
(*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 924-
933 (2006).
- Richard F, Lombard M, and Dutrillaux B: ZOO-FISH suggests a complete homology
between Human and Capuchin Monkey (Platyrrhini) Euchromatin. *Genomics*
36: 417-423 (1996).
- Roose ML: Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in *Citrus*
breeding and systematic. In: *Proceedings of the Sixth International Citrus*
Congress, Telaviv. Weikersheim: Margarf Scientific Books, p. 155-165
(1998).
- Röser M: Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). *Plant*
Systematics and Evolution 189: 83-122 (1994).
- Röser M: Trends in the karyo-evolution of palms. In: Brandham PE, Bennett MD (eds.).
Kew Chromosome Conference IV, pp. 249-265. Royal Botanic Gardens, Kew
(1995).
- Schwarzacher T, Ambros P and Schweizer D. Application of Giemsa banding to Orchid
karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 134: 293-297 (1980).
- Schweizer D: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI.
Chromosoma 58: 307-324 (1976).
- Schweizer D, and Ambros PF: Chromosome banding in: Gosden JR (ed) *Methods in*
molecular biology, vol. 29, Chromosome analysis protocols, Humana Press,
Totowa, pp 97-113 (1994).
- Scora RW: IX. On the history and origin of citrus. *Buly Botanical Club* 102: 369-375
(1975).

- Seal AG, Bennett MD Preferential C-Band of wheat or rye chromosomes. Theor Appl Genet 63: 227-233 (1982).
- Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y: Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest number in rodents. Cytogenet Cell Genet., v. 81, p. 46-50 (1998a).
- Song J, Dong F, Jiang J: Construction of a bacterial artificial chromosome library for potato molecular cytogenetics research. Genome 43: 199–204 (2000).
- Souza LGR, Crosa O, Winge H, Guerra M: The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): A populational and cytomolecular analysis. Genetics and Molecular Biology, 32, 1, 111-116 (2009).
- Sumner AT. Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing company, Berlin, 287 pp (2003).
- Swingle WT: the botany of *Citrus* and its relatives in the orange subfamily. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds). *The Citrus Industry*. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, pp. 128-474 (1943).
- Swingle WT, Reece PC: The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Weber HJ, Batchelor LD (eds) *The Citrus industry*. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 190-430 (1967).
- Tanaka T. *Species Problem in Citrus*. Japanese Society of the Promotions of Science. (1954).
- Tang X, Szinay D, Lang C et al: Cross-species bacterial artificial chromosome-fluorescence *in situ* hybridization painting of the tomato and potato chromosome 6 reveals undescribed chromosomal rearrangements. Genetics 180:1319-1328 (2008).

- Terol J, Naranjo MA, Ollitrault P, Talon M: Development of genomic resources for *Citrus Clementina*: Characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. *BMC Genomics* 9:423 (2008).
- Yamamoto M, and Tominaga S: High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. *Euphytica* 129: 267-274 (2003).
- Yang F, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA: Comparative chromosome map of the laboratory mouse and Chinese hamster defined by reciprocal chromosome painting. *Chromosome Res.* v. 8, p. 219-227 (2000).
- Wimmer R, Krish S, Rappold GA, Schempp W: Direct evidence for the *Homo-Pan* clade. *Chromosome Res.* v. 10, p. 55-61(2002).
- Vaio M, Speranza P, Valls J F, Guerra M and Mazzella C: Localization of the 5S and 45S rDNA Sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria Group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Ann Bot* 96:191-200 (2005).
- Volleth M, Heller KG, Pfeiffer RA, and Hameister H: A comparative ZOO-FISH in bats elucidates the phylogenetic relationships between Megachiroptera and five microchiropteran families. *Chromosome Research* 10: 477-497 (2002).
- Vosa CG: Chromosome banding in plants. In: Sharma AK, Sharma, (eds). *Chromosome and Cell Genetics*, Gordon and Breach Science Publishe London, p. 79-104 (1985).
- Zhang P, Li W, Fellers J, Friebe B, Gill BS: BAC-FISH in wheat indentifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma* 112: 288- 299 (2004).
- Zanon NB, Almeida LFR, Daniel H, Fernandes JC, Tarsitano MA: A análise econômica da produção de laranja *in natura* na Região Noroeste do estado de São Paulo. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. Vitória/ES (2008).

**CONSERVAÇÃO DE SINTENIA ENTRE OS GÊNEROS *Citrus* L. E *Poncirus* RAF.
DEMONSTRADA PELO MAPEAMENTO CITOGENÉTICO COMPARATIVO DE
BACs**

Sandra Mendes da Silva¹, Ana Paula Moraes^{1,2} e Andrea Pedrosa-Harand¹

¹ Laboratório de Citogenética Vegetal, Depto. de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50670-420, Brasil; ²Endereço atual: Laboratório de Biosistemática e Evolução de Plantas, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 13083-970, Brasil.

Autor para correspondência:

Andrea Pedrosa-Harand

E-mail: andrea.pedrosaharand@pesquisador.cnpq.br

Tel. + 55 81 2126 8846

Fax + 55 81 2126 8348

Resumo

O gênero *Citrus* é conhecido por sua grande importância econômica e complexa taxonomia. Apenas seis espécies de *Citrus* são consideradas verdadeiras, dentre elas *C. medica* L., a cidra. Estudos anteriores baseados no bandeamento CMA/DAPI demonstraram que a cidra apresenta cariótipo homomórfico, formado por quatro tipos cromossômicos distintos. No presente trabalho, com base no padrão de blocos CMA⁺ e na hibridização de 25 BACs oriundos de uma biblioteca genômica de *P. trifoliata* (L.) Raf., espécie proximamente relacionada ao gênero *Citrus*, foi possível identificar individualmente cada par cromossômico e, desta forma, construir um mapa citogenético comparativo para *C. medica*. Os dados obtidos demonstraram um alto grau de conservação de sequências entre estes gêneros, permitindo a hibridização de BACs heterólogos e a determinação das homeologias cromossômicas. Além disso, foi possível visualizar alterações na posição de alguns BACs em relação às bandas CMA⁺. Uma vez que nenhuma quebra de sintenia foi detectada entre as espécies, eventos de amplificação/desamplificação de sequências de DNA repetitivo parecem ser os principais responsáveis pela evolução cromossômica desde a separação desses dois gêneros.

Palavras-chave: BAC, FISH, *Citrus*, *Poncirus*, mapeamento, homeologia cromossômica

Introdução

O gênero *Citrus* se destaca mundialmente por apresentar muitas espécies com grande importância econômica, sendo as laranjas [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], os limões [*Citrus limon* (L.) Burm. F.], as tangerinas [*C. deliciosa* Ten. e *C. reticulata* Blanco] (Webber 1967; Moreira e Moreira 1991; Spiegel-Roy e Goldschmidt 1996) e os pomelos (*Citrus paradisi* Macfad) as espécies de maior destaque. Seus representantes também são reconhecidos pelas dificuldades de delimitação taxonômica ocasionadas principalmente pelas fracas barreiras reprodutivas e pela poliembrião nuclear, associadas à longa história de cultivo. Isso se reflete nos dois principais sistemas de classificação, os quais diferem amplamente quanto ao número de espécies reconhecidas (revisados por Swingle e Reece 1967).

Os estudos citogenéticos realizados em *Citrus* e gêneros relacionados têm se mostrado bastante informativos para a caracterização das espécies, contribuindo para elucidar suas relações taxonômicas (Guerra *et al.* 2000; Cornélio *et al.* 2003; Carvalho *et al.* 2005; Brasileiro-Vidal *et al.* 2007; Moraes *et al.* 2007a, b). Isso porque, embora o grupo apresente caracteristicamente uma alta estabilidade no número ($2n = 2x = 18$) e morfologia dos cromossomos (predominantemente metacêntricos com 1– 3,5 μm) (Guerra *et al.* 1997), uma grande variabilidade quanto à quantidade e localização de blocos heterocromáticos tem sido observada por bandeamento cromossômico entre as espécies de *Citrus* e gêneros relacionados (Guerra *et al.* 1997, 2000; Yamamoto e Tominaga, 2003; Moraes *et al.* 2007a,b). Nesse grupo, os blocos heterocromáticos são todos ricos em CG, apresentando-se fortemente corados com o fluorocromo cromomicina A₃ (CMA) e geralmente negativos com o corante DAPI, que identifica bandas ricas em AT. A coloração CMA/DAPI permitiu agrupar os cromossomos em oito tipos: A (duas bandas terminais e uma proximal), B (bandas proximal e terminal), C (duas bandas terminais), D (uma banda terminal), E (uma banda intersticial), F (sem bandas), F_L (cromossomo F grande) e G (bandas terminal e subterminal no braço longo) (Carvalho *et al.* 2005). Esses tipos cromossômicos foram bastante úteis, por exemplo, para detectar heteromorfismo nos pares cromossômicos da maioria das espécies,

confirmando a origem híbrida das mesmas (Moore 2001, Guerra 2009). Por outro lado, Moraes *et al.* (2007a), utilizando bandeamento CMA/DAPI e FISH com DNAr 5S e 45S, sugeriram a inclusão de outras três espécies de tangerinas dentro do grupo das espécies consideradas biologicamente verdadeiras. Isso porque, além da cidra (*Citrus medica* L.) e toranja (*C. maxima* Burm), dois grupos de tangerinas [*C. reshni* Hort. ex Tan. e *C. sunki* (Hayata) Hort. ex Tan.; *C. deliciosa* Ten. e *C. reticulata* Blanco] apresentam cariótipos homomórficos, sendo esse um importante indício de que essas são espécies verdadeiras ou puras que, através de cruzamentos entre elas e entre espécies de gêneros próximos, originaram as demais, consideradas híbridas (Guerra 1993; Carvalho *et al.* 2005, Yamamoto e Tominaga 2003; Moraes *et al.* 2007a). Contudo, apesar de todas essas abordagens, não foi possível reconhecer todos os pares cromossômicos nas diferentes espécies de *Citrus*.

A introdução da técnica de FISH com sondas de BAC (cromossomos artificiais de bactérias) tem ampliado o número de marcadores citogenéticos utilizados para a identificação dos cromossomos em várias culturas de plantas como batata (Dong *et al.* 2000), arroz (Cheng *et al.* 2001), sorgo (Kim *et al.* 2005) e algodão (Wang *et al.* 2008), bem como tem possibilitado comparar diferentes genomas em um enfoque evolutivo (Jiang e Gill 2006; Mandáková e Lysak, 2008). Recentemente, Moraes *et al.* (2008) construíram um mapa citogenético para *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. ($2n = 2x = 18, 4B + 8D + 4F + 2F_L$), uma espécie próxima ao gênero *Citrus*. Os autores mapearam 13 BACs de uma biblioteca genômica de *P. trifoliata* que, juntamente com a localização do DNAr e a coloração CMA/DAPI, permitiram identificar os nove pares cromossômicos e mapear o gene de resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV).

No presente trabalho, utilizamos os BACs mapeados de *P. trifoliata* para a construção do primeiro mapa citogenético de uma espécie do gênero *Citrus*, a espécie verdadeira *C. medica* ($2n=2x=18, 2B+8D+6F+2F_L$). Desta forma, foi possível também reconhecer as homeologias entre os cromossomos dessas duas espécies e demonstrar a conservação de sintenia entre os dois genomas, apesar das diferenças na distribuição dos blocos heterocromáticos entre esses cariótipos.

Materiais e Métodos

Material Vegetal

Sementes de *Citrus medica* var. Etrog foram obtidas do Banco de Germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Preparação cromossômica e coloração CMA/DAPI

Pontas de raízes obtidas da germinação das sementes foram utilizadas para preparações citológicas. As raízes foram pré-tratadas em 8-hidroxiqiloneína (0,002 M) por 20 h a 10 °C, fixadas em etanol absoluto : ácido acético glacial (3:1, v/v) por 2 h e estocadas a -20 °C. A preparação e a seleção das lâminas, bem como a coloração CMA/DAPI foram realizadas segundo Moraes *et al.* (2007b). As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Leica com câmera Cohu CCD usando o software QFISH (Leica). As lâminas foram descoradas novamente e estocadas a -20 °C.

Hibridização in situ fluorescente

25 BACs selecionados da biblioteca genômica de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Yang *et al.* 2001) e previamente mapeados na espécie (Moraes *et al.* 2008 e A. P. Moraes, dados não publicados) e o clone D2 de *Lotus japonicus*, para a localização do DNAr 5S (Pedrosa *et al.* 2002), foram utilizados como sondas. Todos foram marcados por *nick translation* (Invitrogen e Roche) usando Cy3-dUTP (GE). O procedimento e as condições da FISH seguiram basicamente o descrito por Jiang *et al.* (1995) com pequenas modificações e estringência de 73%, conforme descrito por Silva *et al.* (em preparação). Quando necessário foi utilizado DNA bloqueador (fração *Cot-1* do DNA genômico de *P. trifoliata*) preparado de acordo com Zwick *et al.* (1997). Todas as preparações foram contra coradas com DAPI (2 µg/ml) em Vectashield (Vetor). As

imagens foram capturadas como descrito anteriormente e nos casos de re-hibridização da mesma lâminas, as mesmas foram decoloradas como descrito acima.

Medições cromossômicas

O tamanho cromossômico relativo e a razão entre braços foram calculados baseados em cinco metáfases mitóticas usando ferramenta do Adobe Photoshop, programa também usado para o processamento final das imagens. O tamanho dos braços foi medido a partir das imagens sobrepostas CMA e DAPI, enquanto o tamanho dos blocos CMA⁺ foram baseados apenas na imagem do CMA. Para estabelecer a posição relativa de cada clone BAC ao longo dos cromossomos, foram selecionados 15 sinais de hibridização e as medições do telômero mais distante ao sinal e deste ao telômero mais próximo foram realizadas com o software Image Tool 3,0. Os cromossomos foram numerados de acordo com a nomenclatura estabelecida para *P. trifoliata* por Silva *et al.* (em preparação).

Resultados

Sondas preparadas a partir de 25 BACs, além da sequência de DNAr 5S, foram hibridizadas em cromossomos metafásicos de cidra, identificando oito dos nove pares cromossômicos (Tabela 1). Os resultados da coloração CMA/DAPI mostrou ser o genoma de cidra bastante homomórfico, coincidindo com dados descritos anteriormente por Carvalho *et al.* (2005) e Yamamoto *et al.* (2007). Além disso, também foi observada a presença de um par de D com a banda CMA⁺ subterminal (Carvalho *et al.*, 2005; Guerra, 2009) (Fig. 1e).

Sete dos 25 BACs hibridizados (06I11, 02G12, 25H02, 36A15, 06C13, 19F02 e 20A12) apresentaram sinais dispersos em todo complemento cromossômico, apesar do uso do DNA bloqueador, e outros quatro BACs (31F02, 91C01, 95B01 e 95D01) não

apresentaram sinal em cidra. Quatorze BACs apresentaram sinal único e puderam ser mapeados (Tabela 2). Desses, quatro marcaram o único par cromossômico tipo B (cromossomo 3), sendo dois praticamente co-localizados no braço longo na região adjacentes à banda CMA⁺ (27P09 e 28A07; Fig.1 b) e dois co-localizados na região terminal do braço curto (14A12 e 32D14; Fig. 1d). Seis BACs e a sequência de DNAr 5S identificaram os quatro pares distintos de cromossomos tipo D da espécie, o que foi confirmado pela hibridização de todos os BACs consecutivamente em uma mesma lâmina (Fig. 1f). O BAC 21L13 apresentou marcação co-localizada com a região da banda CMA⁺ no braço longo do cromossomo 2. Já os BACs 02C12 e 20C13 mostraram marcação no mesmo par cromossômico (cr. 4), sendo o primeiro na região intersticial do braço curto e o segundo co-localizado à banda CMA⁺ do braço oposto. Um terceiro par cromossômico do tipo D, denominado cromossomo 5, foi identificado pela presença do sítio de DNAr 5S, intersticial no braço curto. Os BACs 24E07, 55B01 e 59C23 fazem parte da região do gene de resistência ao CTV, característica presente em *P. trifoliata*. Esses BACs foram co-localizados no braço longo do cromossomo 9 na região intesticial (Fig. 1h).

Dois dos três pares de F em cidra foram identificados com os seguintes marcadores: 20C12 e 28A05, co-localizados na região terminal do cromossomo 6 (Fig. 2b) e o BAC 01B09 na região terminal do cromossomo 8 (Fig. 2d). Já o cromossomo tipo FL, além de ser identificado por sua morfologia, por ser o maior do complemento cromossômico, também pode ser identificado pelo BAC 24C13, que marcou a região subterminal do braço curto (Fig. 2f). Para um par cromossômico do tipo F (cr. 7) nenhum marcador estava disponível.

Discussão

No presente trabalho, a utilização da FISH de BACs permitiu a identificação de sete pares cromossômicos em cidra. Quando associada ao uso do DNAr 5S e à dupla coloração CMA/DAPI, os nove pares cromossômicos da espécie podem ser identificados, confirmando-a como uma espécie homomórfica (Carvalho *et al.* 2005; Yamamoto *et al.* 2007). A FISH com BACs tem se estabelecido como uma ferramenta bastante útil na identificação cromossômica, bem como em análises comparativas, e tem sido largamente utilizada em estudos citogenéticos de várias espécies de plantas (Jiang

et al. 1995; Zhang *et al.* 2004; Dong *et al.* 2000; Cheng *et al.* 2001; Islam- Faridi *et al.* 2002; Kim *et al.* 2005; Moraes *et al.* 2008; Iovene *et al.* 2008; Pedrosa *et al.* 2009).

Dos 25 BACs usados neste trabalho, sete (02G12, 06C13, 06I11, 19F02, 20A12, 25H02 e 36A15) apresentaram padrão de hibridização disperso em cidra ao contrário do observado em *Poncirus*, na qual apresentaram sinal único em cromossomos tipos B (06I11, 25H02), D (06C13, 20A12) e F (02G12, 19F02, 36A15) (Moraes *et al.* 2008 e A. P. Moraes dados não publicados). Isso sugere que esses BACs contêm sequências de DNA em seus insertos que foram amplificadas em *Citrus* em relação a *Poncirus*. O genoma de todas as plantas apresenta, além de sequências repetitivas em tandem, uma grande fração de DNA repetitivo disperso em todo o complemento. Essas duas frações podem chegar a corresponder, em alguns casos, a 90% do genoma (Vershinin *et al.* 2001; Jiang *et al.* 2003; Chang *et al.* 2008). Em comparação com a taxa de evolução de sequências únicas e pouco repetidas (Schmidt 2002), vários estudos têm demonstrado que as sequências repetitivas evoluem mais rapidamente contribuindo, dessa forma, para a evolução dos genomas (Li *et al.* 1995; Schmidt e Heslop-Harrison 1994, Sharma e Raina, 2005). Sequências repetidas podem estar presentes em várias espécies de um mesmo grupo taxonômico ou serem específicas para uma determinada espécie, sendo em alguns casos cromossomo-específica (Wang *et al.* 1995; Ananiev *et al.* 2002, Hemleben *et al.* 2007).

Dos BACs hibridizados em cromossomos tipo D em cidra, três (24E07, 55B01 e 59C23) fazem parte da região do gene de resistência ao CTV (vírus da tristeza dos citros) correspondentes a um *contig* de 1,2 Mb de *Poncirus trifoliata* (Yang *et al.* 2001). Desses, apenas o BAC 55B01 está dentro de uma região de 282 kb correspondente à região onde o gene foi finamente mapeado (Yang *et al.* 2003). O CTV é um dos principais patógenos de citros, responsável por grandes perdas econômicas da indústria mundial (Garnsey & Lee 1998). Isso porque as espécies de *Citrus* não apresentam resistência total ao CTV, mas sim apenas alguns níveis de resistência parcial para algumas característica da doença, como ocorre em *C. maxima* (Burm) Merrill (Garnsey *et al.* 1997), ou nenhuma resistência, como na maioria das espécies de *Citrus* (Gottwald *et al.* 1996). Em *P. trifoliata*, essa resistência é controlada por um único gene dominante (CTV) (Gmitter *et al.* 1996) e essa região tem sido extensamente estudada (Yang *et al.* 2001, 2003). A conservação de ligação desses três BACs corrobora a idéia de que a região esteja estruturalmente conservada e que a falta de resistência total em *Citrus* se

deve a variações pontuais causadas por possíveis recombinações dentro dessa região (Rai 2006).

Dentre os 14 BACs mapeados em ambas as espécies, apenas quatro (02C12, 20C13, 01B09 e 24C13), localizados nos pares cromossômicos 4 (tipo D), 8 (F) e 1 (FL) se mostraram conservados quanto à posição e ao tipo cromossômico.

Embora o cromossomo 3 de *P. trifoliata* e *C. medica* sejam do tipo B, a localização dos BACs 14A12, 27P09, 28A07 e 32D14 em braços distintos indica a ocorrência de alterações cromossômicas entre esses gêneros no processo de diferenciação cariotípica. Mais de um evento são necessários para explicar tal diferença, podendo ter sido causada por inversões pericêntricas, ampliações/desamplificações de sequências repetitivas ou uma combinação dessas. Na primeira hipótese, um mínimo de duas inversões pericêntricas, uma abrangendo o centrômero e o bloco CMA⁺ proximal e outra abrangendo a maior parte do cromossomo, exceto o bloco CMA⁺ terminal, poderiam explicar a localização dos invertida dos BACs sem alteração aparente dos blocos nos braços curto e longo (Fig. 4a). A segunda hipótese refere-se às ampliações e desamplificações dos blocos CMA⁺ proximais e terminais, em uma ou outra espécie (Fig. 4b). Diferentes rearranjos estruturais podem ocorrer entre espécies relacionadas, podendo ser detectados em estudos comparativos, como as inversões e translocações ocorridas nos genomas de *Arabidopsis* e gêneros relacionados (Mandáková e Lysak 2008) e no gênero *Lotus* (Hayashi *et al.* 2001, Pedrosa *et al.* 2002). Diferentemente desses outros estudos, entretanto, nenhuma alteração intercromossômica foi detectada, sugerindo uma conservação de sintenia entre esses gêneros e compatível com as fracas barreiras reprodutivas observadas no grupo (Scora 1975; Moore 2001).

A comparação do cromossomo 2, identificado pelo BAC 21L13, em ambas espécies, assim como dos cromossomos 6 (20C12 e 28A05), 7 (sem marcador) e 9 (24E07, 55B01 e 59C23), indica claramente a ocorrência de amplificação/desamplificação das sequências repetitivas que compõem os blocos CMA⁺. Isso é corroborado pela diferença de tamanho dos cromossomos homeólogos (Fig. 3 e 4c, d, e, f). No caso do cromossomo 2, além da amplificação/desamplificação da banda proximal, modificando o cromossomo de B para D, ou vice versa, houve possivelmente também a amplificação e desamplificação das bandas terminais, alterando a posição do BAC em relação ao bloco CMA⁺ (Fig. 4c). As espécies de *Citrus* são caracterizadas por apresentarem grandes blocos de DNA repetitivo em tandem ricos em GC, localizados principalmente na região terminal dos braços longos (Guerra *et al.*

2000). Além do DNAr 45S, que compõe principalmente os blocos proximais, a maioria dos blocos CMA⁺ são constituídos por uma sequência satélite conhecida como CsSat181, a qual é altamente conservada e a principal família de DNA satélite do gênero *Citrus* e gêneros próximos, como *Fortunella* e *Poncirus* (Fann *et al.* 2001; Barros e Silva *et al.* 2010). A amplificação/desamplificação de sequências repetitivas em tandem tem sido atribuída a mecanismos de *crossing-over* desigual ou recombinação ilegítima (McAllister e Werren 1999), podendo levar a alterações na estrutura cromossômica sem, necessariamente, alterar a ordem de outras sequências (Navratilova *et al.* 2003). Mecanismos de amplificação/desamplificação têm sido atribuídos à deleção de sítios grandes e amplificação de sítios menores de DNAr 45S (Dubcovsky e Dvorak 1995), particularmente conhecido pela sua mobilidade dentro do genoma. Outros mecanismos, como transposição via elementos transponíveis e recombinação ectópica, também têm sido propostos para explicar tal fenômeno (Pedrosa *et al.* 2006).

No presente trabalho, BACs da biblioteca genômica de *P. trifoliata* foram utilizados com sucesso como marcadores citogenéticos para construir o primeiro mapa cromossômico de uma espécie de *Citrus* e estabelecer as homeologias cromossômicas entre os dois gêneros. Nossos resultados revelaram uma alta conservação de sintenia entre *Poncirus* e *Citrus* e uma frequente divergência quanto aos tipos cromossômicos, o que pode ser principalmente atribuído a amplificação e desamplificação de sequências repetidas em tandem presentes nesses blocos. Esses marcadores poderão agora ser utilizados para estabelecer homeologias dentro do gênero *Citrus* e investigar a utilidade dos tipos cromossômicos na investigação da origem dos híbridos de importância econômica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Walter Soares Filho, do Banco de Germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, por disponibilizar gentilmente as sementes para as preparações mitóticas, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior pela bolsa a S. M.

Referências

- Anamthawat-Jónsson K, Heslop-Harrison JS (1992). Species specific DNA sequences in the Triticeae. *Hereditas* 116: 49-54.
- Ananiev EV, Vales MI, Phillips, RL, Rines, HW (2002) Isolation of A/D and C genome specific dispersed and clustered repetitive DNA sequences from *Avena sativa*. *Genome* 45: 431-441.
- Barret HC, Rhodes AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany* 1: 105- 136.
- Barros e Silva AE, Marques A, Santos KGB, Guerra M (2010). The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Research*
- Brasileiro-Vidal AC, Santos Serejo JA, Soares Filho WS, Guerra M (2007) A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica* 129: 273- 279
- Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M (2005) The relationship among lemons, limas and citron: a chromosomal comparason. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 276-282
- Chang SB, Yang TJ, Datema E, Van Vugt J, Vosman B, Kuipers A, Meznikova M, Szinay D, Lankhorst RK, Jacobsen E, and Jong H. (2008). FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. *Chromosome Research* 16: 919-933.
- Cheng Z, Presting GG, Buel 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 MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M (2003) Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulada* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst Evol* 240: 149-161
- 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
- Dubcovsky J, Dvrak J (1995) Ribosomal RNA multigene loci: Nomads of the Triticeae genomes. *Genetics* 140: 1367-1377
- Fann JY, Kovarik A, Hemleben V, Tsirekidze NI, Beridze TG (2001) Molecular and structural evolution of Citrus satellite DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 103:1068-1073
- Garnsey SM, Su HJ Su and Tsai MC (1997) Differential susceptibility of pummelo and Swingle citrumelo to isolates of citrus tristeza virus, pp. 138–146 in *Proc. 13th Conf. Intl. Org. Citrus Virologists*, edited by J. V. da Graca, P. Moreno and R. K. Yokomi. University of California Press, Riverside, CA.
- Garnsey, SM and Lee RF (1998) Tristeza. In: J.O. Whiteside, S.M. Garnsey and L.W. Timmer (Eds), *Compendium of Citrus Diseases*. Amer Phytopath Soc Press, pp. 48–50.
- Gmitter FG, Xiao SY, Huang S, Hu XL, Garnsey SM, Deng Z (1996) A localized linkage map of the *citrus tristeza virus* resistance gene region. *Theor Appl Genet* 92: 688–695
- Gottwald TR, Garnsey SM and Yokomi RK (1996) Studies on the increase and spread of citrus tristeza virus in the presence of the brown citrus aphid and implications for the US citrus industry. *Citrus Ind.* 77: 41–58.
- Guerra M, Pedrosa A, Silva AEB, Cornélio MTM, Santos KGB, Soares Filho WS (1997) Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. *Brazilian Journal of Genetics* 20: 489- 496.

- Guerra M, Santos KGB, Silva AEB, Ehrendorfer F (2000) Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae – A case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany* 87: 735- 747.
- Guerra M (2009). Chromosomal variability and the origin of *Citrus* species. In: Mahoney CL, Springer DA (eds) *Genetics diversity*. Nova Science, New York, pp 51-68.
- Hemleben V, Kovarik A, Torres-Ruiz RA, Volkov RA, Beridze T (2007) Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. *Syst Biodivers* 5: 277-289
- Iovene M, Wielgus S M, Simon P W, Buell C R and Jiang J (2008) Chromatin structure and physical mapping of chromosome 6 of Potato and comparative analyses with Tomato. *Genetics* 180: 1307-1317.
- Islam-Faridi MN, Childs KL, Klein PE, Hodnett G, Menz MA, et al: (2002) A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome 1: fluorescence in situ hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosome. *Genetics* 161: 345-353
- 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 chromosome. *Proc. Natl Acad Sci USA* 92: 4487- 4491
- Jiang J, Birchler, JA, Parrott WA & Dawe RK (2003) A Molecular view of plant centromeres. *Trends in plant science* 8: 570–574
- Jiang J, Gill BS (2006) Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49: 1057- 1068
- Kim JS, Klein PE, Klein R, Price HJ, Mullet JE, Stelly DM (2005) Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics* 169: 1169- 1173

- Li W L, Chen P D, Qi L L, Liu D J (1995). Isolation, characterization and application of a species-specific repeated sequence from *Haynaldia villosa*. *Theor. Appl. Genet.* 90: 526-533
- McAllister BF, Werren JH (1999) Evolution of tandemly repeated sequences: What happens at the end of array? *J Mol Evol* 48: 469-481
- Mandáková T and Lysak MA (2008) Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in $x=7$ Crucifer Species (Brassicaceae). *The Plant Cell* 20: 2559- 2570.
- Moraes AP, Lemos RR, Brasileiro-Vidal AC, Soares Filho WS and Guerra M (2007a) Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenet. Genome Res.* 119: 275- 281.
- Moraes AP, Soares Filho WS and Guerra M (2007b) Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res.* 15: 115- 121.
- Moares AP, Mirkov TE, Guerra M (2008) Mapping the chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. By BAC-FISH. *Cytogenetic and Genome Research* 121: 277- 281
- Moore GA (2001) oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends in Genetics* 17: 536- 540.
- Moreira CS, Moreira S (1991) História da citricultura no Brasil. In: Rodrigues O, Viégas F, Pompeu JRJ (eds). *Citricultura Brasileira*. Fundação Cargill. Campinas. 1-18.
- Navratilova A, Neumann P, Macas P (2003) Karyotype analysis of four *Vicia* species using in situ hybridization with repetitive sequences. *Ann Bot* 91: 921-929
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, and Bachmair A (2002). Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicas*. *Genetics* 161: 1661-1672.
- Pedrosa-Harand A, Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution

- Pedrosa-Harand A, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D (2009). Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Research* 17: 405-417.
- Rai M (2006). Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Molecular Biology* 61: 399-414.
- Schmidt, T., Heslop-Harrison, J. S. (1994). Variability and evolution of highly repeated DNA sequences in the genus *Beta*. *Genome* 36: 1074-1079.
- Schmidt, R. (2002). Plant genome evolution: lessons from comparative genomics at the DNA level. *Plant Mol. Biol.* 48: 21-37.
- Scora RW: IX. On the history and origin of citrus. *Buly Botanical Club* 102: 369-375 (1975).
- Sharma S, Raina SN (2005). Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosome. *Cytogenet Genome Res* 109: 15-26.
- Spiegel-Roy P, Goldschmidt EE (1996) *Biology of citrus*. Cambridge University Press, Cambridge
- Swingle WT, Reece PC (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds). *The Citrus industry. History, world distribution, botany and varieties*, vol I. Berkeley: University of California Press, 190-430p.
- Vershinin AV, Alkhimova AG, Heslop-Harrison JS, Potapova TA, and Omelianchuk N (2001) Different patterns in molecular evolution of the Triticeae. *Hereditas* 135: 153-160
- Wang ZX, Kurata N, Saji S, Katayose Y, Minobe Y (1995). A chromosome 5-specific repetitive DNA sequence in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90: 907-913.

- Wang K, Guan B, Guo W, Zhou B, Hu Y, Zhu Y, Zhang T (2008) Completely Distinguishing Individual A-Genome Chromosomes and Their Karyotyping Analysis by Multiple Bacterial Artificial Chromosome–Fluorescence in Situ Hybridization. *Genetics* 178: 1117-1122.
- Webber HJ (1967) History and development of the *Citrus* industry. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor L D (eds). *The Citrus industry. History world distribution, botany and varieties*, vol I. Berkeley: University of California Press, 1-39p.
- Yamamoto M, and Tominaga S (2003) High chromosomal variability of 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, and Tominaga S (2007) CMA banding patterns of chromosomes in major *Citrus* species. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 76: 36-40.
- Yang ZN, Ye XR, Choi S, Molina J, Moonan F, et al (2001) Construction of a 1.2 Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genome* 44: 382- 393
- Yang ZN, Ye XR, Molina J, Roose ML, Mirkov TR (2003) Sequence Analysis of a 282-Kilobase Region Surrounding the Citrus Tristeza Virus Resistance Gene (*Ctv*) Locus in *Poncirus trifoliata* L. Raf. *Plant Physiology*. vol. 131, pp. 482–492,
- Zhang P, Li W, Fellers J, Friebe B, Gill BS (2004) BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma* 112: 288- 299.
- Zwick MS, Hanson RE, Mck night TD, Islam-Faridi MH, Stelly DM, et al (1997) A rapid procedure for the isolation of *Cot-1* DNA from plants. *Genome* 40: 138- 142.

Legendas das Figuras

Tabela 1. Lista dos BACs hibridizados em *Citrus medica* e a comparação de sua distribuição e posição em *Poncirus trifoliata* (baseado em Moraes *et al.* 2008 e A. P. Moraes, dados não publicados). Os 14 BACs mapeados em ambas as espécies estão indicados em negrito e os 4 que tiveram sua posição ou tipo cromossômico conservado entre as espécies estão sublinhados.

Distribuição / Posição^a		
BAC	<i>Citrus medica</i>	<i>Poncirus trifoliata</i>
<u>01B09</u>	<u>Única / 8F</u>	<u>Única / 8F</u>
<u>02C12</u>	<u>Única / 4DS</u>	<u>Única / 4DS</u>
02G12	Dispersa (10xC _{ot} -1)	Única / 9FL
06C13	Dispersa (10xC _{ot} -1)	Única (10xC _{ot} -100) / DS
06I11	Dispersa (50xC _{ot} -1)	Única / 3BL
14A12	Única / 3BS	Única / 3BL
19F02	Dispersa	Única / D
20A12	Dispersa (10xC _{ot} -1)	Única / DS
20C12	Única / 6FL	Única / 6DS
<u>20C13</u>	<u>Única (10xC_{ot}-1) / 4DL</u>	<u>Única / 4DL</u>
21L13	Única / 2DL	Única / 2BS
<u>24C13</u>	<u>Única / 1FLS</u>	<u>Única / 1FLS</u>
24E07	Única / 9DL	Única / 9FL
25H02	Dispersa (10xC _{ot} -1)	Única / BS
27P09	Única / 3BL	Única / 3BS
28A05	Única (10xC_{ot}-1) / 6FL	Única / 6DS
28A07	Única / 3BL	Única / 3BS
31F02	Sem sinal	Única / DL
32D14	Única / 3BS	Única / 3BL
36A15	Dispersa (20xC _{ot} -1)	Única / 9FL
55B01	Única / 9DL	Única / 9FL
59C23	Única / 9DL	Única / 9FL
91C01	Sem sinal	Única / F
95B01	Sem sinal	Única / BS
95D01	Sem sinal	Única / F

^a Distribuição: única, dispersa ou sem sinal, com ou sem a presença de DNA bloqueador .C_{ot}. Posição: número = par cromossômico; letra maiúscula = tipo cromossômico; S ou L = braços curto ou longo, respectivamente.

Tabela 2. Posição física dos BACs marcadores nos respectivos cromossomos metafásicos de cidra

Cromossomo^a	Clone	Média da posição relativa	Desvio padrão
1	24C13	0,18	0,05
2	21L13	0,79	0,05
3	14A12	0,11	0,04
	32D14	0,11	0,03
	28A07	0,25	0,04
	27P09	0,79	0,04
4	02C12	0,21	0,06
	20C13	0,79	0,06
5	DNAr 5S	0,83	0,04
6	20C12	0,80	0,05
	28A05	0,85	0,04
8	01B09	0,79	0,04
9	24E07	0,48	0,04
	59C23	0,50	0,06
	55B01	0,55	0,06

^ade acordo com Silva *et al.*, em preparação

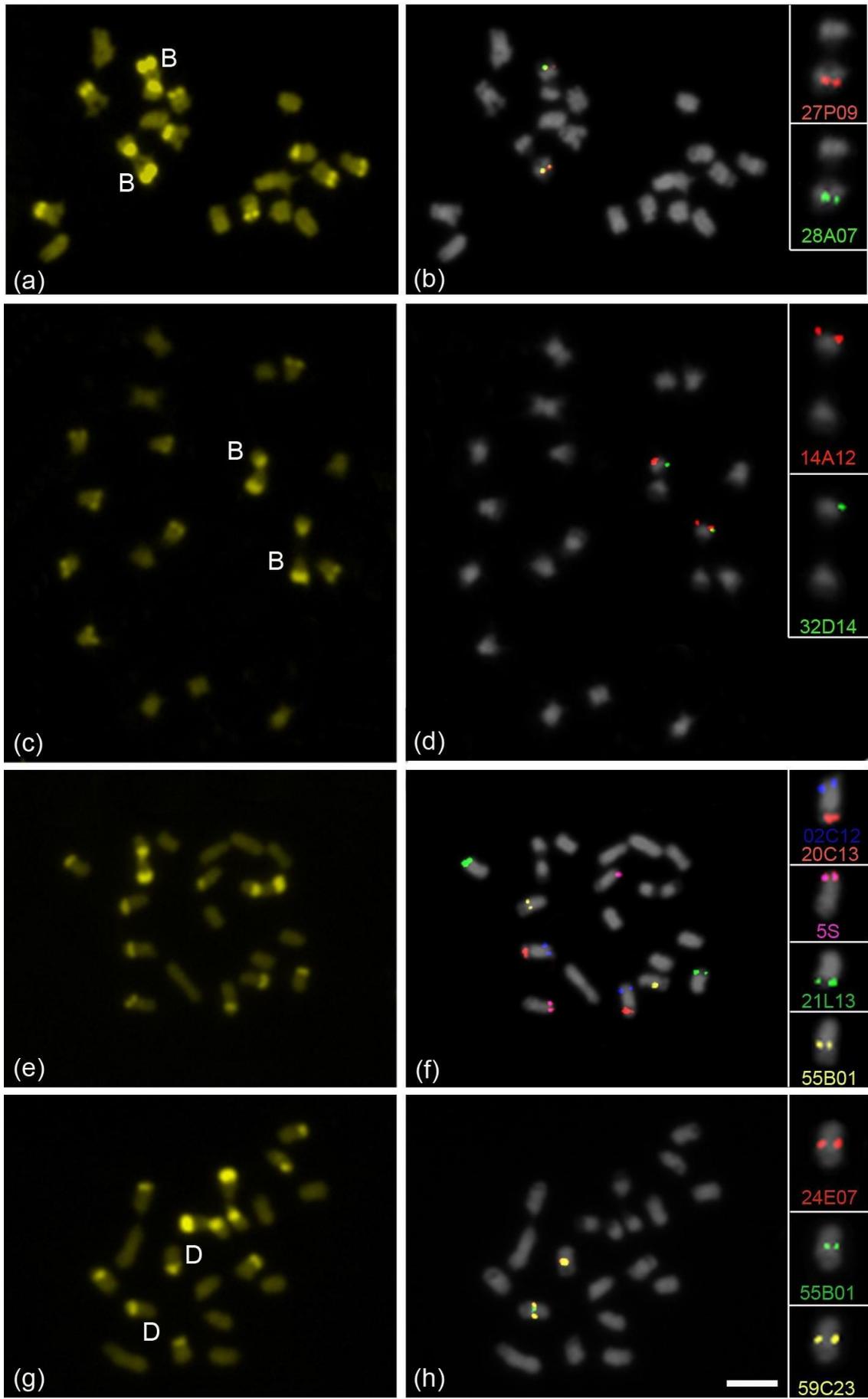


Figura 1 - Localização de BACs e do DNAr 5S em cromossomos do tipo B e D de cidra. Em **a**, **c**, **e**, e **g** os cromossomos foram corados com CMA. Sinais de hibridização são mostrados em **b** (BACs 27P09 e 28A07), **d** (BACs 14A12 e 32D14), **f** (BACs 02C12, 20C13, 21L13, 55B01 e DNAr 5S) e **h** (BACs 24E07, 55B01 e 59C23), onde os cromossomos estão contracorados com DAPI, visualizados em cinza. Os insertos em **b**, **d**, **f** e **h** mostram um dos cromossomos marcados com cada BAC em maior aumento. Em **a**, **c** e **g** os tipos dos cromossomos marcados estão indicados. Barra em **h** corresponde a 5µm.

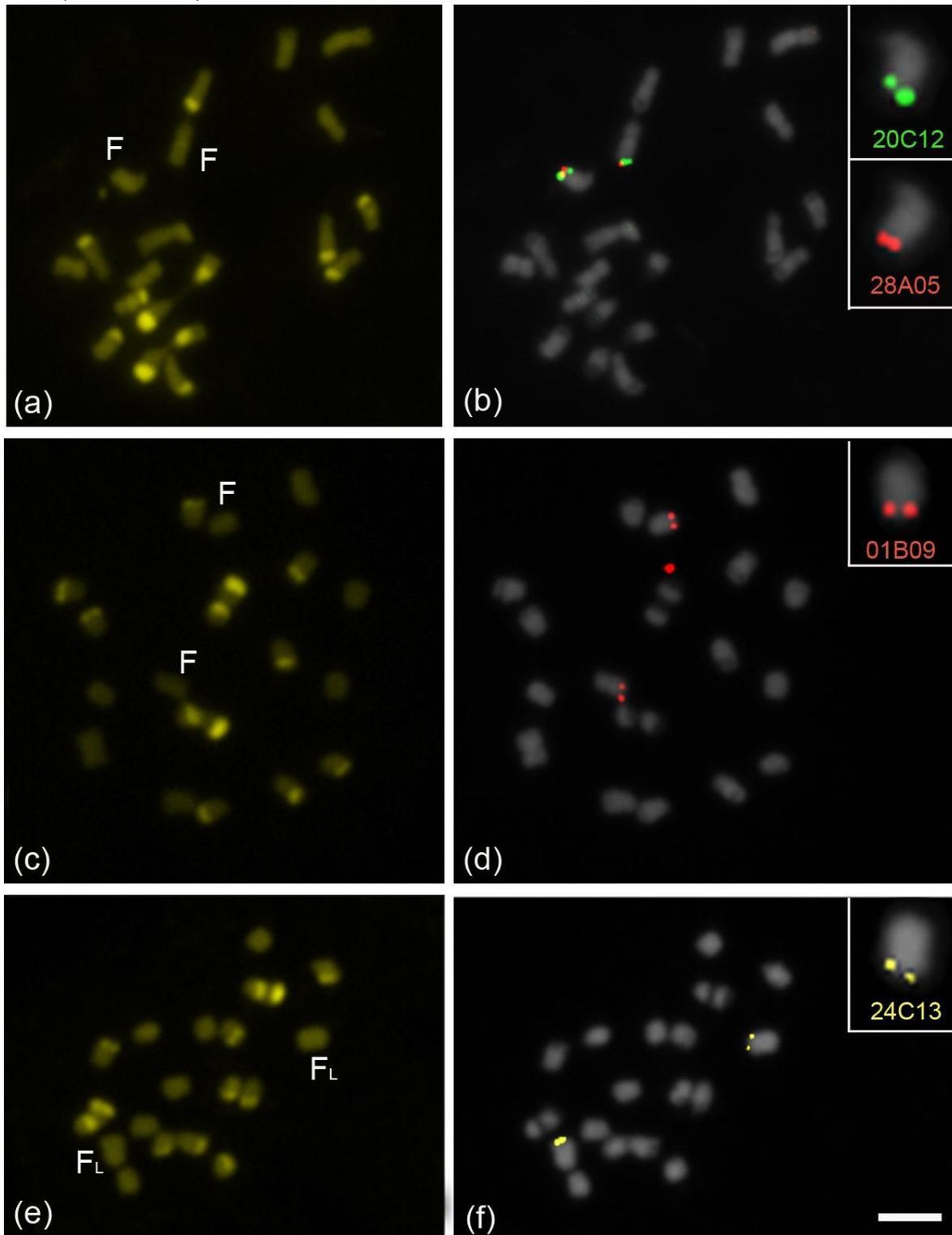


Figura 2 - Localização de BACs em cromossomos tipo F e F_L de cidra. Em **a**, **c** e **e**, os cromossomos foram corados com CMA. Sinais de hibridização são mostrados em **b** (BACs 20C12 e 28A05), **d** (BAC 01B09), e **f** (BAC 24C13). Os insertos em **b**, **d** e **f** mostram um dos cromossomos marcados com cada BAC em maior aumento. A barra em **f** corresponde a 5μm.

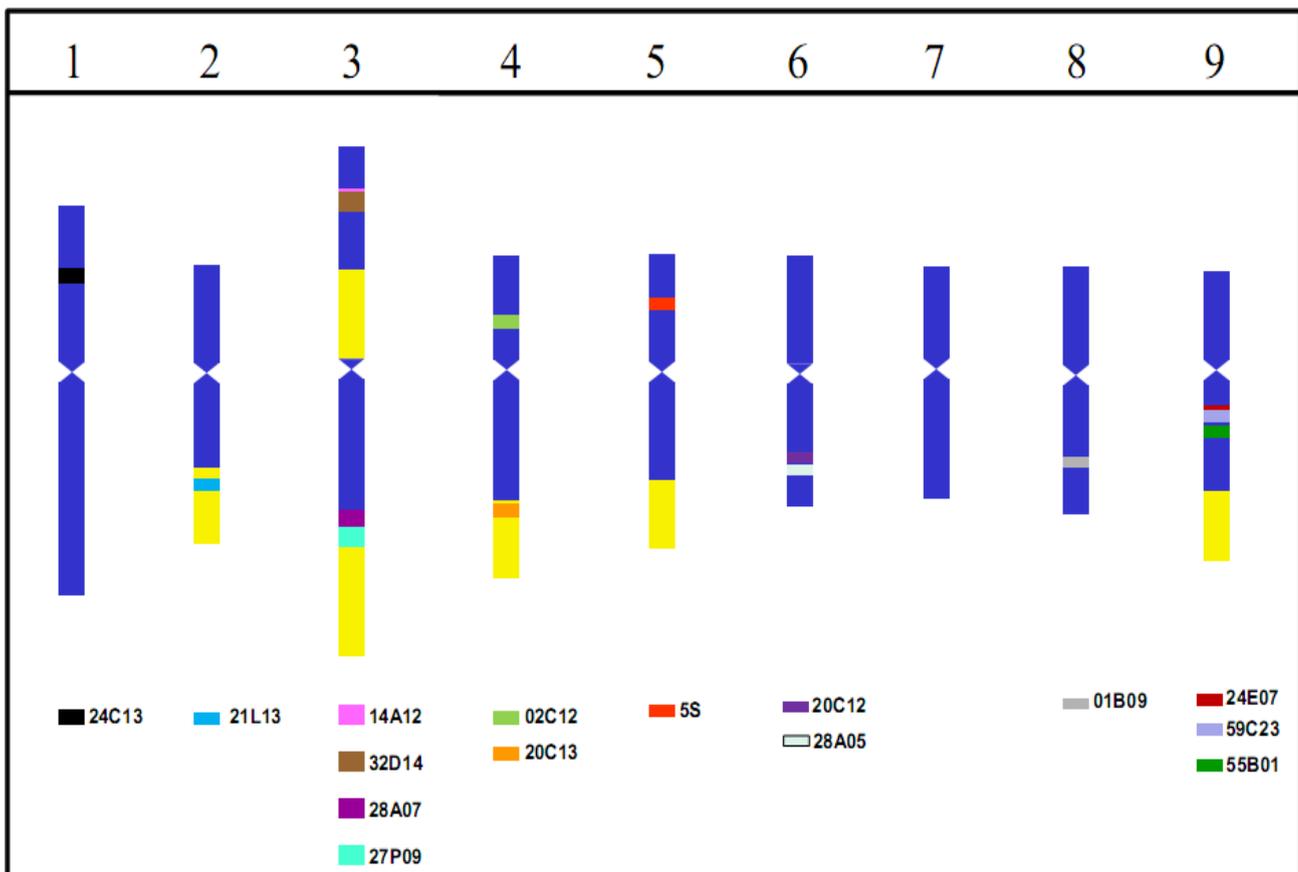
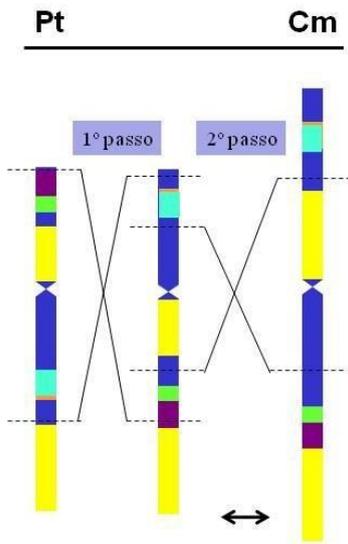
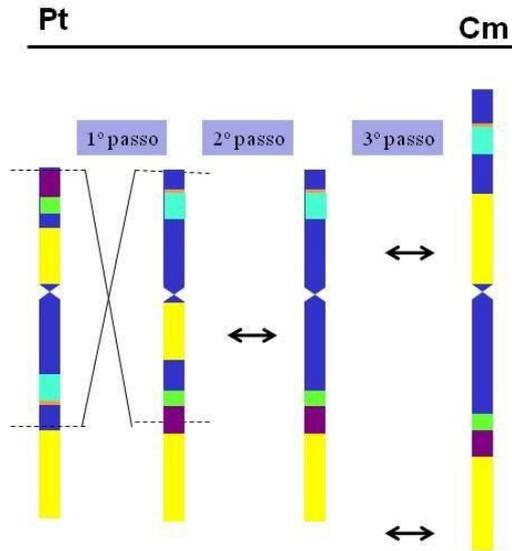


Figura 3 - Idiograma *Citrus medica* representando a posição do DNAr 5S e dos 14 BACs que apresentaram sinal único. Os blocos CMA+ estão indicados em amarelo e os BACs de acordo com as cores da legenda. Os cromossomos foram numerados de acordo com o idiograma de *Poncirus* (Silva *et al.*, em preparação).

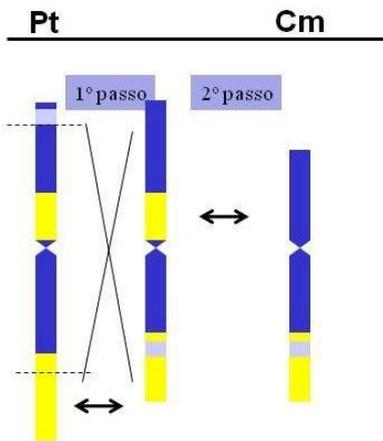
a)



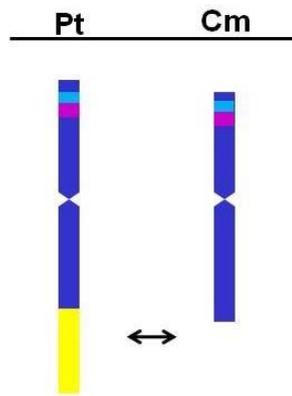
b)



c)



d)



e)

f)

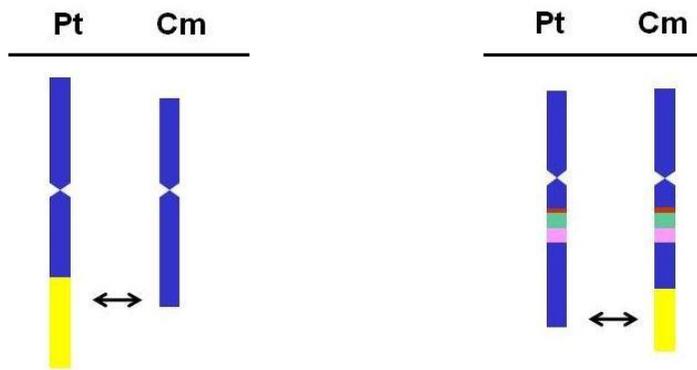


Figura 4 – Esquemas de possíveis eventos de evolução cromossômica entre *P. trifoliata* e *C. medca*. (a) e (b) cromossomo 3, (c) cromossomo 2, (d) cromossomo 4, (e) cromossomo 7 e (f) cromossomo 9. As setas representam ampliações/desamplificações e as linhas, inversões. Os cromossomos estão representados na mesma escala (dados do presente trabalho e de Silva *et al.*, em preparação), refletindo suas diferenças de tamanho.

5. Conclusões

5- CONCLUSÕES

1- A maioria dos BACs marcadores de *Poncirus trifoliata* puderam ser mapeados *in situ* em *Citrus medica*, demonstrando a possibilidade de utilização de sondas heterólogas entre gêneros distintos no grupo.

2- Os resultados obtidos a partir da FISH com sondas de BAC demonstram ser essa uma técnica bastante eficaz na identificação cromossômica e na inferência de homeologias no grupo, tendo possibilitado a construção do primeiro mapa citogenético para uma espécie do gênero *Citrus*.

3- Alguns BACs cópia-única em *P. trifoliata* mostraram sinal disperso em *C. medica*, indicando divergência na distribuição de sequências repetidas dispersas entre as duas espécies.

4- A hibridização *in situ* dos BACs que apresentaram sinal cópia única em *C. medica* confirmam a condição homomórfica da cidra, previamente indicada pelas análises de bandeamento CMA e localização de sítios de DNAr 5S e 45S.

5- Nenhuma quebra de sintenia foi detectada, indicando a ausência de rearranjos intercromossômicos no grupo.

6- Embora inversões pericêntricas e outros rearranjos não possam ser descartados, ampliações e desamplificações de sequências repetidas em tandem, que formam os proeminentes blocos CMA+ presentes no grupo, são aparentemente frequentes, contribuindo para a baixa conservação dos tipos cromossômicos entre os homeólogos, e os principais responsáveis pela diferenciação cromossômica dentro dos citros.

6.1. Nomas da revista *Chromosome Research*

Manuscript Submission

There are no page charges or charges for the publication of colour illustrations or administration charges for papers published in *Chromosome Research*. It is understood that papers submitted for publication have not been published previously and are not simultaneously offered to any other journal. Before submission, the submitting author must ensure that the manuscript has been seen and approved by all other named authors.

How to Submit your Manuscript

Authors should submit their manuscripts online. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right of the *Chromosome Research* web page, or follow this link: <http://www.editorialmanager.com/chromres/> Upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. A decision with regard to acceptance for publication will normally be given within 21 days of receipt of the manuscript.

Style and Presentation

The manuscript should be typed with double spacing throughout, allowing for ample margins. The title page should show the paper title, names and addresses of all authors, a short running title, and fax and telephone numbers and the e-mail address for the corresponding author. The text of the paper should be arranged in the following sequence: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. Informative legends should be provided for all illustrations and should be grouped together at the end of the paper, along with all tables. Subheadings may be inserted in the main text, but should not be numbered or lettered. Manuscripts should be written in clear, grammatical, idiomatic English. Spelling should conform to Webster's International Dictionary or The Concise Oxford English Dictionary and data should be presented simply and concisely, using Systeme International (SI) units.

Abbreviations

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

References

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

Examples:

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

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

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

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

Citing Internet References

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

For example:

Gaten E. (2000) Internet references. Retrieved from

<http://www.le.ac.uk/biology/teach/mod300/ecitations.html> 19/9/2000

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

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

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

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

Keywords

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

Tables and Illustrations

All tables and illustrations should be referred to in the text, with appropriate locations indicated in the text margin. Tables should present new information and not duplicate data included in the text. Every table should have a descriptive title and, if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Line drawings should be supplied in a form suitable for high-quality reproduction. Axes

should be labelled clearly; other lettering should be kept to a minimum. Avoid the use of fine tints, especially as background to text.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel) TIFF. Photographs and photomicrographs should be cropped as close as possible to the area of interest and should be submitted as high resolution (>300dpi) as electronic files together with the manuscript. All photomicrographs must be accompanied by a scale bar with the equivalent measurement stated in the figure legend.

Colour figures

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

Electronic Supplementary Material

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

- Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use PDF, QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format) Submit your text or presentation material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for longterm storage.
- Information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.

- Large quantities of original data that relate to the paper, e.g. additional tables, large numbers of illustrations (colour and black & white), etc.

Submission

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

Numbering

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

Legends

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

Permission and Copyright

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

Open access publishing: Springer Open Choice™

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

Choice™, upon acceptance please visit www.springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice™ cannot be ordered for published articles. Please note that funding agencies with mandatory open access or public access (i.e. USA NIH and the UK Wellcome Trust) and several other institutes (The Max Planck in Germany, the Dutch UKB and others) have special arrangements for Open Access publishing with Springer. Please consult your funding agency's representative for specific details.

Proofs

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

Off-prints

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

Additional Information

Max Haring

Publishing editor, Chromosome Research

Springer

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

E-mail: Max.Haring@springer.com

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