

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/50891

IB/ 81828

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Edson Freitas de Araújo

FILOGENIA DE *Citrus* E GÊNEROS AFINS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Edson Freitas de Araújo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Marcos A. Machado

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética
Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Machado

UNIDADE IB/81321
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Ar15f
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50591
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 12/09/02
Nº CPD _____

CM00173044-2

BIB ID 256999

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Ar15f

Araújo, Edson Freitas de

Filogenia de *Citrus* e gêneros afins/Edson Freitas de Araújo. –
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Marcos Antônio Machado

Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Filogenia. 2. Taxonomia. 3. Árvores de citros verdadeiros..

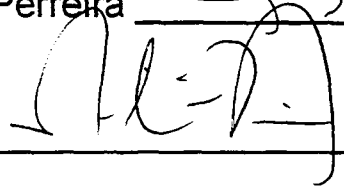
I Machado, Marcos Antônio. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 16 de julho de 2002

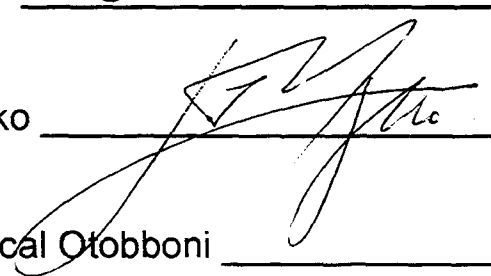
Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcos Antônio Machado marcos A Machado

Prof. Dr. Gonçalo Amarantes Guimarães Perreira 

Prof. Dra. Siu Mui Tsai 

Prof. Dr. Jorgino Pompeu Jr. Jorgino Pompeu Jr

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko 

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Otobboni

Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiroz

Às vezes me calço para poder não sonhar.
As pedras no caminho, a areia quente, a terra
molhada, a lama, a água, não poderei tocar.
Assim me isolo da vida calando a alma
Assim percorro caminhos sem perceber-los
Assim vai-me a vida, simétrica e previsivelmente
morta.

A minha família pelo apoio dado ao longo da minha vida. Especialmente aos meus filhos, Tito, Ciro (*in memorian*) e Pedro, por tudo que representam para mim,

dedico.

Agradecimentos

Ao Dr. Marcos Machado pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e pela orientação.

Aos professores Dr. Herculano Penna Medina Filho, Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni e Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e pela análise prévia desse trabalho e valiosas contribuições.

Ao professor Dr. Luciano Paganutti de Queiroz pela valiosa contribuição na discussão botânica e taxonômica desse trabalho.

Aos professores Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko e Profa. Dra. Maria do Carmo S. Amaral pela atenção e discussão desse trabalho.

Aos colegas José Carlos, Antônio, Rubens e Francisco Laranjeira pelo companheirismo durante essa longa jornada.

A todos os colegas do laboratório de Biotecnologia de citros do CSSM-IAC.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

À minha linda “Pimentinha” pelo carinho e apoio.

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Distribuição geográfica dos representantes da subfamília Aurantioideae.....	3
2. Taxonomia da subfamília Aurantioideae.....	4
3. Diversidade genética de <i>Citrus</i>	10
4. Relações filogenéticas de <i>Citrus</i> e gêneros afins.....	13
4.1. Filogenia inferida a partir de dados controlados pelo núcleo celular.....	14
4.2. Filogenia inferida com base em dados de origem citoplasmática.....	16
5. Evolução molecular.....	16
5.1. Genoma nuclear.....	17
5.2. Plastoma.....	17
5.3. Condrioma.....	18
6. Análise filogenética.....	19
7. Filogenia molecular.....	21
OBJETIVOS.....	23
Capítulo 1. Filogenia de <i>Citrus</i> inferida a partir da evolução das regiões trnL(UAA)trnF(GAA) e trnT(UGU)-trnL(UAA) do genoma de cloroplasto.....	25
1. Resumo.....	26
2. Introdução.....	27
3. Material e métodos.....	28
4. Resultados	30
5. Discussão.....	33
6. Referências bibliográficas.....	43

Capítulo 2. What is <i>Citrus</i>? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae).....	49
1. Abstract.....	51
2. Introduction.....	52
3. Material and Methods.....	53
4. Results	54
5. Discussion.....	55
5.1. Tribes and subtribes.....	55
5.2. Relationships between the genera of the subtribe Citrinae.....	56
6. References.....	68
Capítulo 3. Incongruência nas relações citoplasmáticas de <i>Citrus</i>: segregação de organelas ou convergência molecular?.....	71
1. Resumo.....	72
2. Introdução.....	72
3. Material e métodos.....	74
4. Resultados	76
5. Discussão.....	79
6. Referências bibliográficas.....	93
CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES À REVISÃO	99
BIBLIOGRÁFICA.....	

RESUMO

A história taxonômica da subfamília Aurantioideae é bastante complexa devida à ação antrópica, associada à sua biologia reprodutiva do grupo que é caracterizada pela compatibilidade reprodutiva e pela ocorrência de apomixia facultativa. Os estudos filogenéticos têm apoiado a condição monofilética tanto para a família Rutaceae quanto para a subfamília Aurantioideae. No entanto, diversos táxons propostos para essa subfamília não têm se apresentado como grupos naturais. Em *Citrus* foram descritas de 11 (Engler, 1931) até mesmo 162 espécies (Tanaka, 1977). O sistema de classificação mais utilizado para a subfamília Aurantioideae foi proposto por Swingle & Reece (1967), descrevendo 16 espécies para esse gênero.

No presente trabalho, a filogenia de Aurantioideae foi inferida pela análise de segmentos de DNA de origem citoplasmática, dando ênfase às relações existentes entre *Citrus* e gêneros afins, confrontando essas informações com o sistema de classificação proposto por SWINGLE & REECE (1967). Muitos táxons sugeridos por esse sistema de classificação (p.ex. subtribo, grupo subtribal, gênero e subgênero) se apresentaram como não monofilético. Dentre os grupos subtribais, apenas “árvores de citros verdadeiros” (“*True citrus fruit trees*”) correspondeu a um grupo natural, formando um clado bem sustentado dentro da subtribo Citrinae. *Citrus* se apresentou como um grupo polifilético, o que permitiu propor uma definição mais ampla para o gênero, incluindo nesse os demais representantes do grupo “árvores de citros verdadeiros”. A separação dos representantes de *Citrus* nos subgêneros *Papeda* e *Citrus* também não foi sustentada.

A análise dos genomas mitocondrial e de cloroplasto sugeriu linhas evolutivas que separaram *C. medica*, *C. grandis* e *C. reticulata*, bem como a existência das linhagens maternas das toranjas e das tangerinas. Esses dados apoiam a condição de *C. grandis* e *C. reticulata* formarem a base da origem materna das espécies comerciais de citros. *C. medica*, por sua vez, não contribuiu como parental materno na formação dos híbridos naturais de *Citrus*.

Um padrão de evolução reticulado foi proposto para a origem de *C. medica*, com a possível introgressão de representantes do grupo “árvores de citros verdadeiros”. Tal sugestão se baseou na grande similaridade genética revelada por dados de origem nuclear e na ampla divergência citoplasmática, que são observadas entre esse táxon e os outros representantes de *Citrus*.

C. reticulata apresentou uma posição conflituosa dentro do grupo “árvores de citros verdadeiros”, devida à incongruência revelada pelos dados de origem citoplasmática. Os dados mitocondriais sugeriram que um ancestral recente foi compartilhado por *C. reticulata*, *Poncirus* e *Fortunella*, enquanto que os dados oriundos do plastoma sugeriram que *C. reticulata* tenha compartilhado um ancestral recente com os outros representantes de *Citrus* (com exceção de *C. medica*). A hipótese apresentada para explicar tal incongruência sugere a ocorrência de um híbrido citoplasmático no processo de formação das tangerinas, com possível segregação de organelas. A ocorrência natural desse híbrido se justifica pela proximidade filogenética, condição de simpatria e compatibilidade observada entre *Poncirus*, *Citrus* e *Fortunella*.

SUMMARY

The taxonomy of the subfamily Aurantioideae is quite complex due the anthropic action associated to reproductive biology of the group having high sexual compatibility and facultative apomixy. Phylogenetic studies have pointed out the monophyletic condition of the family Rutaceae as well as the subfamily Aurantioideae. However, several taxa of this subfamily have not been shown as natural groups. In the genus *Citrus* eleven to 162 species were described. The more used classification system for the subfamily Aurantioideae was proposed by Swingle & Reece (1967) that described 16 species for the genus *Citrus*.

Here the phylogeny of the subfamily Aurantioideae was evaluated by analysis of DNA sequences from chloroplast and mitochondria, with emphasis to the relationship between the genus *Citrus* and its relatives, and comparing such information with the more accepted classification system proposed by SWINGLE & REECE. Many taxa suggested by the authors (e.g., sub-tribe, group of sub-tribes, genus and sub-genus) were no monophyletic as proposed. Among the group of sub-tribes, only the group '*True citrus fruit trees*' corresponded to a natural group, clustering a consistent clad within the sub-tribe Citrinae. The genus *Citrus* is a polyphyletic group allowing a wider definition for the genus, including within it other representatives of the group *True citrus fruit trees*. The division of the genus *Citrus* into the sub-genus *Papeda* and *Citrus* was also not supported.

Analysis of the mitochondria and chloroplast sequences suggested evolutive pathways separating *C. medica*, *C. grandis* e *C. reticulata*, as well as the existence of maternal lines of pummelos and mandarins. Such date support the condition of *C. grandis* and *C. reticulata* to be the maternal basis of the commercial varieties of citrus. On the other hand, *C. medica* does not contribute as maternal parent in the natural hybrids of *Citrus*.

A reticulate evolution pattern was proposed for the origin of *C. medica*, with introgression of representative of the group *True citrus fruit trees*. This hypothesis is based on the high genetic similarity reveled by nuclear sequences, and in the

wide cytoplasmatic divergence observed among these taxa and other representative of *Citrus*.

Based on cytoplasmatic sequences *C. reticulata* showed low coherence within the group *True citrus fruit trees*. Mitochondrial sequences suggested that a recent ancestral was common to *C. reticulata*, *Poncirus*, and *Fortunella*. Otherwise, chloroplast sequences pointed for a common ancestral of *C. reticulata* within other *Citrus* species, except with *C. medica*. Cytoplasmatic hybrid and / or organelle segregation may be a hypothesis to explain such incoherence. Since *Poncirus*, *Citrus* and *Fortunella* are sympatric genera and have sexual compatibility, it may expected that hybrids of mandarins occur in natural conditions.

INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* é representado por plantas de porte médio (arbóreo ou arbustivo) caracterizadas por apresentarem flores brancas e aromáticas e frutos tipo baga, contendo vesículas que são preenchidas por suco de valor comercial. Os representantes deste gênero são em sua maioria diplóides, apresentando um conjunto básico de cromossomos $x = 9$, sendo relatados poucos indivíduos triplóides e tetraplóides. Estima-se que a sua origem ocorreu em torno de 20 a 30 milhões de anos atrás, nas regiões tropical e subtropical da Ásia e do arquipélago Malaio, de onde dispersaram para outras regiões do mundo.

Os citros correspondem ao grupo de plantas de maior importância econômica dentre os representantes da família Rutaceae, sendo classificados dentro da subfamília Aurantiodeae, tribo Citreae, subtribo Citrineae e grupo subtribal C (“Árvores dos Citros Verdadeiros”). A história taxonômica dessa subfamília foi marcada pela proposição de novos gêneros, segregados do gênero *Citrus*, como no caso de *Poncirus* (RAFINESQUE, 1865-66 In: SWINGLE & REECE, 1967), *Fortunella* e *Microcitrus* (SWINGLE, 1915ab). No entanto, não há fortes evidências morfológicas para separação desses gêneros, uma vez que alguns dos caracteres diagnósticos utilizados para definir *Citrus* podem ser encontrados em outros gêneros. Além disto, diferentes sistemas taxonômicos têm sugerido um número variável de espécies para *Citrus*, sendo descritas desde 11 (ENGLER, 1931), 16 (SWINGLE & REECE, 1967), ou mesmo 162 espécies distintas para esse gênero (TANAKA, 1977). Atualmente muitos táxons representantes de *Citrus* são considerados como de origem híbrida.

Parte da complexidade filogenética e taxonômica observada em *Citrus* é devida à sua biologia reprodutiva e ampla história de cultivo. Os seus representantes apresentam compatibilidade sexual, o que possibilita a origem natural de híbridos intergenéricos e interespecíficos ao longo do processo de evolução. Além disto, a existência de poliembrionia nucelar adventícia permite que esses híbridos sejam mantidos geneticamente estáveis, contribuindo com a diversidade genética que é observada no referido grupo.

Uma grande afinidade genética é observada entre *Citrus*, *Fortunella*, *Microcitrus* e *Poncirus*. Os estudos sobre a evolução em *Citrus* sugerem a ocorrência de introgressão de alguns destes gêneros na sua formação, bem como a existência de três espécies que compõem a base de formação dos híbridos naturais do subgênero *Citrus*. As relações de afinidade existentes entre estes táxons, têm sido discutidas à luz da análise fenética, inferidas com base em estudos de similaridade. No presente trabalho a complexidade taxonômica do grupo é discutida à luz de uma hipótese filogenética baseada na evolução de seqüências de DNA de cloroplastos (cpDNA) e mitocôndrios (mtDNA).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Distribuição geográfica dos representantes da subfamília Aurantioideae

Os representantes da subfamília Aurantioideae são nativos da Ásia e África. Vinte e sete dos seus 33 gêneros estão distribuídos na região de Monção (sudoeste da Ásia), enquanto cinco gêneros são encontrados na África tropical. Os gêneros *Afraegle*, *Aeglopsis*, *Balsamocitrus* e *Citropsis* são encontrados unicamente na África Tropical, enquanto que *Clausena* corresponde ao único gênero desta subfamília que é encontrado nos dois continentes (SWINGLE & REECE, 1967).

Segundo estudos arqueológicos, estima-se que o gênero *Citrus* tenha surgido há 20 ou 30 milhões de anos (TANAKA, 1961). Várias de suas espécies representativas são nativas das regiões tropical e subtropical da Ásia e do arquipélago Malaio, estando ali distribuídas da seguinte forma: a) os representantes do subgênero *Papeda* são encontrados na China, nordeste da Índia, sul das Filipinas, norte e centro da Tailândia e norte do Vietnã; b) *C. medica* é encontrada na Índia, China, Indochina e Japão; c) *C. grandis* está localizada no leste do arquipélago Indiano; d) *C. reticulata* no sul da China e *C. tachibana* no Japão (SWINGLE & REECE, 1967); e) *C. halimii* na Tailândia e Malásia (STONE *et al.*, 1974). Os outros representantes do grupo "árvores de citros verdadeiros" estão assim distribuídos: *Eremocitrus* e cinco das seis espécies representantes de *Microcitrus* (SWINGLE & REECE, 1967) são encontrados na Austrália; *Microcitrus warbugiana* e *Clymenia* são encontrados no arquipélago Bismack e Nova Guiné; *Fortunella* é encontrada no sudoeste da China, enquanto na região central e norte deste país estão os representantes de *Poncirus*.

2. Taxonomia da subfamília Aurantioideae

Citros corresponde a plantas arbóreas e arbustivas de climas tropical e subtropical pertencentes à ordem Geraniales, família Rutaceae e subfamília Aurantioideae (SWINGLE & REECE, 1967). Representantes desta família são caracterizados por apresentarem glândulas de óleo, ovário apoiado sobre disco floral (nectário), manchas transparentes nas folhas e frutos com placentação axial. Os representantes Aurantioideae apresentam folhas perenes, com exceção de representantes dos gêneros *Poncirus*, *Aegle*, *Feronia*, bem como três espécies de *Clausena* e uma espécie representante de *Murraya*. Geralmente possuem flores brancas e freqüentemente aromáticas. Muitos dos gêneros apresentam frutos globosos, com casca de coloração verde, amarela ou laranja, com numerosas glândulas de óleo que dão um agradável aroma ao fruto quando manuseado (SWINGLE & REECE, 1967).

O sistema proposto por SWINGLE & REECE (1967) classifica as tribos, subtribos, grupos subtribais e gêneros da subfamília Aurantioideae de acordo com o grau de semelhança em relação a *Citrus*. Esta subfamília é formada pelas tribos Clauseneae e Citreae, que somam um total de seis subtribos, nove grupos subtribais, trinta e três gêneros, duzentos e três espécies e trinta e oito variedades. A tribo Clauseneae (Tribo I) - árvores citróides de frutos primitivos e muito primitivos - agrupa as subtribos Micromelinae (árvores citróides de frutos muito primitivo); Clauseninae (árvores citróides de frutos primitivos) e Merrillinae (árvores citróides primitivos de frutos grandes), enquanto que a tribo Citreae (Tribo II) - árvores de citros e citróides - é formada pelas subtribos Triphasiinae (árvores citróides de frutos pequenos), Citrinae (árvores de citros) e Balsamocitrinae (árvores citróides de frutos de casca dura) (Tabela 1).

Os caracteres utilizados como diagnóstico para os representantes da tribo Citreae são: presença de espinho; folhas peniformes ou com ráquis articulada; e frutos mais elaborados, podendo apresentar estruturas vesiculares. Dentro dessa tribo, os representantes das subtribos são classificados de acordo com as seguintes características de frutos: a) Triphasiinae apresenta frutos pequenos, com casca fina e lóculos preenchidos com goma mucilagínosa; b) Balsamocitrinae apresenta fruto

grande, com casca dura, preenchido com goma resinosa; c) Citrinae, geralmente apresentam frutos tipo baga, com casca coriácea e lóculos preenchidos com vesículas de suco.

A subtribo Citrinae apresenta 13 gêneros e 65 espécies, incluindo as mais importantes do ponto de vista econômico dentre as Rutaceas (SWINGLE & REECE, 1967). Essa subtribo é subdividida em grupos subtribais, que correspondem aos grupos A ("Primitive *Citrus* Fruit Trees"), B ("Near-*Citrus* Fruit Trees") e C ("True *Citrus* Fruit Trees"). Os representantes desta subtribo são caracterizados por apresentar frutos contendo vesículas de suco, estrutura bastante peculiar em Rutaceae, que corresponde a células com paredes muito finas, originadas na parede do lóculo e se desenvolvem em grande quantidade no interior da cavidade locular. No entanto, nos representantes do grupo A, estas vesículas apresentam forma indefinida, que se desintegram em óleo ou resina quando desenvolvidos. No grupo B, as vesículas apresentam formato cônico, estando incrustadas em toda parede do lóculo. Já no grupo C, caracterizado por apresentar hesperídio mais desenvolvido, as vesículas estão incrustadas na parede dorsal do lóculo, nunca são cônicas, sendo geralmente fusiformes e preenchem toda área do lóculo não ocupada pelas sementes.

Dentro do grupo C, os gêneros *Fortunella*, *Microcitrus*, *Poncirus* e *Citrus* têm despertado grande interesse em razão da sua importância econômica. De acordo com a classificação de SWINGLE & REECE (1967) estes gêneros apresentam a seguinte descrição:

a) *Fortunella*: é representado por quatro espécies de árvores pequenas e arbustos. Possui folhas unilobadas com coloração prateada na parte inferior. Suas flores são originadas das axilas das folhas em grupo ou isoladamente. Estas apresentam 5 pétalas e 5 sépalas brancas, 16-20 estames e 3-7 carpelos. Os frutos são pequenos, variando na forma de circular a oval. A polpa do fruto, juntamente com a casca, pode ser ingerida *in natura*. As suas sementes são poliembriônicas.

b) *Poncirus*: é descrito como gênero monoespecífico (*P. trifoliata*), caracterizado por apresentar folhas trilobadas, decíduas, cujos folíolos apresentam formato oval e tamanho similar. Os seus ramos podem apresentar internós maiores que o pecíolo ou internós curtos, apresentando espinhos foliáceos, os quais se desenvolvem de brotos

dormentes. Diferentes de outras espécies de citros, os brotos são escamosos, pronunciados e pubescentes, produzindo espinhos longos e finos na axila das folhas. A flor tem 5 pétalas, 5 sépalas e numerosos estames que curvam externamente da base do ovário. Os frutos consistem de 8-13 carpelos fundidos; este é pubescente e tem um gosto amargo devido à presença de poncidirim. As sementes são cheias, externamente enrugadas e apresentam muitos embriões.

c) *Microcitrus*: este gênero consiste de seis espécies de árvores de tamanho médio, apresentando flores, folhas e frutos considerados pequenos, quando comparados àqueles apresentados por outros gêneros do grupo C. As folhas são unilobadas, dimórficas, mudando de catáfilos muito reduzidos, presente em plantas jovens, para folhas pequenas de formato elíptico ou ovadas lateralmente, que são encontradas nas plantas maduras. O pecíolo é pequeno e a superfície superior da folha é pubescente. As folhagens jovens apresentam coloração arroxeadada. As flores, originadas na axila das folhas, possuem tamanho pequeno e apresentam 4-5 pétalas e sépalas, 10-20 estames fundidos e 4-8 carpelos contendo 4-8 óvulos por carpelo. As pétalas são brancas e apresentam coloração arroxeadada na sua base. Os frutos são pequenos e arredondados contendo considerável quantidade de gotas de óleo ácido. As sementes são pequenas e com o formato oval.

d) *Citrus*: este gênero é formado por 16 espécies, caracterizadas por apresentar árvores perenes. Os ramos das copas são angulares quando jovem, mudando para cilíndricos quando maduros. Algumas espécies, como limas e limões, apresentam numerosos espinhos, oriundos das axilas das folhas de plantas jovens. No entanto, esses são menos proeminentes nas árvores maduras. As folhas são unilobadas, cujo tamanho da lâmina foliar pode variar de muito grande (toranjas e pomelos), moderado (laranjas e limões) até pequeno (maioria das tangerinas). O tamanho do pecíolo também varia com a espécie, do mesmo modo que o tamanho da folha. As flores estão isoladas ou em grupo, originadas nas axilas das folhas, podendo ser perfeitas ou estaminadas. Geralmente as flores apresentam 4-5 sépalas, 4-8 pétalas, 20-40 estames ligados em feixes e 8-15 carpelos fusionados, normalmente contendo 4-8 óvulos. O estilete é maior que o ovário em flores perfeitas e tende a ser menor nas flores estaminadas. O fruto consiste de um único ovário de 8-15 carpelos fusionados, envolvido por uma

casca coriácea. A forma dos frutos varia de esferóide (laranjas), oblato (toranjas e tangerinas) a prolato (limões e limas). As vesículas de suco são pedunculadas e se ligam na parede dorsal do lóculo. Os septos carpelares são separados pelo endocarpo, que constitui um tecido branco denominado de albedo. A casca apresenta numerosas glândulas de óleo e a sua coloração pode variar de amarelo esverdeado (limas, limões e pomelos), laranja avermelhado (laranjas), laranja escuro ou mesmo vermelho alaranjado (tangerinas). As sementes apresentam formato que varia de obovóides a arredondado, podendo conter de um a vários embriões. A coloração apresentada pelos cotilédones varia de branca (laranjas e pomelos) a verde (tangerinas).

A taxonomia de *Citrus* é bastante complexa, tendo diferentes sistemas taxonômicos proposto um número variável de espécies para este gênero. Inicialmente ENGLER (1896), citado por SWINGLE & REECE (1967) descreveu seis espécies para *Citrus*, incluindo alguns representantes de gêneros afins como *Microcitrus*, *Fortunella* e *Poncirus*. No entanto, em 1931 ele aceitou que alguns destes fossem agrupados em gêneros distintos e descreveu 11 espécies para *Citrus*. Ainda em 1931 BURKILL tratou os gêneros relacionados como sendo subgêneros de *Citrus*, mas sua proposição não foi amplamente aceita. Mais recentemente MABBERLEY (1998) propôs a inclusão de gêneros como *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Citrus* num só gênero, devido à inconsistência dos caracteres diagnósticos utilizados para separação dos representantes destes gêneros.

O sistema de classificação proposto por SWINGLE (1943), um dos mais utilizados para *Citrus*, descreve 16 espécies distribuídas nos subgêneros *Citrus* (10 espécies) e *Papeda* (6 espécies). Num outro extremo, TANAKA (1977) propõe para este gênero a existência de 162 espécies, que estão distribuídas nas seções *papeda*, *limonellus*, *citrophorum*, *cephalocitrus* e *aurantium* do subgênero *Archicitrus* e nas seções *osmocitrus*, *acrumen* e *pseudofortunella* do subgênero *Metacitrus*. Atualmente, *C. medica*, *C. grandis*, *C. reticulata* e *C. halimii* tem sido consideradas como as verdadeiras espécies representantes do subgênero *Citrus* (STONE *et al.*, 1974; SCORA, 1975; BARRET & RHODES, 1976; SCORA, 1988), sendo que os demais representantes deste grupo são considerados híbridos naturais, originados do cruzamento entre as espécies básicas ou mesmo com a contribuição de representantes

Papeda, e têm sido mantidos de modo estável na natureza por apomixia facultativa (SCORA, 1975; BARRET & RHODES, 1976).

De acordo com a classificação de SWINGLE & REECE (1967), os representantes dos subgêneros *Papeda* e *Citrus* podem ser facilmente distinguidos com base nas características morfológicas de folhas, flores e frutos. Os *Papeda* são caracterizados por apresentar pecíolo alado muito grande, inflorescência pequena e frutos contendo vesículas que apresentam agregação de gotas de sabor acre, o que torna os frutos não palatáveis. Este subgênero é formado por seis espécies correspondentes a *C. celebica*, *C. micrantha*, *C. latipes*, *C. macrophthera*, *C. hystrix* e *C. ichangensis*. Os representantes do subgênero *Citrus*, por sua vez, apresentam folhas sem pecíolo ou com pecíolo estreito. As flores são largas, aromáticas e os estames são ligados em feixes. Os seus frutos apresentam vesículas contendo suco de sabor agradável, que varia de doce a ácido, geralmente sem gotas de óleo, ou quando presente se encontram em baixa concentração. Este subgênero é representado por *C. medica*, *C. grandis*, *C. reticulata*, *C. limon*, *C. paradisi*, *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. tachibana* e *C. indica*. Dentre os representantes do gênero *Citrus*, *C. ichangensis* apresenta caracteres intermediários entre os dois subgêneros, cujas folhas são característica de *Papeda* e as flores são semelhantes àquelas observadas nos representantes do subgênero *Citrus*.

Tabela 1: Representantes da subfamília Aurantioideae segundo a classificação de SWINGLE & REECE, 1967.

Tribo	Subtribo	Grupo subtribal	Gêneros
Clauseneae	Micromelinae		<i>Micromelum</i>
	Clauseninae		<i>Glycosmis</i> <i>Clausena</i> <i>Murraya</i> <i>Merrilia</i>
Citreae	Merriliinae		
	Triphasiinae	Grupo Wenzelia	<i>Wenzelia</i> <i>Monanthocitrus</i> <i>Oxanthera</i> <i>Merope</i>
		Grupo Triphasia	<i>Triphasia</i> <i>Pamburus</i>
		Grupo Luvunga	<i>Luvunga</i> <i>Paramignya</i>
	Citrinae	"Primitive Citrus Fruit Trees" - (Grupo A)	<i>Severinia</i> <i>Pleiospermium</i> <i>Burkillanthus</i> <i>Limnocitrus</i> <i>Hesperethusa</i>
		"Near-Citrus Fruit Trees" - (Grupo B)	<i>Citropsis</i> <i>Atalantia</i>
		"True Citrus Fruit Trees" - (Grupo C)	<i>Fortunella</i> <i>Poncirus</i> <i>Microcitrus</i> <i>Eremocitrus</i> <i>Clymenia</i> <i>Citrus</i>
			<i>Swinglea</i>
	Balsamocitrinae	Grupo Tabog	
		Grupo Bael-fruit	<i>Aegle</i> <i>Afraegle</i> <i>Aeglopsis</i> <i>Balsamocitrus</i>
		Grupo Wood-Apple	<i>Feronia</i> <i>Feroniella</i>

3. Diversidade genética de *Citrus*

A estrutura genética apresentada pelos táxons representantes de *Citrus* pode diferir de modo significativo, sendo observados diferentes níveis de heterozigosidade e de variabilidade intraespecífica (HERRERO *et al.*, 1996a). Esta diversidade é determinada pela associação de fatores como tipo de mutação, história de cultivo e principalmente o tipo de reprodução, apresentados por representantes deste gênero (SCORA, 1988). Uma grande compatibilidade sexual é observada entre representantes de níveis taxonômicos distintos, resultando no surgimento de híbridos interespecíficos e intergenéricos, que podem ocorrer de forma espontânea na natureza (SWINGLE, 1943).

A poliembria corresponde à outra peculiaridade da biologia reprodutiva deste grupo, que afeta a sua diversidade genética. Muito embora alguns dos seus táxons sejam monoembriônicos, a exemplo de *C. medica*, *C. grandis*, *C. clementina*, *C. tangerina*, *C. temple*, *C. nobilis* e *C. halimii*, a poliembria é característica da maioria dos seus representantes. Nesses casos, o produto da fertilização geralmente origina um embrião zigótico e uma quantidade variável de embriões de origem nucelar. Os embriões nucleares se desenvolvem a partir da multiplicação do tecido somático, localizado adjacente ao saco embrionário, originando indivíduos com a mesma constituição genética do parental materno (FROST & SOOST, 1968). Em alguns táxons pode ser observada uma desvantagem competitiva dos embriões zigóticos em relação aos nucleares (FROST & SOOST, 1968), contribuindo para a estabilização de formas híbridas ao longo do processo de evolução do grupo (SCORA, 1975; BARRET & RHODES, 1976).

Uma grande variação nas características morfológicas das folhas, flores e principalmente aquelas relacionadas aos frutos podem ser observada em *Citrus* (SWINGLE & REECE, 1967). O fruto maduro pode apresentar formato oblato, ovóide e mesmo piriforme e uma variação no tamanho, com diâmetro que vai de 2 até 30 cm. A coloração da casca pode variar de amarela a verde, apresentada pelas limas, até a vermelha alaranjada, apresentada pelas tangerinas. Muito embora o fenômeno da poliploidia apresente particular importância na evolução das plantas superiores, respondendo por parte da sua variabilidade (STEBBINS, 1950), *Citrus* é representado

predominantemente por indivíduos diplóides, podendo ser observada a ocorrência espontânea de indivíduos triplóides e tetraplóides, bem como variações cromossômicas estruturais dos tipos inversão e translocação (IWAMASA & NITO, 1988). No entanto, as mutações gênicas são consideradas como responsáveis por parte significativa da variação observada em espécies comerciais, cuja propagação é predominantemente vegetativa (HODGSON, 1969; FANG & ROOSE, 1997).

A hibridação parece ser a maior causa da variação das espécies de *Citrus* (HERRERO *et al.*, 1996a). Dados morfológicos e moleculares sugerem que grande parte dos representantes desse gênero são híbridos naturais (BARRET & RHODES, 1976; FEDERICI *et al.*, 1998). GUERRA (1993), através de estudos com bandejamento cromossômico, observou que *C. sinensis*, *C. medica*, *C. limon*, *C. limonia*, *C. grandis* e *C. aurantium* apresentaram pelo menos um par de cromossomos em heterozigose. HERRERO *et al.* (1996 a) estudando a diversidade genética com base na análise de isoenzimas, revelou que a heterozigosidade apresentada por representantes de *Citrus* é bastante variável. Um elevado grau de heterozigosidade foi observado nos representantes do grupo dos limões (*C. limon*, *C. meyeri*, *C. karna*, *C. volkameriana*), limas (*C. limettoides*, *C. aurantifolia* e *C. latifolia*) e *C. bergamia*. Os representantes de *C. sinensis*, *C. clementina*, *C. tangerina*, *C. temple* e alguns representantes do subgênero *Papeda* (*C. hystrix*, *C. ichangensis* e *C. macroptera*), apresentaram heterozigosidade média. Uma pequena heterozigosidade foi observada em *C. aurantium*, *C. halimii*, *C. tachibana*, *C. paradisi* e *C. deliciosa*, reduzindo gradualmente para os táxons *C. medica*, *C. grandis*, *C. unshiu*, *C. sunki* até chegar em um nível mínimo apresentado por *C. reshni* (HERRERO *et al.*, 1996a). Esta variação no grau de heterozigosidade se deve ao processo de multiplicação desses táxons, sendo geralmente observada uma maior heterozigosidade em táxons de origem híbrida cuja propagação se dá através de clones apomíticos ou por multiplicação vegetativa, o que permite estabilizar tais genótipos. Os táxons propagados predominantemente pela reprodução sexuada e com baixa taxa de poliembrionia apresentam um menor grau de heterozigosidade.

As tangerinas correspondem ao grupo de maior diversidade genética dentre as espécies comerciais de *Citrus*. SWINGLE (1943) trata as tangerinas, com exceção de

C. tachibana e *C. indica*, como representantes de *C. reticulata*. Para TANAKA (1954), as tangerinas são representadas por 36 espécies que podem ser organizadas em cinco grupos diferentes: Grupo I - *C. nobilis* Lour, *C. unshiu* Marc. e *C. yatsushiro* Hort. Ex Tanaka; Grupo II - com espécies de menor importância econômica (*C. keraji*, Hort. ex Tanaka, *C. oto* Hort. ex Yuishiro e *C. toragayo* Hort. ex Yuishiro); Grupo III - com 14 espécies incluindo *C. reticulata* (tipo 'Ponkan'), *C. deliciosa*, *C. clementina* e *C. tangerina* (tipo 'Dancy'). Grupo IV - inclui *C. reshni* ('Cleopatra'), *C. sunki* e *C. tachibana* (Mak.); Grupo V - inclui espécies como *C. depressa* e *C. lycopersicaeformis*.

Para HODGSON (1969), as tangerinas economicamente importantes representam quatro espécies: *C. unshiu* ('Satsuma'), *C. reticulata* ('Ponkan', 'Dancy' e 'Clementina'), *C. deliciosa* Tenore (Mexiricas) e *C. nobilis* Loureiro ('King'). A ampla diversidade genética apresentada pelas tangerinas tem sido confirmada pelo emprego das mais variadas técnicas de análise molecular, como isoenzimas (BALLVÉ *et al.*, 1991; HERRERO *et al.*, 1996), RAPD (COLETTA FILHO *et al.*, 1998; FEDERICI *et al.*, 1998), RFLP (FEDERICI *et al.*, 1998) e microsatélite (FANG & ROOSE, 1997; FANG *et al.*, 1998).

Outros representantes do subgênero *Citrus*, a exemplo das laranjas doce (*C. sinensis*), limão (*C. limon*), limas (*C. aurantifolia*) e pomelos (*C. paradisi*), correspondem a híbridos naturais e têm sido amplamente cultivados pelo homem. A história de cultivo destes grupos é caracterizada pela ação da seleção artificial, associada à propagação vegetativa. *C. sinensis* tem sua diversidade atribuída à ocorrência de mutações gênicas, que resultaram em modificações em caracteres agrônômicos como características do fruto (HODGSON, 1969). De modo similar, cultivares de *C. paradisi* apresentam uma base genética restrita, cujos representantes foram originados por sucessivos eventos de mutação, ocorridos a partir de uma mesma árvore ancestral (GMITTER, 1995). FANG & ROOSE (1997), utilizando marcadores microsatélites (SSR) observaram uma restrita diversidade genética para *C. sinensis* e *C. paradisi* em relação a *C. limon*. Poucas bandas polimórficas foram obtidas (no máximo 4), num universo de 1.230 marcadores SSR analisados, para separar 41 cultivares de *C. sinensis*. Por sua vez o grupo das tangerinas foi quem apresentou maior diversidade genética, sendo observadas bandas polimórficas com todos os 22 iniciadores testados para este grupo.

4. Relações filogenéticas de *Citrus* e gêneros afins

Conflitos têm sido observados quanto à taxonomia e filogenia da subfamília Aurantioideae (SWINGLE & REECE, 1967). Características como forma de cultivo, ampla compatibilidade sexual e a poliembrião, associadas aos distúrbios no *habitat* natural, respondem pela complexidade filogenética e taxonômica observada em *Citrus* (SCORA, 1988).

SWINGLE & REECE (1967) classificaram *Citrus* como representante do grupo "árvores de citros verdadeiros" (grupo C), juntamente com outros cinco gêneros da subfamília Aurantioideae. Estudos com base na análise de cpDNA (SAMUEL *et al.*, 2001), bandeamento cromossômico e quantidade de heterocromatina (GUERRA *et al.*, 2000), sugerem que esse grupo seja monofilético. A afinidade genética deste grupo é revelada pela grande compatibilidade sexual (IWAMASA *et al.*, 1988) e pela similaridade observada entre esses táxons, quando são analisados os dados morfológicos (BARRET & RHODES, 1976), isoenzimáticos (RAHMAN *et al.*, 1994; HERRERO *et al.*, 1996 b) e genômicos (IWAMASA & NITO, 1988; FEDERICI *et al.*, 1998; GUERRA *et al.*, 2000). Uma clara associação é observada entre *Poncirus*, *Fortunella*, *Citrus* e *Microcitrus* (HERRERO *et al.*, 1996 b), sendo sugerida uma maior afinidade genética entre *Fortunella* e o grupo das laranjas-tangerinas, e entre *Microcitrus* e o complexo cidra-lima-limão (HERRERO *et al.*, 1996 b; FEDERICI *et al.*, 1998). *Poncirus* se apresenta como táxon mais divergente dentre esses quatro gêneros (HERRERO *et al.*, 1996 b).

De acordo com a classificação proposta por SWINGLE & REECE (1967), os representantes de *Citrus* podem ser agrupados em dois subgêneros distintos (*Papeda* e *Citrus*). TANAKA (1969a) sugere que os representantes do subgênero *Papeda* tenham originado as limas que, por sua vez, deram origem ao complexo cidra-limão e às toranjas. As laranjas teriam surgido posteriormente, a partir das toranjas (*C. grandis*).

Atualmente, a origem da maioria das espécies de *Citrus* é considerada como resultado de hibridação natural. *C. medica*, *C. grandis* e *C. reticulata*, consideradas como espécies autênticas do subgênero *Citrus*, compõem a base da formação das "espécies" comerciais de citros (SCORA 1975; BARRET & RHODES 1976). A

ocorrência de introgressão de outros gêneros na formação desses táxons também tem sido sugerida. *Microcitrus* estaria envolvido na formação de *C. aurantifolia* (BARRET & RHODES 1976), enquanto que representantes de *Fortunella* estariam envolvidos na origem de *C. madurensis* Lour (SINGH & NATH, 1969) e *C. microcarpa* Bunge (SWINGLE & REECE 1967).

Os cruzamentos propostos para a origem de algumas das espécies cultivadas de *Citrus* são os seguintes:

a) *C. grandis* x *C. reticulata* para *C. sinensis* (SWINGLE & REECE, 1967; SCORA, 1975; BARRET & RHODES, 1976);

b) *C. grandis* x *C. reticulata* para *C. aurantium* (SWINGLE & REECE, 1967; SCORA, 1975; BARRET & RHODES, 1976);

c) *C. limon* ou *C. medica* x *C. reticulata* para *C. jambhiri* (SWINGLE & REECE, 1967; BARRET & RHODES, 1976);

d) cidra x lima x espécie não identificada (MALIK *et al.*, 1974), *C. medica* x lima ou limão rugoso (HODGSON, 1969) ou *C. aurantium* x *C. medica* para *C. limon* (NICOLSI *et al.*, 2000; GULSEN & ROOSE, 2001);

e) *C. grandis* x *C. sinensis* para *C. paradisi* (SWINGLE & REECE, 1967; SCORA, 1975);

f) *C. medica* x *C. grandis* x *Microcitrus* (BARRET & RHODES, 1976) ou *C. medica* x *Citrus* spp subg. *Papeda* (TORRES *et al.*, 1978) para *C. aurantifolia*;

g) *C. limon* ou *C. medica* x *C. reticulata* (SWINGLE & REECE, 1967; BARRET & RHODES, 1976) para *C. jambhiri*;

h) *C. medica* x lima (HODGSON, 1967) ou *C. medica* x limão rugoso (HODGSON, 1967) para *C. limonia*;

i) *C. medica* x *C. aurantium* (DENG *et al.*, 1996; NICOLSI *et al.*, 2000) para *C. volkameriana*.

4.1. Filogenia inferida a partir de dados controlados pelo núcleo celular

Estudos de similaridade têm sido utilizados para inferir as relações de afinidade em *Citrus*. A análise de dados controlados predominantemente pelo genoma nuclear

tem apoiado a hipótese de que três espécies, correspondendo a *C. medica*, *C. grandis* e *C. reticulata*, constituem a base da origem das “espécies” comerciais desse gênero.

BARRET & RHODES (1976) analisando dados morfológicos, e POTVIN *et al.* (1983), utilizando dados bioquímicos, sugeriram a existência de dois grupos dentro do subgênero *Citrus*. Um grupo maior, correspondendo às laranjas-tangerinas, formado por *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. grandis* e *C. paradisi*, enquanto o outro grupo, representando o complexo cidra-lima-limão, formado por *C. medica*, *C. aurantifolia* e *C. limon*.

HERRERO *et al.* (1996b) analisando 10 sistemas isoenzimáticos, observaram a formação de dois agrupamentos que corresponderiam aos grupos laranjas-tangerinas e o das cidras-limas-limões-pomelos. FEDERICI *et al.* (1998), analisando padrões de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), verificaram a formação de um grupo com representantes de cidras, limas e limões e outro envolvendo representantes das tangerinas e laranjas. Uma maior similaridade genética tem sido sugerida para *C. grandis* e alguns representantes do subgênero *Papeda* (HERRERO *et al.*, 1996b; FEDERICI *et al.*, 1998).

NICOLOSI *et al.* (2000) estudando as relações de representantes de *Citrus* e gêneros afins com base na análise de marcadores moleculares do tipo SCAR (*sequence-characterized amplified regions*) e RAPD, detectaram a existência de oito grupos que se distribuiriam da seguinte forma: 1) Grupo das cidras - *C. medica*, *C. aurantifolia*, *C. macrophylla*, *C. limon*, *C. bergamia*, *C. limettioides*, *C. jambhiri*, *C. limonia* e *C. volkameriana*; 2) Grupo das tangerinas – *C. tachibana* e *C. reticulata* num primeiro subgrupo e *C. paradisi*, *C. aurantium*, *C. sinensis* e *C. yunos* num segundo subgrupo; 3) Grupo das toranjas – *C. grandis* e *C. celebica* ; 4) Grupo ichang – *C. ichangensis*; 5) Grupo fortunella – *Fortunella margarita* e *C. indica*; 6) Grupo Micrantha – *C. hystrix*, *C. micrantha*, *C. macroptera* e *C. latipes* (todos representantes do subgênero *Papeda*); 7) Grupo Poncirus – *Poncirus trifoliata*; e 8) Grupo Microcitrus – *M. australis* e *Eremocitrus glauca*.

4.2. Filogenia inferida com base em dados de origem citoplasmática

A análise de dados de origem mitocondrial e de cloroplasto sugere grupos de afinidade citoplasmática para *Citrus*, separando *C. grandis*, *C. reticulata* e *C. medica* em grupos distintos, e corrobora a hipótese dessas espécies comporem a base da formação de híbridos naturais representantes do subgênero *Citrus* (GREEN *et al.*, 1986, HANDA *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1993; NICOLSI *et al.*, 2000).

GREEN *et al.* (1986) analisando o genoma de cloroplasto por RFLP, observaram grande similaridade entre *C. grandis*, *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. limon* e *C. paradisi*, que por sua vez, apresentaram maior divergência em relação ao padrão apresentado por *C. medica* e *C. reticulata*. YAMAMOTO *et al.* (1993), analisando dados de RFLP de genoma mitocondrial, verificaram a formação de dois grupos distintos que corresponderiam ao grupo das toranjas e grupo das tangerinas. O grupo das tangerinas foi formado por representantes de *C. reticulata*, *C. tachibana* (SWINGLE 1943) e tangores (*C. sinensis* x *C. reticulata*). O grupo das toranjas foi dividido no subgrupo toranja (*C. grandis*, *C. paradisi*, *C. sinensis*, *C. aurantium* e *C. limon*) e no subgrupo Yuzu (representantes *Citrus* subg. *Papeda*, *Fortunella* e *C. aurantifolia*). Tanto *C. medica* quanto *P. trifoliata* apresentaram ampla divergência citoplasmática em relação a estes dois grupos (YAMAMOTO *et al.*, 1993).

As informações oriundas de análises de proteína e DNA de cloroplasto (HANDA *et al.*, 1986; NICOLSI *et al.*, 2000) e do DNA mitocondrial (YAMAMOTO *et al.*, 1993) sugerem que *C. medica* apresente ampla divergência em relação aos outros representantes de *Citrus*, mesmo em relação a gêneros relacionados como *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* e *Microcitrus*.

5. Evolução molecular

A evolução dos organismos está diretamente relacionada com a plasticidade de seu genoma. A célula vegetal contém genomas de origem nuclear, mitocondrial e de cloroplasto, cujo padrão de evolução é peculiar. As variações no número de cromossomos do núcleo celular, bem como os arranjos e duplicações dos seus genes

são particularmente importante na evolução de plantas superiores (STEBBINS, 1950; WALBOT & CULLIS, 1985). Variações no padrão de evolução são observadas ao analisar diferentes setores de um mesmo genoma, sendo observada uma menor taxa de mutação em regiões de codificação de genes em relação àquelas regiões desprovidas de função gênica. Do mesmo modo, variações nas taxas de mutação são observadas dentro da região de codificação de polipeptídios, sendo as mutações de ponto do tipo substituição menos freqüentes na segunda base do códon em relação à taxa de mutação observada na primeira e terceira base (WALBOT & CULLIS, 1985; LI, 1997; JUDD *et al.*, 1999).

5.1.Genoma nuclear

A maior parte das informações genéticas das células vegetais está localizada no núcleo. Os representantes de *Citrus* apresentam um conjunto básico de cromossomo $x=9$, geralmente diplóides, sendo relatada a existência de poucos indivíduos triplóides e tetraplóides (IWAMASA & NITO, 1988). Esses cromossomos apresentam regiões de eucromatina, formada por DNAs pouco ou medianamente repetitivo, geralmente envolvidos com a expressão gênica, e por regiões heterocromáticas, compostas por DNAs altamente repetitivo. Na subfamília Aurantioideae foi observado um aumento na quantidade de heterocromatina, sendo este caráter considerado como apomórfico para o referido grupo de plantas. Uma elevada concentração de heterocromatina foi observada em táxons avançados (>10%), como aquelas observadas nos representantes do grupo subtribal C, tendo *Citrus* apresentado valor em torno de 28,71% (GUERRA *et al.*, 2000).

5.2. Plastoma

O DNA do cloroplasto (cpDNA) corresponde a uma molécula circular, localizada no interior dos cloroplastos, existentes no citoplasma de vegetais superiores. O padrão de herança apresentado por esta organela nas angiospermas é predominantemente uniparental (BOBLENZ *et al.*, 1990; PALMER, 1992; WAGNER, 1992; DONG &

WAGNER, 1994), muito embora também seja observado padrão de herança biparental (MEDGYESY *et al.*, 1986; SMITH, 1989; MASON *et al.*, 1994). Uma grande variação é observada tanto no número de cloroplastos, apresentado por célula vegetal (30 a 500), quanto no número de moléculas de DNA existente por organela (20 a 200) (PALMER, 1987). Esse genoma vem sendo bastante empregado em estudos de filogenia, devido à estabilidade estrutural, padrão de herança e taxa de mutação, que lhes são peculiares. Uma grande estabilidade é observada tanto na estrutura e organização dos seus genes quanto no tamanho deste genoma, sendo observado para a maioria das plantas um tamanho que pode variar de 135 a 160 kb (OLMSTEAD & PALMER, 1994; JUDD *et al.*, 1999).

Em *Citrus*, este genoma apresenta um tamanho estimado de 166 kb (GREEN *et al.*, 1986). O genoma dos cloroplastos de tabaco foi totalmente seqüenciado, apresentando 155,844 kb que encerra cerca de 113 genes. Esse genoma apresenta 21 proteínas ribossomais; 4 rRNAs; 30 tRNAs; 4 subunidades de RNA polimerase; 1 fator de início de tradução; 1 suposto intron maturase; 29 genes para funções fotossintéticas e 10 ORFs conservadas, com função desconhecida. Os genes presentes no cpDNA de arroz, uma monocotiledônea são similares aos encontrados no cpDNA de tabaco, uma dicotiledônea.

5.3. Condrioma

A mitocôndria vegetal apresenta como material genético um conjunto de moléculas de DNA (mtDNA), de formato circular, que apresentam grande variação no tamanho e na estrutura dos genes. O padrão de herança apresentado por esta organela é predominantemente materno, podendo também ser observado herança paterna e biparental em alguns grupos de plantas (ERICKSON *et al.*, 1989; ERICKSON & KLEMBLE, 1990; HAVEY, 1997).

O genoma mitocondrial dos vegetais superiores exibe uma elevada plasticidade genotípica. Eventos de recombinação homóloga que ocorrem entre seqüências repetidas, resultando em rearranjos, duplicações e deleções, respondem por parte da variação no tamanho (218 a 2.500 kb) e na estrutura desses genomas (WALBOT &

CULLIS, 1985; PALMER, 1992). Tais diferenças podem ser observadas mesmo em relação a táxons proximamente relacionados. PALMER (1992) ao analisar seis espécies de *Brassica*, observou que o tamanho do genoma mitocondrial variou de 208 a 257 kb, e que ocorreram variações na localização dos genes, mesmo quando foram comparadas espécies proximamente relacionadas como *B. campestris* e *B. oleracea*. Por sua vez, a análise do cpDNA deste mesmo grupo de plantas revelou a mesma ordem dos genes e aproximadamente o mesmo tamanho do genoma (151 kb).

Em contrapartida à rápida evolução estrutural apresentada pelo mtDNA de plantas, a taxa de evolução com base na alteração de nucleotídeos ao longo desta molécula é lenta. Este DNA apresenta uma menor taxa de mutação pontual não sinônima, quando comparada com aquelas apresentadas pelo mtDNA animal (cerca de 40 a 100 vezes) e cpDNA (cerca de 3 a 4 vezes) (LI, 1997). Devido às características da estrutura e da taxa de mutação apresentada pelo genoma mitocondrial de plantas, a sua aplicação é pouco utilizada em estudos filogenéticos (PALMER, 1992). Esse genoma tem sido empregado em estudos de genética de populações e hibridação (DONG & WAGNER, 1994).

O seqüenciamento do mtDNA de *Marchantia polymorpha* revelou que este apresenta 186,608 kb possuindo em torno de 94 genes em potencial: 3 rRNA, 29 genes de tRNA, 30 ORFs de proteínas de função conhecida e 32 ORFs de função ainda não conhecida.

6. Análise filogenética

Atualmente os estudos filogenéticos têm sido amplamente debatidos por duas correntes de pensamento, que correspondem à sistemática filogenética (cladística), e a sistemática fenética ou taxonomia numérica (fenética). A cladística se baseia na evolução do caráter, analisando os passos de transformação por ele sofrido, o que permite inferir ascendência comum entre táxons aparentados. A fenética, por sua vez, infere as relações de parentesco através da análise de distância, avaliando o grau de similaridade apresentada entre táxons terminais, com base na análise simultânea de múltiplos caracteres. A mesma filogenia pode ser inferida a partir de ambas análises,

quando o padrão de evolução se mantém constante após o momento da divergência entre os táxons. No entanto, alterações no padrão de evolução podem induzir inferências que não refletem a verdadeira filogenia entre grupos de organismos, podendo caracteres semelhantes ter origens ancestrais distintas (AMORIM, 1997; LI, 1997).

A cladística foi desenvolvida na década de 40 por HENNING. Este tipo de análise se baseia na identificação de grupos monofiléticos, definidos quando táxons terminais compartilham caracteres derivados (sinapomorfias). Considera-se, portanto, que o caráter derivado (apomórfico) tenha sido transferido por herança, a partir de um ancestral comum mais recente em relação aos táxons terminais analisados. No entanto, nem todo caráter derivado permite inferir relação de parentesco. As autapomorfias correspondem a caracteres derivados apresentados por apenas um táxon terminal, não sendo utilizados para inferir a sua relação filogenética com outros táxons do grupo. Além disto, caracteres derivados similares podem ser apresentados por táxons não relacionados por descendência (homoplasias), podendo, deste modo, gerar grupos polifiléticos. O método utilizado para resolver tais incongruências corresponde ao critério da máxima parcimônia, que leva em consideração o menor número de passos de transformação do caráter e indica o grau de homoplasia verificado na árvore gerada. As árvores com menor número de passos de transformação e com um menor grau de homoplasia são consideradas como aquelas que melhor representam a verdadeira filogenia do grupo analisado (HENNING, 1966; AMORIM, 1997).

As homoplasias observadas em uma análise filogenética podem ser resultantes de convergência, paralelismo ou reversão. A convergência ocorre quando caracteres de origens independentes evoluem para um mesmo estado de caráter. Na reversão, um caráter no estado derivado pode ser transformado para o estado ancestral, seguindo o sentido inverso do processo de evolução em relação a este passo de transformação. No paralelismo os caracteres de ramos evolutivos independentes, evoluem a partir de uma mesma condição ancestral, resultando em condição apomórfica semelhante (AMORIM, 1997).

O método da parcimônia minimiza o efeito das homoplasias. Dentre estes, os mais utilizados são os métodos de Fisher e o de Wagner. Eles não impõem restrição às

transformações do caráter, admitindo a ocorrência de convergências, reversões ou paralelismo. A diferença entre estes tipos de parcimônia é que, no critério de Fisher, é pressuposta uma ordenação rígida no processo de transformação de caracteres multiestado, atribuindo-se custos distintos às diferentes transformações ocorridas. Já na parcimônia de Wagner, nenhuma sequência de transformação é pressuposta na evolução do caráter multiestado, sendo considerado o mesmo custo evolutivo para qualquer transformação, independentemente dos estados do caráter envolvido. Outros critérios de parcimônia são mais restritivos quanto às homoplasias consideradas. A parcimônia de Dollo desconsidera a ocorrência de convergência como forma de homoplasia, admitindo, no entanto, a ocorrência de reversões (Dollo). De modo contrário, o modelo de parcimônia proposto por Camim & Sokal considera a evolução irreversível, não admitindo reversões, muito embora considere a ocorrência de convergências e paralelismo (AMORIM, 1997).

7. Filogenia molecular

Estudos filogenéticos têm sido realizados utilizando-se tanto dados morfológicos quanto moleculares. Atualmente a análise de macromoléculas, em especial do DNA, vem sendo amplamente utilizada para este fim, numa nova linha de pesquisa denominada de sistemática molecular. Isto se deve em grande parte ao fato do DNA corresponder ao próprio material hereditário, cujos dados têm sido gerados de forma rápida e em grande quantidade, frente aos recentes avanços tecnológicos na área de biologia molecular (LI, 1997; JUDD *et al.*, 1999).

O DNA apresenta dois tipos básicos de alterações como fonte de informações para análises filogenéticas, que correspondem à mutação de ponto do tipo substituição e a ocorrência de intervalos na sua sequência de nucleotídeos ("gap"), que alteram o comprimento da molécula de DNA, resultado de eventos de inserção, deleção e duplicação. As mutações pontuais do tipo substituição apresentam grande importância nos estudos filogenéticos, sendo observado um baixo grau de homoplasias nas árvores filogenéticas obtidas a partir da sua análise. Estas mutações podem ser classificadas como transições e transversões. As transições correspondem à substituição de uma

purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina, enquanto que as transversões correspondem à troca de uma pirimidina por uma purina ou vice-versa. Na construção dos cladogramas, geralmente são dados pesos distintos para eventos de transversões e transições, uma vez que as transversões apresentam maior custo evolutivo, sendo menos freqüente a ocorrência deste tipo de mutação de ponto, em relação às transições. A outra fonte de informações, correspondente aos "gaps", é originada durante a replicação do DNA por erro de pareamento, recombinação desigual ou quebra de região poliT. As árvores filogenéticas obtidas a partir da análise desta fonte de informação, geralmente apresentam um aumento da homoplasia, sendo, portanto, menos utilizadas em estudos filogenéticos (LI, 1997).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Inferir a filogenia de *Citrus* e gêneros afins com base na análise do mtDNA e cpDNA, admitindo-se o sistema taxonômico proposto por SWINGLE & REECE (1967).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar regiões citoplasmáticas que permitam avaliar as relações filogenéticas em *Citrus* e gêneros afins
- Confrontar os dados de mitocondria e cloroplasto para as relações citoplasmáticas entre *Fortunella* e *Citrus*
- Inferir as relações filogenéticas de *Citrus* e gêneros afins com base na análise do cpDNA.

CAPÍTULO 1

FILOGENIA DE *Citrus* INFERIDA A PARTIR DA EVOLUÇÃO DAS REGIÕES trnL(UAA)- trnF(GAA) E trnT(UGU)- trnL(UAA) DE cpDNA

Filogenia de *Citrus* inferida a partir da evolução das regiões trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT(UGU) - trnL(UAA) de cpDNA

Edson Freitas de Araújo¹ & Marcos Antônio Machado². 1. *Universidade Estadual de Feira de Santana, Dpto. de Ciências Biológicas. Km 03, BR 116, Campus. 44031-460, Feira de Santana/BA/Brazil. E-mail: efa@mail.uefs.br* 2. *Centro de APTA Citricultura Sylvio moreira, C.P. 04, CEP 13490-970, Cordeirópolis/SP/Brazil. E-mail: marcos@centrodecitricultura.br*

1. RESUMO

A relação filogenética de 28 táxons da subfamília Aurantioideae foi inferida com base em 27 eventos informativos das regiões trnL(UAA) -trnF(GAA) e trnT (UGU) - trnL (UAA). Não houve sustentação para alguns táxons propostos pelo sistema de classificação de SWINGLE & REECE (1967). As subtribos Triphasiinae, Balsamocitrinae e Citrineae se apresentaram numa politomia basal, não sendo confirmada a condição monofilética para esses grupos. Dentro da tribo Citreae foi sustentada apenas a condição monofilética para o grupo subtribal C ("True Citrus Fruit Trees"), representado nesse trabalho por *Microcitrus*, *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*. Nesse clado, *C. medica* se apresentou separado de outras espécies de *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, indicando uma condição não monofilética para *Citrus*. Os demais representantes deste gênero formaram um clado, não sendo sustentada a separação nos subgêneros *Papeda* e *Citrus*. Um modelo de evolução foi proposto para a molécula trnL(UAA) - trnF(GAA), com base em três eventos de duplicação, sugerindo linhas evolutivas que separam *C. grandis*, *C. medica* e *C. reticulata*. Um padrão de evolução reticulado está sendo proposto para *C. medica*, através de possível introgressão de outro gênero na formação desta espécie.

2. INTRODUÇÃO

Citrus é classificado como representante do grupo subtribal arvores de citros verdadeiros ("true citrus fruit trees"), subtribo Citrinae, tribo Citreae, subfamília Aurantioideae (=Citroideae) da família Rutaceae (SWINGLE & REECE 1967). A condição monofilética de Rutaceae e da subfamília Aurantioideae tem sido sustentada pela análise de dados morfológicos e moleculares (CHASE *et al.*, 1999; JUDD *et al.*, 1999; SAMUEL *et al.*, 2001). No entanto, estudos filogenéticos têm questionado a condição natural de alguns dos táxons apresentados pelo sistema de classificação mais amplamente aceito para Aurantioideae, proposto por SWINGLE & REECE (1967) (DA SILVA *et al.*, 1988; KONG *et al.*, 1988; WATERMAN, 1990; GUERRA *et al.*, 2000; SAMUEL *et al.*, 2001).

Citrus corresponde ao grupo de maior importância econômica dentre os representantes de Rutaceae (CHAPOT, 1975). Este gênero apresenta uma grande diversidade genética e uma acentuada complexidade taxonômica devido aos frágeis limites reprodutivos observado entre as espécies que o compõe, associado à apomixia facultativa e a ação antrópica, que por sua vez burlou os limites geográficos no curso natural de dispersão do grupo, através de sua ampla exploração comercial nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (CHAPOT, 1975; SCORA, 1975, 1988; IWAMASA *et al.*, 1988; HERRERO *et al.*, 1996).

Diferentes sistemas taxonômicos propuseram a existência de 11 (ENGLER, 1931) e até mesmo 162 (TANAKA, 1977) espécies para *Citrus*. O sistema de classificação de SWINGLE (1943) divide este gênero nos subgêneros *Papeda* (seis espécies) e *Citrus* (10 espécies). No entanto quatro espécies alopátricas, *C. halimii*, *C. medica*, *C. grandis* e *C. reticulata*, têm sido propostas como as autênticas representantes do subgênero *Citrus* (SCORA, 1975, 1988; BARRET & RHODES, 1976). Os demais táxons deste subgênero corresponderiam a híbridos naturais, originados pelo cruzamento entre estas espécies, ou mesmo com a contribuição de representantes do subgênero *Papeda*, mantidos geneticamente estáveis ao longo do curso evolutivo do grupo por apomixia facultativa (SCORA, 1975; BARRET & RHODES, 1976). Tal hipótese tem sido sustentada pela mais variada fonte de dados (HANDA & OOGAKI,

1985; GREEN *et al.*, 1986; HANDA *et al.*, 1986; ROOSE, 1988; OLLITRAULT, 1990; LURO *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1993).

Diferentes graus de variabilidade genética e heterozigosidade são observados nos representantes de *Citrus*, tendo a hibridação importante papel neste processo (HERRERO *et al.*, 1996a). A diversidade genética em *Citrus* tem sido avaliada com base em dados morfológicos (BARRET & RHODES, 1976), isoenzimáticos (HERRERO *et al.*, 1996b), bioquímicos (POTVIN *et al.*, 1983) e genômicos (GREEN *et al.*, 1986; LURO *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1993; FANG & ROOSE, 1997; FANG *et al.*, 1998; FEDERICI *et al.*, 1998), que tem sido utilizados para inferir as relações de parentesco entre representantes de *Citrus* e gêneros afins com base em análise fenética. No entanto estudos fenéticos podem não refletir a similaridade herdada por descendentes comuns (PALMER *et al.*, 1988).

Estudos filogenéticos têm sido realizados pela análise direta da seqüência primária de regiões específicas do cpDNA, empregando-se o método da máxima parcimônia (OLMSTEAD & PALMER, 1994). A caracterização destas regiões revela que uma maior taxa de evolução pode ser observada em setores não codificantes do cpDNA, resultando em duplicações e eventos de inserção/deleção, que respondem por parte significativa da divergência observada em análises intra e intergenérica (GIELLY & TABERLET, 1994). Tal abordagem foi empregada na análise filogenética da subfamília Aurantioideae (SAMUEL *et al.*, 2001), apresentando, no entanto, pouca ênfase para *Citrus*. Muito embora estudos filogenéticos de *Citrus* tenham utilizado o cpDNA (YAMAMOTO *et al.*, 1993; NICOLOSI *et al.*, 2000; GULSEN & ROOSE, 2000), a exploração dessa fonte de dados (duplicação e inserção/deleção), não têm sido utilizada de forma abrangente em *Citrus*. Neste trabalho foram analisadas as relações existentes entre representantes de *Citrus* e gêneros afins, através do sequenciamento das regiões trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT (UGU) - trnL (UAA) do genoma de cloroplasto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal - Foram analisados 37 representantes da subfamília Aurantioideae, sendo 36 destes coletados no banco ativo de germoplasma de *Citrus* do Centro de

APTA Citricultura Sylvio Moreira (CCSM-IAC), em Cordeirópolis-SP e um oriundo do Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF-EMBRAPA), em Cruz das Almas-Ba (Tabela 1). As amostras de folhas foram coletadas dos representantes de *Murraya*, *Merrilia*, *Triphasia*, *Severinia*, *Atalantia*, *Feroniella*, *Aegle*, *Hesperethusa*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus* e *Citrus*, sendo liofilizadas e armazenadas em câmaras frias para posterior extração de DNA total.

Os representantes da tribo Citreae foram incluídos na análise como grupo interno, enquanto que os gêneros *Murraya* e *Merrilia*, representantes da tribo Clauseneae, foram utilizados como grupo externo, na polarização das árvores geradas. Os representantes do grupo “árvores de citros verdadeiros” foram o objeto principal deste estudo.

Extração de DNA total - O DNA total foi isolado de folhas de acordo com metodologia descrita por MURRAY & THOMPSON (1980), modificada por MACHADO *et al.* (1996). A qualidade e quantidade do DNA extraído foram determinadas como descrito por SAMBROOK *et al.* (1989).

Amplificação dos segmentos intergênicos - A amplificação foi realizada segundo procedimento descrito por SAMBROOK *et al.* (1989), utilizando-se como iniciadores as seqüências 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' e 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3' para a região trnL(UAA)-trnF(GAA) e 5'-TCTACCGATTTCGCCATATC-3' e 5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3' para a região trnT(UGU)-trnL(UAA) (TABERLET *et al.*, 1991). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µl contendo 15 ng de DNA “genômico”, 0,25 mM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 25 ng de cada iniciador, 2 unidades de *Taq* DNA Polimerase e um volume de água MiliQ estéril suficiente para completar o volume final da reação. A reação foi realizada inicialmente com a desnaturação do DNA por dois minutos a 94°C, seguida de 33 ciclos de amplificação de 1 min a 94°C, 1 min na temperatura de anelamento e 1,5 min a 72°C. Foi realizado um tempo de extensão final de 10 min a 72°C. A temperatura de anelamento utilizada foi 60°C para região trnL(UAA) - trnF(GAA) e 57°C para trnT(UGU) - trnL(UAA). A reação de amplificação foi realizada em um termociclador MJ Research modelo PTC-100TM. O produto da amplificação, que para as duas regiões estudadas correspondem a presença de uma banda de

aproximadamente 1 kb, foi analisado aplicando-se uma alíquota de 5 µl da reação, em um gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM EDTA), corado com 0,1 mg/ml de brometo de etídeo. O produto da reação foi precipitado com acetato de sódio e etanol e posteriormente seqüenciado via dideoxi-terminator, em um seqüenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer). Somente seqüências com qualidade > 20 avaliada pelo software CONSED foram consideradas.

Análise dos dados - As seqüências obtidas foram inicialmente alinhadas com auxílio do programa Clustal V, realizando o alinhamento de forma manual quando necessário. Foram utilizadas na análise apenas as regiões que apresentaram boa qualidade, eliminando trechos terminais das seqüências que poderiam resultar em erro de leitura. Os caracteres foram polarizados utilizando *Muraya* e *Merrilia* como grupo externo. Todas as apomorfias analisadas foram confirmadas por análise do seqüenciamento. A matriz utilizada na análise foi montada com base em 566 caracteres oriundos do segmento trnL(UAA) - trnF(GAA) e 323 caracteres do segmento trnT(UGU) - trnL(UAA), perfazendo um total de 889 caracteres, incluindo os quatro tipos de nucleotídeos e os gaps. Três tipos de análises foram realizados com base nestas informações. Na primeira análise a matriz utilizada apresentou 775 caracteres, considerando os gaps como eventos únicos e sendo tratados como a quinta fonte de informação. Na segunda análise, apenas as quatro bases foram consideradas como caracteres válidos, sendo analisada uma matriz de 889 caracteres. Na terceira análise apenas os "gaps" envolvendo dois ou mais nucleotídeos foram considerados como caracteres válidos, numa matriz com 21 eventos de deleção/inserção ou duplicação, que foram analisados como presença ou ausência do caráter.

As três análises foram realizadas pelo método de parcimônia de Wagner, utilizando o programa de análise filogenética PAUP 4.0b4a. for Windows (SWOFFORD, 2000), utilizando algoritmos TBR para procura heurística. Foi realizado o teste de bootstrap por meio de 500 amostragens.

4. RESULTADOS

A seqüência nucleotídica do segmento intergênico trnL(UAA) - trnF(GAA) foi determinada para os representantes da subfamília Aurantioideae, correspondentes aos

gêneros *Murraya*, *Merrilia*, *Triphasia*, *Aegle*, *Feroniella*, *Atalantia*, *Severinia*, *Hesperethusa*, *Microcitrus*, *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus* (Tabela 1), perfazendo um total de 556 caracteres na matriz analisada. Foram observadas as seguintes apomorfias: 7 duplicações; 5 eventos de deleções/inserção (Tabela 2); e 34 mutações de ponto. Uma análise intraespecífica foi realizada para *P. trifoliata*, *C. medica* e *C. reticulata*, não sendo observadas diferenças entre as variedades utilizadas nesse trabalho. As tangerinas 'Sunki', 'Clementina', 'Ponkan', 'Satsuma' e 'Dancy' foram utilizadas como representantes de *C. reticulata*, enquanto que os trifoliatas 'English large', 'Small flower', 'Davis A' e 'Rubidoux' representaram *Poncirus trifoliata*. Para *C. medica* foram analisadas as cidras 'Etrog', 'Diamante' e 'Doce'. As mesmas seqüências de nucleotídeos também foram observadas entre *C. reticulata*, *C. limonia* e *C. jambhiri*, e entre *C. grandis*, *C. limon*, *C. limettioides*, *C. aurantium*, *C. sinensis* e *C. latifolia*. Autapomorfias foram observadas tanto para os representantes de *Poncirus* quanto os de *C. medica*.

Três eventos de duplicação apresentados pelo segmento trnL(UAA) - trnF(GAA) conferiram significativa diferença molecular entre os representantes de *Citrus* e gêneros relacionados. Com base nas duplicações **e** (TACGTATTTCTTTTATGAAAAAGAAATACGTATTTCTTTTATGAAAAAGAA), **f** (GAAAAAGAAAAA) e **g** (TGTTATTGTTAT), quatro tipos básicos de molécula foram observados nesta região (Figura 1): **1. Segmento aurantioideae** (molécula ancestral): segmento de 49 pb caracterizado por não apresentar as duplicações **e**, **f** e **g**. Onze dos 12 gêneros analisados, representando as duas tribos (Clauseneae e Citreae) e 5 das 6 subtribos da subfamília Aurantioideae, apresentam este tipo de segmento; **2. Segmento citrus**: segmento de 55 pb caracterizado por apresentar a duplicação **g**. Este segmento foi encontrado em *Citrus* apenas nos representantes do subgênero *Papeda* e grupo das toranjas (Tabela 1); **3. Segmento reticulata**: segmento de 61 pb caracterizado por apresentar as duplicações **f** e **g**. Encontrado apenas em representantes do gênero *Citrus* da grupo das tangerinas (Tabela 1); **4. Segmento fortunella**: segmento de 76 pb caracterizado por apresentar a duplicação **e**. Encontrado apenas em representantes do gênero *Fortunella*.

Trezentos e vinte e três caracteres da região trnT(UGU) - trnL(UAA) foram utilizados na análise de segmentos oriundos dos gêneros *Murraya*, *Merrilia*, *Triphasia*, *Aegle*, *Feroniella*, *Atalantia*, *Severinia*, *Hesperethusa*, *Microcitrus*, *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus*. Foi observada a existência de 36 apomorfias correspondentes a três duplicações, cinco eventos de inserção/deleção (Tabela 2) e 28 mutações de ponto. O evento *t* corresponde a autapomorfia de *C. medica* (Tabela 2). A duplicação *n* é compartilhada por *Merrilia* e *Murraya*. O evento de deleção/inserção *s* foi observado nos genótipos *C. grandis*, *C. limon*, *C. limettioides*, *C. latifolia*, *C. aurantium*, *C. paradisi* e *C. sinensis*, sendo que nenhuma diferença foi observada entre estes genótipos. Da mesma forma, nenhuma diferença na sequência foi observada entre *C. reticulata*, *C. limonia*, e *C. jambhiri*.

Três análises foram realizadas com base nas informações obtidas a partir do sequenciamento das regiões trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT (UGU) - trnL (UAA). Na primeira análise (A1) foram geradas três árvores com 97 passos de transformação, ci=0,9588 e ri=0,9649. Na tribo Citreae (clado Citreae) foi observado uma politomia basal com cinco grupos, dentre os quais há apoio para um clado que agrupa os gêneros *Severinia* e *Atalantia* e outro que agrupa *Aegle* e *Hesperethusa*. O gênero *Citrus* aparece em um clado que agrupa ainda os gêneros *Poncirus*, *Fortunella* e *Microcitrus*. *C. medica* aparece em uma politomia basal no clado, fora do grupo que reúne as demais espécies do gênero, *Fortunella* e *Poncirus* (Figura 2). Um grupo monofilético foi observado dentro do gênero *Citrus*, com exceção de *C. medica*. Outros dois cladogramas foram observados dentro deste grupo, considerados aqui como grupo das toranjas e grupo das tangerinas. O grupo das tangerinas é formado por *C. reticulata*, *C. tachibana*, *C. jambhiri* e *C. limonia*, enquanto o grupo das toranjas é formado por *C. grandis*, *C. sinensis*, *C. limon*, *C. latifolia*, *C. aurantium* e *C. limettioides*. Foram observados valores de bootstrap (500 amostragens) correspondentes a 94 para o clado citros, 93 para o clado das toranjas e 88 para o clado das tangerinas (Figura 2).

Na segunda análise (A2) foram obtidas 3 árvores, apresentando 63 passos, ci=0,984 e ri=0,984. Nestas árvores não são observados os cladogramas que separam *Microcitrus*, *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus*, sendo todos os outros cladogramas idênticos aos apresentados na primeira análise. Na terceira análise (A3) foram geradas 6 árvores,

com 23 passos, ci=0,91, ri=0,96. Esta análise apresentou a mesma topologia apresentada pela análise A1.

5. DISCUSSÃO

Conflitos têm sido observados quanto à taxonomia e filogenia da subfamília Aurantioideae. O sistema de classificação proposto por SWINGLE & REECE (1967) dividiu a subfamília nas tribos Clauseneae (subtribos Micromelinae, Clauseninae e Merrillinae) e Citreae (subtribos Triphasiinae, Balsamocitrinae e Citrinae). Os dados gerados no presente estudo sugerem uma maior afinidade filogenética para *Murraya* e *Merrilia*, que se encontram fora do clado que agrupa os representantes da tribo Citreae. No entanto, estudos recentes propõem que a tribo Clauseneae não corresponde a um grupo natural, e que a divisão em duas tribos, como proposto por SWINGLE & REECE (1967), só se justifica com a transferência de *Murraya* s.s e *Merrilia* da tribo Clauseneae para Citreae (GUERRA *et al.*, 2000; SAMUEL *et al.*, 2001). Estudos quimiotaxonômicos e macromoleculares colocam *Murraya* s.l. como grupo não monofilético, sugerindo uma maior afinidade filogenética entre *Murraya* s.s. e *Merrilia*, sustentando a divisão deste gênero em *Murraya* s.s. e *Bergera* (KONG *et al.*, 1988; LI *et al.*, 1988; WATERMAN, 1990; SAMUEL *et al.*, 2001). Estudos citogenéticos também corroboram tal proposição, de modo que os representantes da tribo Citreae, assim definida, seriam caracterizados por caracteres apomórficos como ausência de carbazol, elevada quantidade de heterocromatina (>10%) e forte padrão de bandeamento cromossômico por conjunto haplóide (GUERRA *et al.*, 2000).

A análise dos segmentos trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT (UGU) - trnL (UAA) do cpDNA não apoia a separação das tribos Triphasiinae, Balsamocitrinae e Citrinae, nem a separação dos grupos subtribais A e B, propostos para a subtribo Citrinae por SWINGLE & REECE (1967). Uma maior afinidade filogenética é sugerida para *Severinia buxifolia* e *Atalantia monophylla* e para *Hesperethusa crenulata* e *Aegle marmelos*. Estudos citogenéticos apoiam a hipótese de uma maior afinidade entre *Severinia buxifolia* e *Atalantia monophylla* (GUERRA *et al.*, 2000). No entanto, *Severinia* e *Hesperethusa* representam o grupo A e *Atalantia* o grupo B da subtribo Citrineae, enquanto *Aegle* e *Feroniella* são classificados como representantes da subtribo

Balsamocitrinae. SAMUEL *et al.* (2001) não observaram qualquer relação de afinidade para as subtribos do sistema de classificação proposto por SWINGLE & REECE (1967) e GUERRA *et al.* (2000) sugerem que estas constituem grupos artificiais.

Por outro lado, o presente estudo apoia a condição natural do grupo subtribal C (*True Citrus Fruit Trees*), sendo observada a formação de um clado para os representantes dos gêneros *Poncirus*, *Citrus*, *Fortunella* e *Microcitrus* (grupo C). A condição monofilética deste grupo também tem sido corroborada pela análise do segmento intergênico atpb/rbcL e do intron 16 rps (SAMUEL *et al.*, 2001), bem como pela afinidade existente entre seus táxons, revelada pela compatibilidade sexual (IWAMASA *et al.*, 1988), similaridade morfológica (BARRET & RHODES, 1976), organização do genoma (IWAMASA & NITO, 1988) e dados isoenzimáticos (RAHMAN *et al.*, 1994).

Uma clara separação é observada entre *Severinia buxifolia* (grupo A) e os representantes do grupo C. Estudos de similaridade sugerem uma maior proximidade filogenética entre *S. buxifolia* e representantes de *Citrus* (HERRERO *et al.*, 1996 b; FEDERICI *et al.*, 1998). Por sua vez, estudos citogenéticos revelam que os representantes do grupo C apresentam um padrão de bandeamento cromossômico e proporção de heterocromatina por conjunto haplóide característicos, que os distingue daqueles observados em *Severinia*. Muito embora alguns híbridos artificiais (6 híbridos em 860 flores polinizadas) tenham sido produzidos através de cruzamentos controlados (BORDIGNON, 1995), os cruzamentos artificiais sugerem uma baixa eficiência reprodutiva entre *Severinia* e o referido grupo (CAMERON & FROST, 1968; IWAMASA *et al.*, 1988). O isolamento reprodutivo observado entre *Severinia buxifolia* e estes gêneros, corrobora a hipótese de que *Microcitrus*, *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus* representem um grupo natural separado de *Severinia*.

Citrus se apresenta como um grupo não monofilético. Os dados oriundos das regiões trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT (UGU) - trnL (UAA) do cpDNA sugerem maior divergência de *C. medica* em relação a outros representantes de *Citrus*, quando comparados com *Poncirus* e *Fortunella*. A análise de dados de origem mitocondrial e de cloroplasto dão sustentação à hipótese de maior divergência citoplasmática de *C. medica* em relação a *Poncirus*, *Microcitrus*, *Eremocitrus*, *Fortunella* e *Citrus* spp.

(GREEN *et al.*, 1986; HANDA *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1993; NICOLOSI *et al.*, 2000). Por outro lado, a análise de dados morfológicos (BARRET & RHODES, 1976), bioquímicos (POTVIN *et al.*, 1983), isoenzimáticos (HERRERO *et al.*, 1996 b) e genômicos (FEDERICI *et al.*, 1998) sugerem grande afinidade filogenética entre *C. medica* e os demais representantes do gênero. Essa incongruência, revelada pela grande similaridade total e ampla divergência citoplasmática, sugere um padrão de evolução reticulado para *C. medica*, com possível introgressão de outros gêneros na sua formação.

Uma parte representativa da variabilidade observada nos segmentos trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT (UGU) - trnL (UAA) é devido a eventos de duplicação, sugerindo ser este um mecanismo comum no seu processo de evolução. Os eventos de duplicação *e*, *f* e *g*, ocorridos no segmento intergênico trnL(UAA) - trnF(GAA), conferiram diferença significativa entre representantes de *Citrus* e gêneros afins. Usando o critério de parcimônia consideramos que esta molécula tenha evoluído a partir do **segmento aurantioideae**, dando origem aos outros três tipos de moléculas. Deste modo o **segmento aurantioideae** deve inicialmente ter sofrido a duplicação *g*, originando o **segmento citrus**. Em seguida, uma duplicação *f* teria ocorrido em um ancestral contendo o **segmento citrus**, dando origem ao **segmento reticulata**. O **segmento fortunella** teria sido originado de modo independente, a partir do evento de duplicação *e* ocorrido em um ancestral contendo o **segmento aurantioideae** (Figura 1). *C. medica* é representada pelo **segmento aurantioideae**, sugerindo maior divergência citoplasmática em relação a outros *Citrus*. A duplicação *g* sugere grupo monofilético para representantes *Papeda*, grupo das toranjas e grupo das tangerinas. Uma nova segregação, dentro deste clado, é caracterizada pelo evento de duplicação *f*, sugerindo que o grupo das tangerinas divergiu do grupo *Papeda* - toranja antes da ocorrência desta duplicação. Este modelo de evolução sugere tempos de divergência distintos separando *C. medica*, *C. grandis* e *C. reticulata*, estando de acordo com outros estudos realizados com base na análise dos genomas citoplasmáticos (GREEN *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1993; NICOLOSI *et al.*, 2000).

A base genética das “espécies” comerciais (híbridos naturais), representantes do subgênero *Citrus* sensu Swingle é formada por *C. medica*, *C. reticulata* e *C. grandis* e

pela introgressão de genes dos representantes do subgênero *Papeda* (SCORA, 1975; BARRET & RHODES, 1976). Um padrão de herança materno é sugerido para o plastoma de *Citrus* (CORRIVEAU & COLEMAN, 1988), o que permite definir linhagens maternas envolvidas na origem dos híbridos naturais, através da análise dos segmentos trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT (UGU) - trnL (UAA).

C. aurantifolia é considerado um híbrido natural de *Papeda* x complexo cidra-limão (SCORA, 1976), *C. medica* x *Microcitrus* (SCORA, 1988) ou *C. medica* x *Microcitrus* x *C. grandis* (BARRET & RHODES, 1976). Os dados gerados neste trabalho, com base na análise de cpDNA, sugerem pouca similaridade entre o plastoma de *C. aurantifolia* e os de *C. medica*, *Microcitrus* e *C. grandis*. No entanto, *C. hystrix* e *C. aurantifolia* apresentam uma maior similaridade, quando comparados com outros *Citrus* analisados, não compartilhando algumas apomorfias presentes nos grupos das toranjas e tangerinas. Além disto, dados isoenzimáticos revelam que *C. aurantifolia* apresenta um alelo de fosfoglucomutase, típico dos representantes *Papeda* (TORRES *et al.*, 1978), corroborando a hipótese de contribuição de representantes deste subgênero na sua formação. NICOLOSI *et al.* (2000) sugeriram que *C. micrantha* (subgênero *Papeda*) ou um táxon similar a esse tenha originado *C. aurantifolia*.

As espécies *C. grandis*, *C. limon*, *C. limettioides*, *C. latifolia*, *C. aurantium*, *C. paradisi* e *C. sinensis* constituem o grupo das toranjas. Estes dados estão de acordo com o agrupamento para *Citrus* obtido através dos padrões de RFLP (restriction fragment length polymorphism) de cloroplasto (GREEN *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1993) e mitocôndria (YAMAMOTO *et al.*, 1993). SCORA (1988) propõe que *C. sinensis* e *C. aurantium* sejam originadas do cruzamento entre *C. grandis* x *C. reticulata*. Nossos dados sugerem que *C. grandis*, *C. sinensis* e *C. aurantium* compartilham de um plastoma ancestral mais recente, sugerindo que *C. grandis* corresponda ao parental materno de *C. sinensis* e *C. aurantium*.

A origem genética do 'limão verdadeiro' (*C. limon*) tem sido objeto de muitas investigações. MALIK *et al.* (1974) propuseram que *C. medica* corresponda a um dos parentais deste táxon, juntamente com outra fonte de genes fora do grupo cidra-lima. SCORA (1976) propôs que *C. limon* tenha sido originado do cruzamento de *C. medica* x *C. aurantifolia* ou *C. grandis* x *C. medica*. Para HIRAI & KOZAKI (1981), *C. sinensis*, *C.*

aurantium ou *C. reticulata* são possíveis candidatos a parental de *C. limon*, juntamente com *C. medica*. A análise dos segmentos trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT (UGU) - trnL (UAA) sugere uma grande divergência entre os plastomas de *C. medica*, *C. reticulata* e *C. limon*, colocando as cidras e tangerinas como improváveis parentais maternos de *C. limon*, o que inviabiliza o cruzamento *C. reticulata* x *C. medica* para a formação desse táxon. Esses dados sugerem ainda que *C. aurantium*, *C. sinensis* e *C. grandis* são possíveis candidatos ao parental materno, uma vez que participam da mesma linhagem citoplasmática de *C. limon*. Dados mitocondriais revelam que *C. limon* e *C. aurantium* apresentam padrão idêntico de RFLP, distinto daqueles observados em *C. grandis* e *C. sinensis* (YAMAMOTO *et al.*, 1993). Além disto, dados isoenzimáticos demonstram que *C. aurantium* e *C. limon* compartilham de um alelo W do sistema Pgi, que não é encontrado em *C. medica*, *C. grandis* ou *C. sinensis* (TORRES *et al.*, 1978). Mais recentemente, NICOLSI *et al.* (2000) e GULSEN & ROOSE (2001), baseados na análise dos genomas citoplasmático e nuclear, propuseram que *C. limon* foi originado do cruzamento *C. aurantium* x *C. medica*, tendo *C. aurantium* como seu parental materno.

Os dados gerados nesse trabalho sugerem a formação do grupo das tangerinas (*C. reticulata*, *C. tachibana*, *C. limonia* e *C. jambhiri*). Esses dados colocam *C. tachibana* como táxon mais divergente dentro do grupo e sugerem a contribuição das tangerinas na formação dos limões 'Rugoso' e 'Cravo'. A análise de RFLP mitocondrial apoia a hipótese de que *C. tachibana* apresente um padrão mais divergente dentre os representantes das tangerinas (YAMAMOTO *et al.*, 1993). Esses dados corroboram a classificação proposta por SWINGLE & REECE (1967), que separou *C. tachibana* dos demais representantes das tangerinas (*C. reticulata*). Tanto *C. jambhiri* quanto *C. limonia* são considerados como híbridos. A origem de *C. jambhiri* tem sido proposta como sendo resultado do cruzamento *C. limon* ou *C. medica* x *C. reticulata* (HODGSON, 1969; SWINGLE & REECE, 1967; BARRET & RHODES, 1976; SCORA, 1988) e para *C. limonia* os cruzamentos propostos são *C. medica* x lima x espécie não identificada (MALIK *et al.*, 1974) e *C. medica* x lima ou *C. medica* x 'Limão Rugoso' (HODGSON, 1967). Os dados gerados neste trabalho apoiam a contribuição de *C.*

jambhiri para *C. limonia* e de *C. reticulata* para *C. jambhiri*, sugerindo que esses atuaram como parental materno na formação desses táxons.

O grupo “árvores de citros verdadeiros” (“*True Citrus Fruit Trees*”) proposto por SWINGLE & REECE (1967) corresponde a um grupo monofilético. No entanto, *Citrus* apresenta uma origem complexa. Esse gênero se apresenta como um grupo não monofilético devido à posição isolada de *C. medica* dentro do clado *Citrus*. A separação de *Citrus* nos subgêneros *Papeda* e *Citrus* sensu Swingle também se apresenta como agrupamento artificial. O modelo de evolução da molécula sugere tempos de divergência distintos para *C. medica*, *C. grandis* e *C. reticulata*, definindo as linhagens das toranjas e tangerinas, o que reforça a hipótese da contribuição desses táxons como a base da formação dos híbridos naturais. No entanto, a ampla divergência revelada pelos dados de origem citoplasmática e a afinidade genética sugerida pela análise de dados de origem nuclear, para essas três espécies, sugerem a ocorrência de um padrão de evolução reticulado para *Citrus*, com possível introgressão de outros gêneros do grupo ‘árvores de citros verdadeiros’ (*‘true citrus fruit trees’*) na formação de seus táxons.

Tabela 1: Representantes da subfamília Aurantioideae avaliados nesse estudo. Grupos subtribais de Citrinae: Grupo A (“Primitive Citrus Fruit Trees”), Grupo B (“Near-Citrus Fruit Trees”) e Grupo C (“True Citrus Fruit Trees”). Classificação proposta de SWINGLE & REECE (1967).

Tribo	Subtribo	Grupo	Espécies	Nome comum-clone	Código
Clauseneae	Clauseninae		<i>Murraya paniculata</i>		CV415
	Merriliinae		<i>Merrilia caloxilon</i>		CN733
Citreae	Triphasiinae		<i>Triphasia trifolia</i>		Mat01
	Balsamocitrinae		<i>Aegle marmelo</i> <i>Feroniella oblata</i>		CV411 CV410
Citrinae	Grupo A		<i>Severinia buxifolia</i> <i>Hesperethusa crenulata</i>		CV419 CV413
		Grupo B	<i>Atalantia monophylla</i>		CZA01
	Grupo C		<i>F. margarita</i> [Lour.] Swing.	Kumquat nagami	CV423
			<i>F. hindisii</i> [Champ] Swing.	Kumquat HongKong	CN729
			<i>P. trifoliata</i> [L.] Raf.	Laranja Trifoliata ‘Rubidoux’	VEL835
			<i>P. trifoliata</i> [L.] Raf.	Laranja Trifoliata ‘Davis A’	VEL848
			<i>P. trifoliata</i> [L.] Raf.	Laranja Trifoliata ‘Small flower’	CV384
			<i>P. trifoliata</i> [L.] Raf.	Laranja Trifoliata ‘English large’	VEL832
			<i>Microcitrus</i> sp.		CV418
			<i>Citrus medica</i> L.	Cidra ‘Diamante’	CN689
			<i>C. medica</i> L.	Cidra ‘Etrog’	CV367
			<i>C. medica</i> L.	Cidra ‘Doce’	CV364
			<i>C. sinensis</i> L. Osbeck	Laranja doce ‘Pêra’	Mat02
			<i>C. grandis</i> L. Osbeck	Toranja ‘Siamesa’	CV 357
			<i>C. limon</i> [L.] Burm.	Limão verdadeiro ‘Eureka’	CN 644
			<i>C. limettioides</i> Tan.	Lima doce ‘Lima da Pérsia’	CN318
			<i>C. latifolia</i> Tan.	Lima ácida ‘Limão Tahiti’	CN654
			<i>C. aurantifolia</i> Swing.	Lima ácida ‘Limão galego’	CN323
			<i>C. aurantium</i> L.	Laranja azêda ‘São Paulo’	CV244
			<i>C. paradisi</i> Macfadyen	Pomelo ‘Duncan’	CN333
			<i>C. hystrix</i> DC.	Mauritius Papeda	CN 384
			<i>C. junos</i> Sieb. Ex Tan.	Papeda	CN 703
			<i>C. ichangensis</i> Swing.	Ichang papeda	CV373
			<i>C. tachibana</i> [Mak.] Tan.	Laranja Tachibana	CN708
			<i>C. reticulata</i> Blanco	Tangerina ‘Ponkan’	CN 224
			<i>C. reticulata</i> Blanco	Tangerina ‘Satsuma Owari’	CV 169
			<i>C. reticulata</i> Blanco	Tangerina ‘Sunki’	CV 200
			<i>C. reticulata</i> Blanco	Tangerina ‘Clementina’	CV 174
			<i>C. reticulata</i> Blanco	Tangerina ‘Dancy’	CV 427
			<i>C. limonia</i> Osbeck	‘Limão Cravo’	CN 685
			<i>C. jambhiri</i> Lush.	‘Limão Rugoso da Flórida’	CN 695

Tabela 2: Eventos de deleção/inserção e duplicação apresentados nas seqüências obtidas das regiões trnL(UAA)-trnF(GAA) e trnT(UGU)-trnL(UAA).

Região	Evento	Seqüência	Tipo de evento
trnL(UAA)-trnF(GAA)	<i>A</i>	CTTTT	Duplicação
	<i>B</i>	AAAGAAA	Duplicação
	<i>C</i>	GG	deleção/inserção
	<i>D</i>	TATATAGAC	deleção/inserção
	<i>E</i>	27pb *	Duplicação
	<i>F</i>	GAAAAA*	Duplicação
	<i>G</i>	TGTTAT*	Duplicação
	<i>H</i>	GTTTTTTT	Duplicação
	<i>I</i>	CAAGTT	deleção/inserção
	<i>J</i>	GGATAT	Duplicação
	<i>K</i>	TT	deleção/inserção
	<i>L</i>	ATGAACACC	deleção/inserção
	<i>M</i>	ATTGCT*	Duplicação
trnT(UGU)-trnL(UAA)	<i>N</i>	TTAGAT*	Duplicação
	<i>O</i>	AT*	deleção/inserção
	<i>P</i>	AA	deleção/inserção
	<i>Q</i>	AT*	deleção/inserção
	<i>R</i>	CGAAT	Duplicação
	<i>S</i>	TGGAGAAA*	deleção/inserção
	<i>T</i>	GGG	deleção/inserção
	<i>U</i>	TTTATA*	Duplicação

* sinapomorfias

A

Segmento aurantioideae (SA)

CAACCAAATACGTATTTCTTTTATGAAAAAGAAAAGAATTGTTATGAA

Segmento citrus (SC)

CAACCAAATACGTATTTCTTTTATGAAAAAGAAAAGAATTGTTATTGTTATGAA
(g)

Segmento reticulata (SR)

CAACCAAATACGTATTTCTTTTATGAAAAAGAAAAAGAAAAGAATTGTTATTGTTATGAA
(f) (g)

Segmento fortunella (SF)

CAACCAAATACGTATTTCTTTTATGAAAAAGAAATACGTATTTCTTTTATGAAAAAGAAAAGAATTGTTATGAA
(e)

B

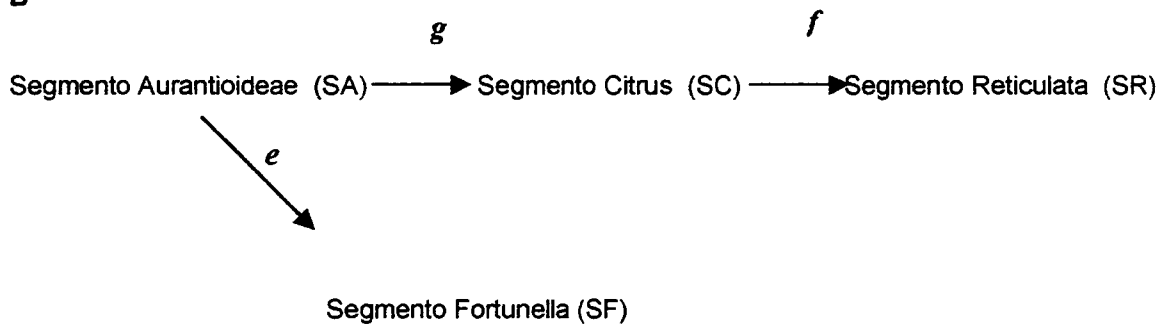


Figura 1: Padrão de evolução do segmento trnL(UAA) - trnF(GAA) baseado nas duplicações *e*, *f* e *g*. A- tipos de segmentos com as respectivas duplicações (região sublinhada); B- Seqüência de eventos de duplicação ao longo da evolução da molécula.

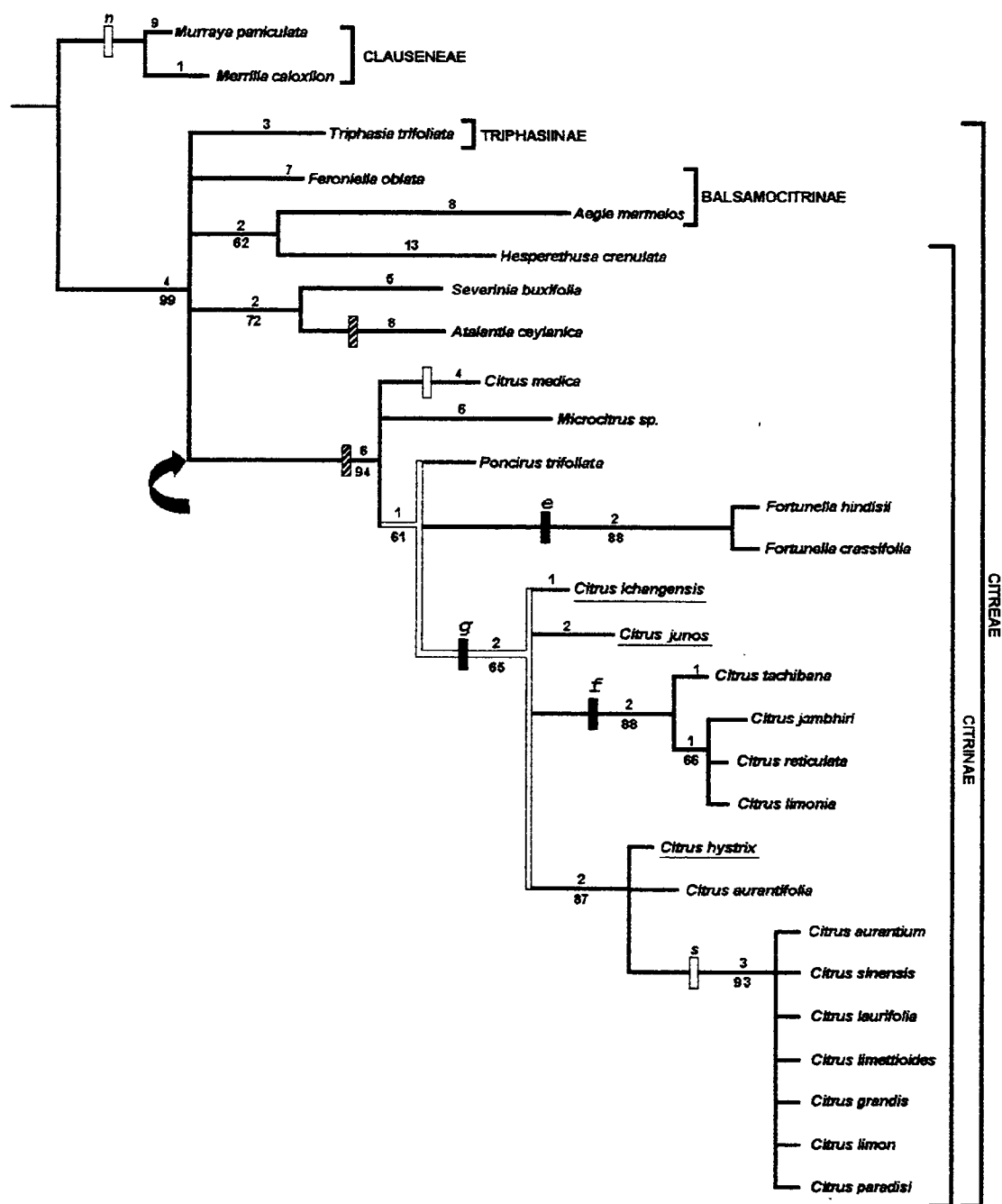


Figura 2: Uma das três árvores mais parcimoniosas [97 passos, ci=0,9588 e ri=0,9649] idêntica a árvore consenso, originada da análise das regiões trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT(UGU) - trnL(UAA), considerando como informativos 'gap' e mutação de ponto. Teste bootstrap foi realizado com 500 amostragens.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRET, H.C.; RHODES, A.M. (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst. Bot.* 1, 105-136.
- BORDIGNON, R. (1995) Híbridões interespecíficas, intergenéricas, intergrupais, intersubtribais, intertribais e intersubfamiliares de *Citrus* e gêneros relacionados. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-S.P. Tese de dissertação de Mestrado.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. (1969) Genetics, breeding and nucellar embryony. In Reuther, W.; Webber, H.J.; Batchelor, L.D. (eds), *The Citrus industry*, Vol. 2, 2nd ed. Berkeley: University of California, pp. 325-370.
- CHAPOT, H. (1975) The *Citrus* plant. In Ernest Hafliger (eds.), *Citrus*. Ciba Geigy Agrochemicals, technical monograph, nº 4. Switzerland: CIBA-GEIGY LTDA, pp. 6-13.
- CORRIVEAU, J.L.; COLLEMAN, A.W. (1988) Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Am. J. Bot.* 75, 1443-1458.
- DA SILVA, M.F.G.F.; GOTTLIEB, O.R.; EHRENDORFER, F. (1988) Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. *Plant Syst. Evol.* 161, 97-134.
- ENGLER, A. (1931) Rutaceae. In A. Engler & K. Prantl [eds.], *Die natürlichen Pflanzfamilien*, ed. 2. Engelmann, Leipzig, 19a, pp. 187-359.
- FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. (1997). Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95, 408-417.
- FANG, D.; KRUEGER, R.R.; ROOSE, M.L. (1998.) Phylogenetic Relationships among Selected *Citrus* Germplasm Accessions Revealed by Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123 (4):612-617.
- FEDERICI, C.T.; FANG, D.Q.; SCORA, R.W.; ROOSE, M.L. (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96, 812-822.

- GIELLY, L.; TABERLET, P. (1994) The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: non-coding versus rbcL sequences. *Mol. Biol. Evol.* 11, 769-777.
- GREEN, R.M.; VARDI, A.; GALUN, E. (1986) The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species, and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.* 72,170-177.
- GUERRA, M.; DOS SANTOS, K.G.B.; SILVA, A.E.B.E; EHRENDORFER, F. (2000) Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae-a case of parallel chromosomal evolution. *Am. J. Bot.* 87 (5):735-747.
- GULSEN, O.; ROOSE, M.L. (2001). Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126:(2) 210-215.
- HANDA, T.; ISHIZAWA, Y; OOGAKI, C. (1986) Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. *Japan J. Genet.* 61:15-24.
- HERRERO, R.; ASINSI, M.J.; CARBONELL, A.E.; NAVARRO, L. (1996a) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92, 599-609.
- HERRERO, R.; ASINS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, A.E.; NAVARRO, L. (1996b) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1327-1334
- HIRAI, M.; KOZAKI, I. (1981) Isozymes of citrus leaves. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1:10-13.
- HSIAO, C.; CHATTERTON, N.J.; ASAY, K.H.; JENSEN K.B. (1995) Molecular phylogeny of the Poideae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequence. *Theor. Appl. Genet.* 90, 389-398.
- HODGSON, R.W. (1969) Horticultural varieties of *Citrus*. In W. Reuther, H.J. Webber, and L.B. Batchelor, eds., *The Citrus Industry*, vol. 1, Berkeley: University of California Press, pp. 431-591.
- IWAMASA, M.; NITO, N. (1988) Cytogenetics and the evolution of modern cultivated *Citrus*. In Goren, R.K.; Mendel, K. (eds) *Proc 6th Int Citrus, Cong*, Vol. 1. Margraf Publ, Weikersheim, Germany, pp 265-275.
- IWAMASA, M.; NITO, N. ; LING, J-T (1988) Intra- and intergeneric hybridization in the orange subfamily, Aurantioideae. In Goren, R.K.; Mendel, K. (eds) *Proc 6th Int Citrus, Cong*, Vol. 1. Margraf Publ, Weikersheim, Germany, pp. 123-130.

- KONG, Y.-C.; BUT, P.P.-H.; Ng, K.-H.; CHENG, K.-F.; CHANG, K.-L.; WONG, K.-M.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. (1988) The biochemical systematics of *Merrilia*; in relation to *Murraya*, the Clauseneae and the Aurantioideae. *Biochem. Syst. Ecol.* 16, 47-50.
- LURO, F.; LAIGRET, F.; BOVÉ, J.M.; OLLITRAULT, P. (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (R.A.P.D.) to *Citrus* genetics and taxonomy. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 226-228.
- MALIK, M.N.; SCORA, R.W.; SOOST, R.K. (1974) Studies on the origin of the lemon. *Hilgardia*. 42, 361-382.
- MACHADO, M.A.; COLLETA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; POMPEU JR. J. (1996) Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica*. 92, 321-326.
- MURRAY, M.G.; Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.* 8, 4321-4325.
- NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; La MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATTO, E. (2000) *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 1155-1166.
- OLMSTEAD, R.G.; PALMER, J.D. (1994) Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. *Am. J. Bot.* 81(9): 1205-1224.
- OLLITRAULT, P. (1990) Isozymes and restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in citrus selection. In *Proc 4th Asia-Pacific Int Conf Citrus Rehabilitation*. FAO-UNDP RAS/86/022 regional project FAO, Rome, pp. 59-63.
- PALMER, J.D. (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am. Nat.* 130, 6-29.
- PALMER, J.D.; JANSEN, R.K.; MICHAEL, H.J.; CHASE, M.W.; MANHART, J.R. (1988) Chloroplast DNA evolution and plant phylogeny. *Ann. Mol. Bot. Gard.* 75, 1180-1206.
- POTVIN, C.; BERGERON, Y.; SIMON, J.P. (1983) A numerical taxonomic study of selected *Citrus* species (Rutaceae) based on biochemical characters. *Syst. Bot.* 8, 127-133.
- RAHMAM, M. M.; NITO, N.; ISSHIKI, S. (1994) Genetic analyses of phosphoglucosyltransferase isozymes in "true citrus fruit trees". *Sci. Hortic.* 60, 17-22.

- ROOSE, M. L. (1988) Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in *Citrus* breeding and systematics. In INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, v. 6, Tel Aviv, 1988, Proceedings. Philadelphia Rehovot, Balaban, pp. 155-165.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SCORA, R.W. (1975) On the history and origin of *Citrus*. Bull. Torrey Bot. Club 102, 369-375.
- SCORA, R.W. (1988) Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated *Citrus*. In Goren R, Mendel K (eds) Proc 6th Int Citrus Congr, Vol. 1. Margraf Publ, Weikersheim, Germany, pp. 277-289.
- SCORA, R.W.; KUMAMOTO, J.; ESEN, A.; STONE, B. (1976) A phitochemical investigation of *Citrus halimii*. Proc. Int. Soc. Citricult. 4, 255-258.
- SWINGLE, W.T. (1943) The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily. In: Webber H.J. and L.D. Batchelor (eds.) The *Citrus* industry, Vol. I. University of California, Berkeley, pp. 129-474.
- SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) The Citrus industry, vol 1, 2nd edn University of California, Berkeley, pp. 190-430.
- SAMUEL, R.; EHRENDORFER, F.; CHASE, M.W.; GREGER, H. (2001) Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. Plant Biol. 3:77-87.
- SWOFFORD, D.L. (2000) Paup v. 4.0b4a for 32-bits Microsoft windows. Program beta version. Washington D.C. Smithsonian Institution.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of cloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17, 1105-1109.
- TANAKA, T. (1977) Fundamental discussion of *Citrus* classification. Stud. Citrol. 14, 1-6.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; DIEDENHOFEN, U. (1978) Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. Am. J. Bot. 65, 869-881.
- WATERMAN, P.G. (1990) Chemosystematics of Rutaceae: Comments on the interpretation of Da Silva et al. Plant Syst. Evol. 173, 39-48.

YAMAMOTO, M.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; YAMADA, Y. (1993) Phylogenetic relationships of *Citrus* revealed by diversity of cytoplasmic genomes. In Hayashi T, Omura M, Scott NS (eds) Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees. Fruit Trees Research Station, Okitsu, Japan, pp. 39-46.

CAPÍTULO 2

What is *Citrus*? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae)¹

What is *Citrus*? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae)¹

Edson Freitas de Araújo²

Luciano Paganucci de Queiroz²

Marcos Antônio Machado³

1. Work developed as part of the PhD thesis of the first author at the Universidade Estadual de Campinas.
2. Universidade Estadual de Feira de Santana, Depto. de Ciências Biológicas. Km 03, BR 116, Campus. 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brasil. E-mail: lqueiroz@uefs.br; efa@uefs.br
3. Centro de Citricultura Sylvio Moreira, CP 04. 13490-970, Cordeirópolis, São Paulo, Brazil. E-mail: marcos@centrodecitricultura.br

1. Abstract

The taxonomy of *Citrus* L. is discussed in the light of the phylogeny of *Citrus* and allied genera inferred from the evolution of the segments trnL(UAA)-trnF(GAA) and trnT(UGU)-trnL(UAA) of the cpDNA. Twenty eight species from twelve genera of the subfamily Aurantioideae were sampled and phylogenies were constructed using maximum parsimony and neighbor-joining and are well supported by high bootstrap values. The molecular data support a clade constituted by *Citrus*, *Poncirus* Raf., *Fortunella* Swingle, and *Microcitrus* Swingle but do not support a hypothesis of monophyly of *Citrus*, due to the isolated position of *Citrus medica* L.. These results are congruent with an analysis of morphological evolution of diagnostic characters within the tribe Citreae. A more conservative position with a wider definition of *Citrus* to include all the cited relatives is intended to avoid great nomenclatural changes in such an economic important group.

Key Words

Rutaceae, Aurantioideae, *Citrus*, phylogeny, taxonomy, cpDNA

2. Introduction

The taxonomy of *Citrus* L. and allied has been a challenge for botanists. Most of its complexity derives both from the biology of the species and its cultivation history. The species have great ability to cross and to produce hybrids (both intra and intergeneric). Some of these hybrids are fertile by zygote derived embryos or can become fertile by spontaneous formation of adventitious nucellar embryos which contributes to the maintenance of genetic stability and to the perpetuation of the hybrids as apomictic clones (Chapot, 1975; Scora, 1975). Associated with these biological properties, species of *Citrus* were transferred between areas in the Far East (Chapot, 1975; Scora, 1975), where crossing between species became possible, blurring the taxonomic limits previously maintained by geographical isolation. This resulted in a swarm of morphological forms that have been interpreted as few as eleven (Engler, 1931) to as much as 145 species (Tanaka, 1977).

The taxonomic situation is further complicated by the confused boundaries between *Citrus* and allied genera. The history of the subfamily Aurantioideae was marked by the proposal of new genera segregated from *Citrus*, such as *Poncirus* Raf. (Swingle & Reece, 1967), *Fortunella* Swingle (Swingle, 1915 a), and *Microcitrus* Swingle (Swingle, 1915 b). Engler (1896) initially treated the allied species of *Citrus* in just one genus but, later on, he accepted this subdivision (Engler, 1931). There are not, however, strong morphological characters to separate these genera and many of the diagnostic characters of one genus can be found in the species of another. Burkill (1931) treated Swingle's genera as subgenera of *Citrus* but his proposal was largely overlooked. More recently, Mabberly (1998), when revising *Citrus* and related genera in Australia, merged with *Citrus* the genera *Fortunella*, *Eremocitrus* Swingle, and *Microcitrus*.

One of the most usually accepted classifications for the subtribe Citrinae (Swingle & Reece, 1967) is clearly gradist, with the genera being arranged as if they were in a progressive series: "Primitive Citrus Fruit Trees", "Near-Citrus Fruit Trees" and "True Citrus Fruit Trees". In the present work, this problem is treated from an explicit phylogenetic hypothesis for *Citrus* and allied genera, based on the evolution of two segments of the cpDNA. A complete analysis of the molecular evolution of the group

with discussion of the parental lineages in *Citrus* is being prepared by Araújo and Machado.

3. Material & Methods

Plant material was obtained from the active germplasm banks of the Sylvio Moreira Citrus Centre (CCSM - IAC, Cordeirópolis, São Paulo, Brazil) and the National Centre of Cassava and Tropical Fruits (CNPMP - EMBRAPA, Cruz das Almas, Bahia, Brazil; table 1). Total DNA was extracted from lyophilised leaves according the methodology of Murray & Thompson (1980) modified by Machado et al. (1996).

Amplification was conducted according procedures described by Sambrook et al. (1989) using as primers the sequences 5'-CGAAATCGCTAGAGCTACG-3' and 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3' for the trnL(UAA)-trnF(GAA) segment, and 5'-TCTACCGATTTCGCCATATC-3' and 5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3' for the trnT(UGU)-trnL(UAA) region (Taberlet et al., 1991). The amplification reactions were carried out using a thermal cycler MJ Research model PTC-100™ and later sequenced via dideoxi-terminator at an ABI 377 (Perkin Elmer).

The obtained sequences were aligned with the *Clustal V* programme (Higgins et al., 1992) but for many sequences manual alignment was necessary. *Murraya* L. and *Merrillia* Swingle, both of the tribe Clauseneae, were used as outgroups.

Two different parsimony analyses (MP) were carried out. In the first analysis, the gaps were treated as a fifth state rendering 111 (of 889) parsimony informative characters. When the gaps were treated as missing states (second analysis), there were 43 informative characters. These analyses were performed on the aligned sequences using the heuristic search option (excluding uninformative characters) in Paup 4.0b4a (Swofford, 2000) with branch-swapping algorithm set to TBR (Tree-Bisection-Reconnection), and the MULPARS option in effect, keeping only 10 trees per replicate. Neighbor-joining analysis was conducted the same version of Paup with the option criterion set to distance. A HKY85 model (Hasegawa, Kishino & Yano, 1985) was employed to estimate the distances between sequences. Five hundred replicates were performed with the option Maxtrees = 5000 to obtain bootstrap support values both for

MP and NJ analyses. The aligned matrix can be obtained from the first author (efa@uefs.br).

Evolution of morphological characters putatively apomorphic for the subfamily Aurantioideae (table 2) was analysed by their optimization on one of the most parsimonious trees obtained from the first analysis using Winclada (Nixon, 1999).

4. Results

We sampled 28 species from 12 different genera of the Aurantioideae (table 1). The trnL(UAA)-trnF(GAA) and trnT(UGU)-trnL(UAA) regions provided data both from point mutation and segment duplication (table 3) that were phylogenetically informative for the relationship of *Citrus* and allies. The sequenced regions included 889 characters, 198 (22.3%) were variable, and 111 (12.5%) were parsimony informative. The genetic distance between each pair of genotypes calculated by Paup ranged from 0 among species of the *Citrus aurantium*-*C. paradisi* clade, the *Citrus reticulata*-*C. jambhiri* clade, and the *Fortunella hindsii*-*F. margarita* clade, to 0.02364 between *Murraya paniculata* and *Hesperethusa crenulata*.

The phylogeny obtained from point mutation data is highly congruent with the main events of duplications observed in the two segments analysed (table 2). The evolution of the trnL(UAA)-trnF(GAA) and trnT(UGU)-trnL(UAA) segments within the Citrinae is marked by 11 duplication and 10 insertion/deletion events. In the present study, the duplication events appeared supporting six clades while just two clades were supported by a indel event (figure 1).

Parsimony analysis (MP) produced six most parsimonious trees (213 steps, ci 0.90 and ri 0.97) when considering gaps as new states. Bootstrap tests show strong support for the main clades of the trees. One of the most parsimonious trees from the first analysis, identical to the strict consensus tree, is illustrated at figure 1. The consideration of gaps as missing states produced three trees with 63 steps, ci 0.94 and ri 0.98. There was less resolution in the *Citrus*-clade (figure 1) just retaining the *Fortunella*, the *C. reticulata*-*C. limonia* and the *C. aurantium*-*C. paradisi* clades.

Neighbor-joining (NJ) analysis gave result similar to the found in MP trees except for the less resolution within the *Citrus*-clade (figure 2). Both methods recovered a large monophyletic group joining the representatives of the genera *Citrus*, *Microcitrus*, *Fortunella*, and *Poncirus*. MP trees also recovered a monophyletic group including all representatives of the genus *Citrus* except for *C. medica* (figure 1). This group was not obtained in the NJ analysis but both methods do not supported monophyly of the genus *Citrus* due to the positioning of *C. medica*. In the NJ tree, *C. medica* appeared in a clade with *Microcitrus* but this group collapse in the bootstrap consense tree and its positioning remains as unresolved in both analyses.

MP and NJ analyses support sister-group relationships between *Aegle-Hesperethusa* and *Severinia-Atalantia* but do not provide evidence for sister-group relationship of the *Citrus*-clade.

5. Discussion

5.1. Tribes and subtribes

Murraya and *Merrillia*, the two genera of the tribe Clauseneae included in the analysis, appear as a clade supported by a duplication of 6 bp in the trnL(UAA)-trnF(GAA) region. This seems to support the traditional division of the subfamily Aurantioideae into two tribes Clauseneae and Citreae, differentiated mainly by the presence in the tribe Citreae of spines, leaves pinnate or with an articulated rachis (characters 1, 2), and a more elaborated berry. In spite of this, the diagnostic characters of the Clauseneae seem to be plesiomorphies in the Aurantioideae and recent cpDNA phylogeny have shown that this tribe may not be monophyletic (Samuel et al., 2001). On the other hand, this division into two tribes is justified if *Merrillia* and *Murraya* (except for the species segregated as *Bergera* L.) are transferred to Citreae (Samuel et al., 2001). This narrower concept of the Clauseneae is also supported by the presence of carbazoles and by a limited quantity of heterochromatin per haploid chromosome set (Guerra et al., 2000). Unfortunately, the present study did not include a large enough sampling of the genera of Clauseneae to allow discussion of its circumscription.

There is no support for the subdivision of the Citreae into the subtribes Triphasiinae, Citrineae and Balsamocitrinae. Representatives of the three subtribes appear as an unresolved basal polytomy into the Citreae-clade (figure 1). The type of fruit has been traditionally used to diagnose the subtribes of Citreae. Triphasiinae is characterised by small fruits with thin rind and locules filled with mucilaginous gum. Balsamocitrinae is diagnosed by large fruits with woody rind and locules filled with resinous gum. Citrineae is usually defined by its berries with coriaceous rind and locules filled with pulp vesicles, the hesperidium (Swingle & Reece, 1967), although this type of fruit is not universal in this subtribe.

The fruits of the species of Triphasiinae and Balsamocitrinae share a plesiomorphic condition in Aurantioideae, locules filled with mucilaginous or resinous gum. The hard-shelled fruits of the Balsamocitrinae (those of *Feroniella* Swingle and *Aegle* Koenig) seem to be an independent development (character 10). This putative parallelism is reinforced by the quite different structure of the fruit in these genera. In *Feroniella*, the fruit results from a fusion of the locules of the ovary into a single cavity with the placentation becoming parietal (character 11). In *Aegle*, the fruit retains the locule structure in a manner similar to that found in the Triphasiinae, except for its woody rind and larger size. The occurrence of woolly seeds (character 9) appears, in the context of the present study, as an autapomorphy of the genus *Aegle*, although this condition may be found in other genera of Balsamocitrinae such as *Swinglea* Merrill and *Feronia* Corrêa (Swingle & Reece, 1967).

5.2. Relationships between the genera of the subtribe Citrinae

Within the Citrinae, the alliances recognised by Swingle & Reece (1967) are not supported. These authors grouped *Severinia* Ten. and *Hesperethusa* M. Roem. in their “Primitive Citrus Fruit Trees”, because of their fruits with pulp vesicles without definite shape which become oily or resinous at maturity, and *Atalantia* Corrêa in their “Near-Citrus Fruit Trees” because of its fruit with conical pulp vesicles imbedded in the locule wall. These two grades share a diplostemonous androecium, a character that seems to be a plesiomorphy within the Citrinae.

The genus *Atalantia* has a puzzling position in the phylogeny of the Citreae. It was grouped with *Severinia* in all MP trees in the first analysis because they share a 6 bp duplication at the trnT(UGU)-trnL(UAA) region and one additional point mutation at the trnL(UAA)-trnF(GAA) segment rendering seven characters to support this relationship. On the other hand, *Atalantia* shares a 6 bp duplication in the trnL(UAA)-trnF(GAA) region with the *Citrus*-clade (striped boxes in figure 1). The fruit structure of *Atalantia* subgenus *Atalantia* is more similar to that found in the *Citrus*-clade because of the presence of pulp-vesicles in the mature fruit, but these vesicles are sessile, broad-based, and present on the lateral walls of the locules. *Atalantia* subgenus *Rissoa* (Arn.) Swingle has a quite different, nearly dry, fruit, which may suggest the genus is not monophyletic, a possibility also suggested by isoenzymatic data (Herrero et al., 1996). The optimisation of the hesperidium as a character on the gene tree (character 5) favours the hypothesis of parallel acquisition of this kind of fruit by *Atalantia* and the *Citrus*-clade. However, the unique structure of the hesperidium within the Angiosperms makes quite improbable an hypothesis of independent origin of this kind of fruit in the Rutaceae. Therefore, the hypothesis of a group bringing together *Atalantia* and the *Citrus*-clade seems to be more congruent with morphological evolution of the fruit, that of *Atalantia* subgenus *Atalantia* with broad based vesicles immersed in all the locule walls probably being more primitive than the fruit with stalked vesicles found in the *Citrus*-clade. A cladistic analysis based on morphological characters could test this hypothesis.

Citrus, *Poncirus*, *Microcitrus*, and *Fortunella* constitute a monophyletic group (bootstrap 100). This group (the *Citrus*-clade in figure 1) is also supported by morphological characters such as numerous stamens (at least 4x the number of the petals; character 4) and elongate, stalked pulp-vesicles attached only on the dorsal wall of the locule (characters 6, 7, 8). More recently, a study based on the atpB/rbcL spacer of the cpDNA (Samuel et al., 2001) showed these genera to belong to the same clade. Guerra et al. (2000) showed that this group may be also characterised by strongly banded karyotypes and increased amount of heterochromatin.

However, in none of the MP or NJ analyses is *C. medica* L. grouped with the other species of *Citrus*. Besides lacking the duplication g (table 1) of the trnL(UAA)-

trnF(GAA) segment, it presents a duplication at the trnT(UGU)-trnL(UAA) molecule not shared with other *Citrus*. This result seems to corroborate the isolated position of this species within *Citrus* as previously indicated by cytoplasmatic genome data (Handa et al., 1986; Yamamoto et al., 1993; Araújo & Machado, 1999). Further data would provide more resolution at the base of the *Citrus*-clade, but this set of evidence strongly supports the isolated position of *C. medica* within the genus *Citrus* obtained in this present analysis.

Swingle & Reece (1967) divided the genus *Citrus* into the subgenera *Citrus* and *Papeda* based on the presence of acridic oil in the fruit and of broad-winged petioles in subgenus *Papeda*. The present study does not support this proposition. Besides the evident polyphyly of subgenus *Citrus*, due to the position of *C. medica*, there are no synapomorphies linking the species of subgenus *Papeda* (underlined species in figure 1), and *C. hystrix* DC. shares two point mutations with the *C. aurantifolia*-*C. paradisi* clade.

Poncirus was segregated from *Citrus* by its deciduous, palmately trifoliolate leaves (character 3) developing from scaly buds. These characters are autapomorphies within the Citrinae and have been interpreted as adaptations for survival to winters in the temperate zone in North and Central China where the genus occurs. Fang & Zhang (1994) have argued that a more recently discovered species, *P. polyandra* S. Q. Ding, X. N. Zhnag & M. Q. Liang, could link this genus with *Citrus*.

Microcitrus is another small genus (ca. 6 species) from Australia and New Guinea. It is strongly related to *Citrus* from which it differs mainly by dimorphic leaves in the seedlings. One of the characters used to segregate *Microcitrus* from *Citrus* is the presence of free filaments (Swingle & Reece, 1967). Nonetheless, this character is variable in *Citrus*; most species of the subgenus *Papeda* have free filaments, while some other species of this subgenus and those of the subgenus *Citrus* have filaments cohering in bundles. Mabberley (1998) considered these characters insufficient to justify maintaining *Microcitrus* as an independent genus and proposed sinking it into *Citrus*. He also cited as evidence the formation of hybrids between species of these two genera.

The genus *Fortunella* includes four species of the “kumquats” from Eastern Asia (China, Hong Kong, and Malay Peninsula). It is traditionally separated from *Citrus* by

quantitative characters, 3-7 locules in the ovary (x 8-18) with 2 ovules per locule (x 4-12) and smaller fruits. In other vegetative, floral, and fruit characters, *Fortunella* is quite similar to *Citrus*, including the polyadelphous androecium (character 4) with numerous stamens cohering in bundles, a character more commonly found in *Citrus* subgenus *Citrus*.

Eremocitrus (not investigated in the present work) is a monospecific genus from central-eastern Australia. It is strongly related to *Citrus* and its main distinctive characters (small leaves with palisade parenchyma on both faces, thick cuticle and stomata sunken in pit-like depressions) may be interpreted as xerophytic adaptations to semiarid habitats, without great taxonomic value. This position was adopted by Mabberley (1998) who transferred *Eremocitrus glauca* (Lindl.) Swing. to the genus *Citrus*.

Both the present results and the recently accumulated information about Aurantioideae phylogeny support a view of an early diversification of different lineages of *Citrus* and allies. The absence of sharp delimitation of these genera may reflect the spreading of these early lineages over south-eastern Asia, Australia and major archipelagos without great morphological changes and with many parallel developments. The taxonomic assumptions about the boundaries between *Citrus* and related genera has been marked by the recognition of genera diagnosed by inconsistent characters. The present study shows that the *Citrus*-clade is a natural group and the recognition of *Microcitrus*, *Fortunella*, and *Poncirus* as valid genera makes *Citrus* polyphyletic because of the position of *C. medica*. *C. medica* is the type species of the genus *Citrus* and a more conservative position with a wider definition of *Citrus* to include all the cited relatives seems preferable, as this avoids great nomenclatural changes in such an economically important group. At the same time, this supports the proposition of Mabberley (1998) who merged Australian species of *Microcitrus* and *Eremocitrus* in the genus *Citrus*. This position is well supported by both molecular and morphological data, and *Citrus*, so defined, becomes a group with ca. 27-35 species and with a morphological coherence defined by many synapomorphies, especially the polystemonous androecium and the fruit a hesperidium berry filled with slender-stalked vesicles, attached only to the dorsal wall of the locules.

Acknowledgments

EFA wishes to express his thanks to the Centro de APTA Citricultura Sylvio Moreira and to the Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura (Embrapa/CNPMPF) for providing access to the cultivated plants, and to Dr José Carlos V. Rodrigues and Dr Maria do Carmo S. Amaral for discussion of some parts of this work. Dr J. R. Pirani provided information about Rutaceae taxonomy and two anonymous reviewers and Dr R. M. Harley made important improvement to the English text.

Table 1. Species included in this study. Taxonomic treatment followed Swingle & Reece (1967).

Taxa	Place of origin	Voucher ^b	GenBank Acc. n°		
			R1	R2	R3
Tribe Clauseneae					
Subtribe Clauseninae					
<i>Murraya paniculata</i>		CV415	Ay116525	Ay115655	Ay115632
Subtribe Merrillinae					
<i>Merrillia caloxylon</i> (Ridl.) Swingle	Malay Peninsula	CN733	Ay116523	Ay115653	Ay115630
Tribe Citreae					
Subtribe Balsamocitrinae					
<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corrêa	India	CV411	Ay116508	Ay115638	Ay115615
<i>Feroniella oblata</i> Swingle	Indo-China	CV410	Ay116511	Ay115641	Ay115618
Subtribe Citrinae					
<i>Atalantia monophylla</i> DC.	India	CRZ01	Ay116509	Ay115639	Ay115616
<i>Citrus</i> subg. <i>Citrus</i>					
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	East Indian Archipelago	CN323	Ay116510	Ay115640	Ay115617
<i>Citrus aurantium</i> L.	Southeastern Asia	CV244	Ay116533	Af434803	Af434804
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	Southeastern Asia	CV 357	Ay116512	Ay115642	Ay115619
<i>Citrus jambhiri</i> Lush.	Southeastern Asia	CN 695	Ay116517	Ay115647	Ay115624
<i>Citrus latifolia</i> Tanaka	Southeastern Asia	CN654	Ay116518	Ay115648	Ay115625
<i>Citrus limettioides</i> Tanaka	Southeastern Asia	CN318	Ay116519	Ay115649	Ay115626
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.f.	Southeastern Asia	CN 644	Ay116520	Ay115650	Ay115627
<i>Citrus limonia</i> Osbeck	Southeastern Asia	CN 685	Ay116521	Ay115651	Ay115628
<i>Citrus medica</i> L.	China and India	CN689	Ay116534	Af434806	Af434807
<i>Citrus paradisi</i> Macf.	?	CN333	Ay116526	Ay115656	Ay115633
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Philippines and Southeastern Asia	CN 224	Ay116527	Ay115657	Ay115634
<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	China and Southeastern Asia	MT02	Ay116535	Af434809	Af434810
<i>Citrus tachibana</i> (Mak.) Tanaka	Japan	CN708	Ay116528	Ay115658	Ay115635
<i>Citrus</i> subg. <i>Papeda</i> (Hassk.) Swingle					
<i>Citrus hystrix</i> DC.	Indonesia	CN 384	Ay116515	Ay115645	Ay115622
<i>Citrus ichangensis</i> Swingle	China	CV373	Ay116516	Ay115646	Ay115623

<i>Citrus junos</i> Sieb. ex Tanaka	China	CN 703	Ay116531	Ay115661	Ay115637
<i>Fortunella margarita</i> (Lour.) Swingle	Southern China	CV423	Ay116522	Ay115652	Ay115629
<i>F. hindisii</i> (Champ.) Swingle	Southern China	CN729	Ay116514	Ay115644	Ay115621
<i>Hesperethusa crenulata</i> (Roxb.) M. Roem.	India	CV413	Ay116513	Ay115643	Ay115620
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Central and Northern China	VEL835	Ay116529	Ay115659 Ay116	Ay115636
<i>Microcitrus</i> sp.	Australia	CV418	Ay116524	Ay115654	Ay115631
<i>Severinia buxifolia</i> (Poir.) Ten.	Southern China	CV419	Ay116532	Af434800	Af434801
Subtribe Triphasiinae					
<i>Triphasia trifolia</i> (Burm.f.) P.Wils.	Southeastern Asia	MT01	Ay116530	Ay115660	Ay059643

Region of cpDNA: R1 = intergenic spacer trnT-trnL; R2 = intron trnL 5'exon - trnL 3'exon;

R3 = intergenic spacer trnL-trnF

Table 2. Putative apomorphic characters for the Rutaceae subfamily Aurantioideae.

Character
1. Spines present
2. Leaves simple or with articulated rachis
3. Palmate trifoliolate leaves
4. Stamens at least 4x the number of petals
5. Hesperidium berry (locules filled with pulp vesicles)
6. Pulp-vesicles with definite (elongate) shape
7. Pulp-vesicles slender-stalked
8. Pulp-vesicles attached only to the dorsal walls of the locule
9. Seeds woolly
10. Fruit with rind woody
11. Parietal placentation

Table 3. Events of duplication in the trnL(UAA)-trnF(GAA) and trnT(UGU)-trnL(UAA) regions of the cpDNA of the representatives of the Subfamily Aurantioideae.

Region	Event	Code	Sequence
TrnL(UAA)-trnF(GAA)	dupl.	<i>a</i>	CTTTT
	dupl.	<i>b</i>	AAAGAAA
	indel	<i>c</i>	GG
	indel	<i>d</i>	TATATAGAC
	dupl.	<i>e</i>	27pb
	dupl.	<i>f</i>	GAAAAA
	dupl.	<i>g</i>	TGTTAT
	dupl.	<i>h</i>	GTTTTTTT
	indel	<i>i</i>	CAAGTT
	dupl.	<i>j</i>	GGATAT
	indel	<i>k</i>	TT
	indel	<i>l</i>	ATGAACACC
	dupl.	<i>m</i>	ATTGCT
TrnT(UGU)-trnL(UAA)	dupl.	<i>n</i>	TTAGAT
	indel	<i>o</i>	AT
	indel	<i>p</i>	AA
	indel	<i>q</i>	AT
	dupl.	<i>r</i>	CGAAT
	indel	<i>s</i>	TGGAGAAA
	indel	<i>t</i>	GGG
	dupl.	<i>u</i>	TTTATA

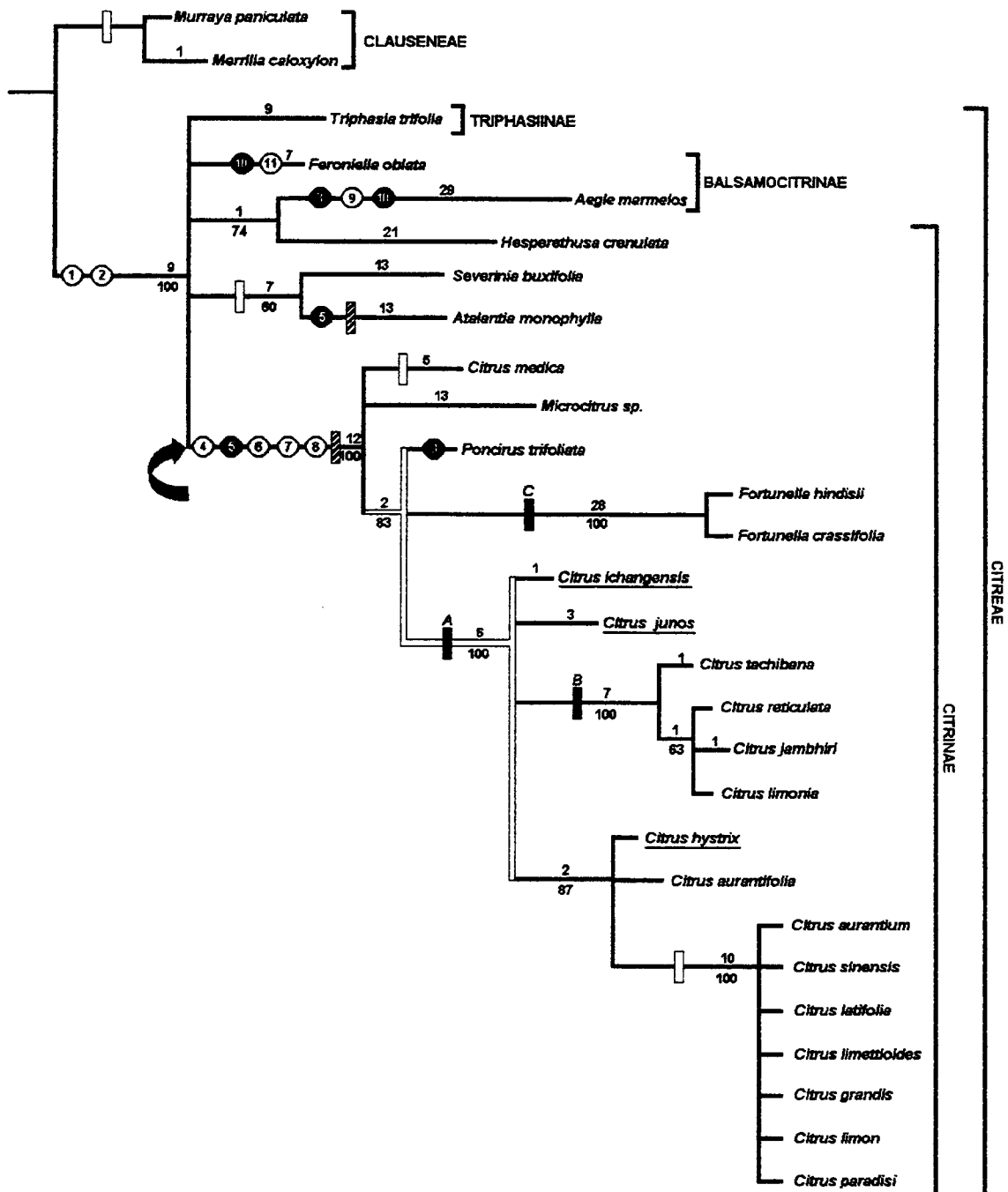


Figure 1:

One of the six most parsimonious trees [213 steps, ci 0.95, ri 0.97] identical to the strict consensus tree, derived from the analysis of the trnL(UAA)-trnF(GAA) and trnT(UGU)-trnL(UAA) cp-DNA segments considering gaps as new states. The *Citrus*-clade is identified by arrow. Open lines indicate nodes that collapse in the consensus tree when gaps are considered as missing states. Solid boxes designate major duplications events in the trnL(UAA)-trnF(GAA) segment (see figure 2 for codes) while open boxes indicate major duplications in the trnT(UGU)-trnL(UAA) segment and striped boxes indicate homoplasious duplications in this segment. Morphological characters (table 2) plotted on cladogram are represented by numbers inside circles: open circles = non-homoplasious forwards transitions, solid circles = homoplasies. Numbers above lines represent the number of nucleotide substitutions and those below lines are bootstrap support values (500 replications). The underlined names refer to the species of *Citrus* subgenus *Papeda*. Taxa indicated at the right side of the brackets refer to the classification Swingle & Reece (1967).

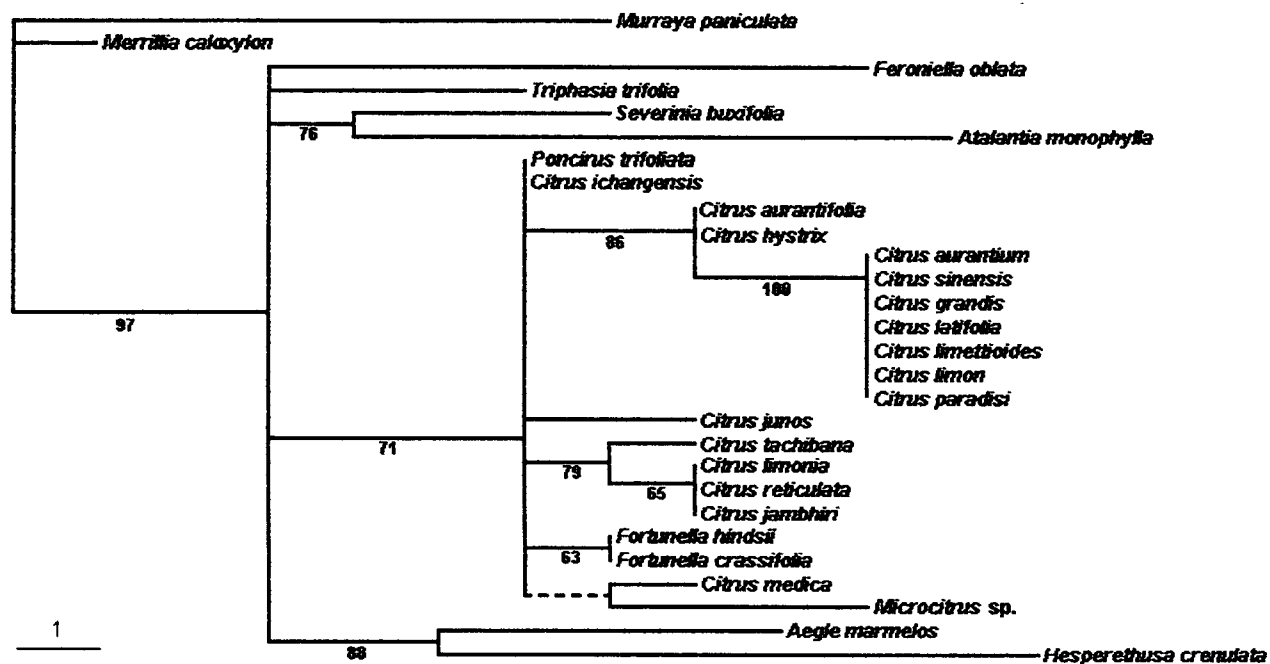


Figure 2:

Tree obtained from neighbor-joining analysis. Numbers below lines are bootstrap support values (500 replications). Broken lines indicate nodes that collapse in the bootstrap consensus tree.

6. REFERENCES

- Araújo, E. F. de & Machado, M. A. (1999): Inferência filogenética de *Citrus* e gêneros relacionados por análises das regiões trnL(UAA)-trnF(GAA) e trnT(UGU)-trnL(UAA). Gen. Molec. Biol. 22 (3), Suppl.: 382.
- Burkill, I. H. (1931): An enumeration of the species of *Paramignya*, *Atalantia* and *Citrus*, found in Malaya. Gard. Bull. Straits Settlem. 5: 212-220.
- Chapot, H. (1975): The *Citrus* plant. Pp. 6-13 in: Hafliger, E. (ed.) *Citrus*. Ciba Geigy Agrochemicals, Technical Monograph nº 4.
- Engler, A. (1896): Rutaceae. Pp. 95-201 in: Engler, A. & Prantl, K. (eds.) Die natürlichen Pflanzenfamilien. Engelmann, Leipzig, teil 3, abt. 4.
- Engler, A. (1931): Rutaceae. Pp. 187-359 in: Engler, A. & Prantl, K. (eds.) Die natürlichen Pflanzenfamilien, ed. 2. Engelmann, Leipzig, 19a.
- Fang, D. & Zhang, W. C. (1994): Intra- and intergeneric relationships of *Poncirus polyandra*: investigation of leaf isoenzymes. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 229-231.
- Guerra, M., K., dos Santos, G. B., Silva, A. E. B. & Ehrendorfer, F. (2000): Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - a case of parallel chromosomal evolution. Am. J. Bot. 87 (5): 735-747.
- Handa, T., Ishizawa, Y. & Oogaki, C. (1986): Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. Japan J. Gent. 61: 15-24.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985): Date of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. 22: 160-174.
- Herrero, R., Asins, M. J., Pina, J. A., Carbonell, A. E. & Navarro, L. (1996): Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. Theor. Appl. Genet. 93: 1327-1334.
- Higgins D. G., Bleasby, A. J. & Fuchs, R. (1992): CLUSTAL V. Improved software for multiple sequence alignment. Comput. Appl. Biosci. 8: 189-191.
- Mabberley, D. J. (1998): Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae). Telopea 7 (4): 333-344.

- Machado, M. A., Colleta-Filho, H. D., Tarfon, M. L. P. N. & Pompeu jr, J. (1996): Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenare) using RAPD markers. *Euphytica* 92: 321-326.
- Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of higher molecular weight plant DNA. *Nucl. Acid. Res.* 8: 4321-4325.
- Nixon, K. C. (1999): Winclada ver. 0.9.9+ (beta). Program and manual.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., New York.
- Samuel, R.; Ehrendorfer, F.; Chase, M.W.; Greger, H. (2001): Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. *Plant. Biol.* 3: 77-87.
- Scora, R. W. (1975): On the history and origin of Citrus. *Bull. Torrey Bot. Club* 102: 369-375.
- Swingle, W. T. (1915a): A new genus, *Fortunella*, comprising four species of kumquat oranges. *Jour. Wash. Acad. Sci.* 5: 165-76.
- Swingle, W. T. (1915b): *Microcitrus*, a new genus of Australian citrous fruit. *Jour. Wash. Acad. Sci.* 5: 569-78.
- Swingle, W. T. & Reece, P. C. (1967): The botany of *Citrus* and orange relatives in the orange subfamily. Pp. 190-340 in: Reuther, W., Webber, H. J. & Batchelor, D. L. (eds.) *The Citrus Industry*, vol. 1. 2nd ed. California Univ. Press, Berkley.
- Swofford, D. L. (2000): Paup v. 4.0b4a for 32-bits Microsoft Windows. Program beta version. Washington DC, Smithsonian Institution.
- Tanaka, T. (1977): Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Stud. Citrol.* 14: 1-6.
- Taberlet, P., Gielley, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105-1109.
- Yamamoto, M., Kobayashi, S., Nakamura, Y. & Yamada, Y. (1993): Phylogenetic relationships of *Citrus* revealed by diversity of cytoplasmic genomes. Pp. 39-46 in: Hayashi, T., Omura, M. & Scott, N. S. (eds.) *Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees*. Fruit Trees Research Station, Okitsu.

CAPÍTULO 3

INCONGRUÊNCIA NAS RELAÇÕES CITOPLASMÁTICAS DE *Citrus*: SEGREGAÇÃO DE ORGANELAS OU CONVERGÊNCIA MOLECULAR?

Incongruência nas relações citoplasmáticas de *Citrus*: segregação de organelas ou convergência molecular?

*Edson Freitas de Araújo*¹ & *Marcos Antônio Machado*². 1. Universidade Estadual de Feira de Santana, Dpto. de Ciências Biológicas. Km 03, BR 116, Campus. 44031-460, Feira de Santana/BA/Brasil. E-mail: efa@uefs.br 2. Centro de APTA Citricultura Sylvio Moreira, C.P. 04, CEP 13490-970, Cordeirópolis/SP/Brasil. E-mail: marcos@centrodecitricultura.br

1. RESUMO

Seis marcadores moleculares, presentes nos segmentos de cloroplasto (*trnL*_(UAA)-*trnF*_(GAA)) e mitocôndria (18S-5S), foram utilizados na caracterização citoplasmática de 40 acessos representantes do grupo “árvores de citros verdadeiros” (“True Citrus Fruit Trees”). Os dados oriundos de ambas organelas sugerem a existência de dois grupos para o subgênero *Citrus*, correspondentes às linhagens maternas das toranjas e das tangerinas. Uma posição conflituosa é observada para a linhagem das tangerinas. Os dados de cloroplastos sugerem que esta linhagem forma um grupo monofilético com outros representantes de *Citrus* (*Papeda* e linhagens maternas das toranjas). Os dados mitocondriais sugerem grupo monofilético formado por representantes da linhagem materna das tangerinas, *Poncirus* e *Fortunella*. Tanto *Fortunella hindisii* quanto outros representantes de *Citrus* estão fora deste clado. A ocorrência de segregação de organelas é proposta como provável explicação para as diferentes combinações dos tipos citoplasmáticos observados dentro do referido grupo.

2. INTRODUÇÃO

Estudos sobre evolução têm sido realizados a partir da análise direta de diferentes genomas existentes na célula vegetal. Em angiospermas, as organelas citoplasmáticas apresentam herança predominantemente uniparental (WALBOT & CULLIS, 1985), podendo ser transferidas para as progênes através do parental

materno ou paterno (BOBLINZ *et al.*, 1990; DONG & WAGNER, 1994; PALMER, 1992; WAGNER, 1992). Herança biparental também tem sido observada tanto para mitocôndrias (ERICKSON & KEMBLE, 1990; ERICKSON *et al.*, 1989; HAVEY, 1997), quanto para cloroplastos (MASON *et al.*, 1994; MEDGYESY *et al.*, 1986; SMITH, 1989). Esta variação no padrão de herança afeta diretamente os estudos de hibridação (CRUZAN *et al.*, 1993), fluxo gênico (McCAULEI, 1994, 1995) e inferências filogenéticas (HARRIS & INGRAM, 1991), que utilizam a análise dos genomas destas organelas. Conseqüentemente, incongruências nas inferências filogenéticas podem ser observadas ao se analisar diferentes genomas da célula, em espécies de origem híbrida (RIESEBERG & SOLTIS, 1991; SANG *et al.*, 1997; SOLTIS & KUZOFF, 1995; WOLFE & ELISENS, 1995).

Em *Citrus* e gêneros afins os marcadores citoplasmáticos têm se apresentado como uma ferramenta nos estudos de diversidade genética e filogenia (GREEN *et al.*, 1986; HANDA *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1993). Recente estudo com base na análise de cpDNA sugere uma classificação mais ampla para *Citrus*, incluindo os representantes dos gêneros *Fortunella*, *Poncirus* e *Microcitrus*, devido à posição isolada de *C. medica* dentro do grupo (ARAÚJO *et al.*, no prelo). Análises dos genomas de origem mitocondrial e de cloroplasto corroboram tal divergência citoplasmática de *C. medica* em relação a *Citrus* e gêneros afins (HANDA *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1993). No entanto, os dados citoplasmáticos não são conclusivos quanto à relação entre representantes de *Fortunella* e *Citrus*. A análise do genoma mitocondrial sugere uma grande afinidade entre estes táxons, agrupando *Fortunella* num subgrupo dentro de *Citrus* (YAMAMOTO *et al.*, 1993). Por sua vez, os dados de cpDNA sugerem grupo monofilético para os representantes dos subgêneros *Papeda* e *Citrus* sensu Swingle e outro para os representantes *Fortunella*. Uma melhor compreensão das relações citoplasmáticas existentes entre esses táxons, bem como do processo de hibridação na origem de *Citrus*, envolve a análise de um maior número de acessos de *Fortunella* e *Citrus*, através de marcadores oriundos de ambas organelas citoplasmáticas.

Este trabalho teve por objetivo analisar as relações entre representantes do grupo “árvores de citros verdadeiros”, com base em sinapomorfias presentes nos segmentos intergênicos 18S-5S (mitocôndria) e trnL(UAA) - trnF(GAA) (cloroplasto),

discutindo as relações citoplasmáticas entre estes táxons. Incongruências foram observadas nas relações inferidas por cpDNA e mtDNA para representantes dos gêneros *Citrus* e *Fortunella*. A ocorrência de herança biparental ao longo do processo de evolução de *Citrus*, resultando em mistura de organelas citoplasmáticas, está sendo proposta para explicar tal incongruência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal - Foram coletadas amostras de folhas de 48 representantes da Rutaceae, correspondendo aos gêneros *Murraya*, *Severinia*, *Atalantia*, *Feroniella*, *Aegle*, *Hesperethusa*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Fagara*, *Hellietta*, *Ruta* e *Citrus*, (Tabelas 1, 2 e 3), oriundas dos Bancos Ativo de Germoplasma do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM-IAC)-Cordeirópolis/SP, Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF-EMBRAPA)-Cruz das Almas/Ba e Taquari, Santa Maria/RS.

- *Amplificação dos segmentos intergênicos* - A extração do DNA total foi realizada pelo método CTAB, a partir da maceração de folhas em nitrogênio líquido, de acordo com o procedimento descrito por MACHADO *et al.* (1996), adaptado de MURRAY & THOMPSON (1980). A amplificação foi realizada segundo procedimento descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). O segmento intergênico de cloroplasto trnL(UAA) - trnF(GAA) foi amplificado utilizando os iniciadores 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' e 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3' (TABERLET *et al.*, 1991). A região intergênica mitocondrial 18S-5S foi amplificada utilizando-se a combinação dos iniciadores mt18S1180 (7A) 5'-GACATGCGCCTAAGGAGAAA-3', mt5S5P1 (4A) 5'-AAACACGTCTCACCGTAGTG-3' e mt18S3P1 (3A) 5'-TGCCACAAAGGCCTTTGGTG-3' (AL-JANABI *et al.*, 1994) que geraram os segmentos 7A-4A e 3A-4A com tamanhos aproximados de 1,0 kb e 0,3 kb. A reação de amplificação foi realizada num volume final de 50 µl contendo 15 ng de DNA total, 0,25 mM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 25 ng de cada iniciador, 15 mg/ml de BSA, 2 unidades de *Taq* DNA Polimerase e água MiliQ estéril até completar o volume da reação. A reação de amplificação foi realizada em 33 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a

60°C e 1,5 min a 72°C. A extensão final foi por 10 min a 72°C. A mesma temperatura de anelamento foi utilizada para a amplificação dos segmentos das regiões trnL(UAA) - trnF(GAA) e 18S-5S. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador MJ Research modelo PTC-100 TM. Uma alíquota de 5 µl do produto de amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,1 mg/ml de brometo de etídio em tampão 1X TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) para verificação do segmento amplificado. O produto da reação foi precipitado com acetato de sódio e etanol e posteriormente foi sequenciado via dideoxi-terminator, em um seqüenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer).

O segmento de origem mitocondrial 3A-4A (~0,3 kb), foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, com tampão 0,5X TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3; 2 mM EDTA). A corrida foi realizada a 300 volts, 4°C por 3 horas. O gel foi corado com nitrato de prata de acordo com procedimento descrito por BEIDLER *et al.* (1982).

Análise do sítio de restrição BanI do segmento 18S-5S - O sítio de restrição *BanI* (GGPuPyCC) foi caracterizado para os representantes da família Rutaceae através da amplificação, digestão e seqüenciamento do segmento 18S-5S (7A-4A). A reação com *BanI* foi de acordo com recomendações do fabricante (Boehringer-Mannheim). O produto da digestão foi analisado em gel de agarose 1%, contendo 0,1 mg/ml de brometo de etídio num tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 7,2). A análise do sítio de restrição *BanI* para os representantes das famílias Poaceae, Onagraceae, Cytinaceae, Brassicaceae, Santalaceae, Papilionideae, Fabaceae e Solonaceae foi realizada baseado na análise direta das seqüências do segmento 18S-5S depositadas no Genbank.

Padrão de herança do segmento 18S-5S - O padrão de herança do segmento 18S-5S foi determinado pela análise de 15 híbridos originados dos cruzamentos *P. trifoliata* x *C. aurantium*, *C. sinensis* x *C. limonia* e *C. paradisi* x *P. trifoliata*. Estes híbridos foram discriminados dos embriões nucelares por marcadores morfológicos (folha trilobada) e moleculares do tipo RAPD (random amplified polymorphic DNA). A técnica de RAPD foi realizada de acordo com MACHADO *et al.* (1996).

Avaliação da plasticidade evolutiva no segmento 18S-5S - O grau de conservação dos setores contendo as sinapomorfias R+, D+ e Tvt, foi avaliado através da homologia

apresentada por seqüências moldes de 100 pb, com as seqüências do banco de dados Genbank, através do programa BLAST. Os setores que apresentaram um maior grau de conservação foram considerados como de menor plasticidade evolutiva.

Caracterização dos plastomas - A caracterização dos plastomas foi realizada com base nos quatro tipos de segmentos apresentados pela região trnL(UAA) - trnF(GAA), proposto por ARAÚJO & MACHADO (capítulo 1 dessa tese). Estes segmentos foram caracterizados com base nas duplicações **e** (TACGTATTTCTTTTATGAAAAAGAAA), **f** (GAAAAA) e **g** (TGTTAT). O plastoma I apresenta o **segmento aurantioideae** que corresponde a uma molécula de 49 pb, desprovida das três duplicações. O plastoma II apresenta o **segmento citrus** que corresponde a uma molécula de 57 pb que contém a duplicação **g**. O plastoma III apresenta o **segmento reticulata** que corresponde a uma molécula de 61 pb que apresenta as duplicações **f** e **g**. O plastoma IV apresenta o **segmento fortunella** que corresponde a uma molécula de 76 pb que apresenta a duplicação **e**.

4. RESULTADOS

O segmento intergênico mitocondrial 18S-5S (~ 1,0 kb) foi analisado para representantes da subfamília Aurantioideae, correspondentes aos gêneros *Murraya*, *Merrilia*, *Hesperethusa*, *Atalantia*, *Severinia*, *Triphasia*, *Feroniella*, *Aegle*, *Microcitrus*, *Fortunella*, *Poncirus* e *Citrus* (subfamília Aurantioideae) (Tabela 1). A caracterização molecular deste segmento revelou a presença de três caracteres informativos para *Citrus*, correspondendo a duas mutações de ponto (transição e transversão), ocorridas no interior do gene 18S, e um evento de deleção/inserção ocorrido na região intergênica (Figura 1). A mutação do tipo transição (G:C→A:T) ocorreu no interior do sítio de restrição *BanI*, permitindo determinar os fenótipos presença ou ausência de restrição, considerados respectivamente como genótipos R+ e R-. A transversão é caracterizada pela mutação de ponto AT→TA, localizada a aproximadamente 530 pb do sítio de restrição *BanI* e a 190 pb do evento inserção/deleção. Com base nesta mutação foram determinados os genótipos Tv_A (A:T) e Tv_T (T:A). O evento deleção/inserção correspondeu à ausência ou presença de pentanucleotídeo (3'-ATGTT-5'), sendo

considerados como genótipos D+ e D-, respectivamente. Os genótipos R- (ausência de restrição), D+ (ausência do pentanucleotídeo 5'-ATGTT-3') e Tv_T (T:A) correspondem a sinapomorfias dentro da subfamília Aurantioideae (Tabela 1).

Com base nos caracteres restrição e deleção/inserção do segmento 18S-5S foram observados os genótipos D+R+, D-R+ e D-R-, que caracterizaram os tipos mitocondriais observados nos representantes do grupo subtribal "árvores de citros verdadeiros" (Tabelas 1, 2 e 3). *Microcitrus* sp., *Fortunella hindisii*, *C. aurantifolia*, *C. medica* e representantes do subgênero *Papeda* (*C. hystrix*, *C. yunos* e *C. ichangensis*) apresentaram tipo mitocondrial D-R+ (Tabelas 1 e 2). Os representantes de *Poncirus trifoliata*, *Fortunella margarita*, *F. crassifolia*, *F. japonica*, *C. reticulata*, *C. unshiu*, *C. sunki*, *C. jambhiri*, *C. tangerina*, *C. clementina*, *C. volkameriana* e *C. limonia* apresentaram tipo mitocondrial D+R+ (Tab. 3). Os representantes do subgênero *Citrus* correspondentes a *C. grandis*, *C. aurantium*, *C. limon*, *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. latifolia* e *C. limettioides* apresentaram tipo mitocondrial D-R- (Tabela 2). Foi realizada uma análise intra-específica avaliando-se sete variedades de *C. medica*, cinco variedades de *C. grandis* (Tabela 2) e quatro variedades de *P. trifoliata* (Tabela 3), sendo observado o mesmo tipo citoplasmático mitocondrial para as variedades representantes de cada uma das referidas espécies. Em todos os 15 genótipos D+R+ analisados, foi observada a presença da sinapomorfia TvT. Esta sinapomorfia não foi observada na análise da seqüência de genótipos D-R- e D-R+.

Um padrão de herança materna foi observado para o segmento 18S-5S (Figura 2), revelado pela análise de híbridos interespecíficos e intergenéricos originados dos cruzamentos *P. trifoliata* x *C. aurantium*, *C. sinensis* x *C. limonia* e *C. paradisi* x *P. trifoliata*. Dentro do subgênero *Citrus* foram observados dois agrupamentos, correspondentes às linhagens maternas das toranjas e tangerinas, com base nas sinapomorfias apresentadas pelo segmento 18S-5S. A linhagem das tangerinas é composta por *C. reticulata*, *C. unshiu*, *C. tangerina*, *C. clementina*, *C. sunki*, *C. jambhiri*, *C. volkameriana* e *C. limonia* e a linhagem das toranjas é formada por *C. grandis*, *C. aurantium*, *C. limon*, *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. latifolia* e *C. limettioides*. Foram observadas diferentes plasticidades genotípicas para os três setores do segmento 18S-5S utilizados no estudo. Os escores obtidos nesta análise variaram de 200 ($E=4e^{-50}$) a

36 bits ($E=1.4$). O setor contendo a transversão (Tv_T) apresentou 100% de similaridade (escore=200 bites e $E=4e^{-50}$) com *Lepidoceras chilense*, *Arabidopsis thaliana*, *Oenothera berteriana*, *S. cereale*, *Corynae crassa*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Lupinus luteus*. Este setor apresentou escores de 194 bites ($E=3e^{-48}$) a 192 bites ($E=1e^{-47}$) para *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Rafflesia pricei*, *Cytinus ruber*. Os escores restantes para esta região variaram de 178 bites ($E=2e^{-43}$) a 68 bites ($E=4e^{-10}$) contemplando 83 organismos, incluindo algumas bactérias. O setor contendo a restrição *BanI* apresentou escores de 163 bites ($E=9e^{-39}$) com *Lepidoceras chilense* e 105 bites ($E=2e^{-21}$) com *Nicotiana tabacum*. Escores de 94 bites ($E=7e^{-18}$) a 38 bites ($E=0,36$), para esta região, contemplaram 13 organismos dentre os quais *Zea mays*, *Glycine max* e *Triticum aestivum* apresentaram menor homologia. O setor contendo o evento inserção/deleção (indel) apresentou escores de 98 bites ($5e^{-19}$) com *Arabidopsis thaliana* e 88 bites ($4e^{-16}$) com *Glycine max*. Os escores restantes foram de 84 bites ($E=7e^{-15}$) a 36 bites ($E=1,4$) para 16 organismos.

O sítio de restrição *BanI* (GGPuPyCC), localizado no gene 18S, foi caracterizado para os representantes da Rutaceae, Poaceae, Onagraceae, Cytinaceae, Brassicaceae, Santalaceae, Papilionideae, Fabaceae e Solonaceae. Neste universo, três eventos de mutação foram observados, correspondendo a duas mutações de ponto e um evento de deleção (Tabela 4). O fenótipo ausência de restrição foi observado em representantes da linhagem materna das toranjas, que apresentaram a sequência AGCGCC contendo uma transição no interior do sítio, e em *Zea mays* que apresentou uma deleção de oito pares de bases envolvendo todo o sítio *BanI*. Os outros genótipos analisados apresentaram o fenótipo presença de restrição. *Triticum aestivum*, *S. cereale* e *Oenothera berteriana* apresentaram a sequência GGTGCC. Os demais genótipos do tipo R+ apresentaram a sequência GGCGCC (Tabela 4).

Foi realizada a caracterização dos plastomas de 31 representantes do grupo “árvores de citros verdadeiros”. O plastoma I foi observado para representantes de *Poncirus* (05), *C. medica* (03) e *Microcitrus* sp. O plastoma II foi observado no subgênero *Papeda* sensu Swingle, representado por *C. ichangensis* e *C. hystrix* e nos representantes do subgênero *Citrus* Ssensu Swingle, correspondentes a *C. grandis* (02), *C. aurantium* (01), *C. limon* (01), *C. sinensis* (01), *C. paradisi* (01), *C. latifolia* (01) e *C.*

limettioides (01). O plastoma III foi observado em *C. reticulata*, *C. unhiu*, *C. sunki*, *C. clementina*, *C. tangerina*, *C. limonia*, *C. jambhiri* e *C. volkameriana*. O plastoma IV foi observado nos quatro representantes de *Fortunella* analisados, correspondendo a *F. margarita*, *F. crassifolia*, *F. japonica* e *F. hindisii* (Tabela 3).

5. DISCUSSÃO

O segmento mitocondrial 18S-5S apresentou padrão de herança materno e elevado grau de conservação para os representantes do grupo “árvores de citros verdadeiros”. As sinapomorfias observadas para o referido grupo, ocorreram em setores deste segmento que apresentaram plasticidades evolutivas distintas. Dentre estes, o setor contendo a transversão A:T→T:A apresentou um grau de conservação significativamente elevado, sugerindo a ação de maior pressão seletiva em relação aos outros setores analisados. No entanto, as sinapomorfias D+ e transversão Tv_T ocorreram sempre associadas num mesmo tipo de molécula, sugerindo que ambas foram transferidas por herança a partir de um ancestral comum. Com base nos caracteres restrição e deleção/inserção, foram observados os tipos mitocondriais D-R+, D+R+ e D-R-. O genótipo D-R+ foi considerado como “tipo ancestral”, por possuir caracteres pleisiomórficos para a subfamília Aurantioideae.

Um grupo monofilético têm sido observado dentro da tribo Citrineae (subfamília Aurantioideae), contemplando os representantes do grupo árvores de citros verdadeiros (ARAÚJO & MACHADO, 1999; SAMUEL *et al.*, 1999; 2001). Os gêneros deste grupo apresentam caracteres diagnósticos pouco consistentes, tendo recentemente sido sugerido a inclusão de outros gêneros em *Citrus* (MABBLEY, 1998; ARAÚJO *et al.*, no prelo). A análise do segmento 18S-5S revela um mesmo tipo mitocondrial, correspondendo ao genótipo D+R+, para os representantes de *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus* (*C. reticulata*, *C. limonia*, *C. volkameriana*, *C. unshio*, *C. sunki* e *C. jambhiri*). Este genótipo é caracterizado por apresentar duas sinapomorfias, que dão sustentação a um grupo monofilético formado por estes táxons. De acordo com estes dados, uma maior afinidade citoplasmática é sugerida existir entre representantes do grupo das tangerinas

e gêneros afins, em relação a outros representantes de *Citrus*, corroborando com a hipótese de *Citrus* corresponder a um grupo não monofilético.

Os representantes de *Fortunella* e *Citrus* apresentam grande afinidade genética, revelada pela análise de dados morfológicos (BARRET & RHODES, 1976, HANDA & OOGAKI, 1985) e moleculares (HERRERO *et al.*, 1996; FEDERICI *et al.*, 1998). No entanto, alguns conflitos foram observados nas relações citoplasmáticas entre representantes destes gêneros, quando se comparam os dados oriundos da mitocondriais com os de cloroplasto. A análise dos segmentos trnL(UAA) - trnF(GAA) / trnT(UGU) - trnL(UAA) do cpDNA, (ARAÚJO *et al.*, no prelo) sugere um grupo monofilético para os representantes *Citrus* (*Papeda* e linhagens maternas das tangerinas e toranjas) e outro para *Fortunella hindisii* e *Fortunella margarita*. A caracterização citoplasmática realizada neste trabalho revelou que todas as quatro espécies de *Fortunella* analisadas apresentaram plastoma do tipo IV, corroborando condição monofilética para este grupo. De outro modo, os dados de mitocôndria sugerem que representantes *Fortunella*, *Poncirus* e linhagem materna das tangerinas, cujo tipo mitocondrial corresponde a D+R+, formam um grupo monofilético. *F. hindisii* e outros representantes de *Citrus* estão fora deste clado.

A linhagem materna das tangerinas apresenta uma posição conflituosa dentro do grupo estudado, uma vez que essas compartilham sinapomorfias tanto com *Fortunella* e *Poncirus* (dados mitocondriais), quanto com outros representantes de *Citrus* (dados de cloroplasto). Tal incongruência poderia sugerir que os tipos mitocondriais D+R+ apresentaram origens independentes, através de convergência molecular. No entanto, a disposição mais parcimoniosa dos tipos mitocondriais D+R+, numa árvore gerada com base em análises dos segmentos de cloroplasto (trnL_(UAA)-trnF_(GAA)/trnT_(UGU)-trnL_(UAA)) (dados gerados no capítulo 1 dessa Tese), exige a ocorrência de pelo menos três eventos independentes de transformação de mitocôndrias do tipo D-R+ em D+R+ e um evento de reversão (D+R+ → D-R+) (Figura 3). A molécula 18S-5S apresenta elevado grau de conservação, com “plasticidade evolutiva” distinta para as regiões onde ocorreram às mutações utilizadas neste estudo. Tal fato sugere diferentes intensidades de seleção atuando nos setores analisados. Portanto, mutações ocorridas em setores mais conservados, devem apresentar uma probabilidade significativamente menor de

serem mantidas ao longo da evolução da molécula 18S-5S, em relação aos setores menos conservados, o que vem sugerir independência entre os eventos de mutação. No entanto, toda molécula do tipo D+R+ analisada apresentou as sinapomorfias D+ e Tv_T. Portanto, cada evento de transformação D+R+ ↔ D-R+ envolve duas mutações independentes. Seriam necessários, então, a ocorrência de pelo menos oito eventos de mutação para explicar a distribuição dos tipos mitocondriais no grupo estudado. Devido às características da molécula 18S-5S, da especificidade e do número de eventos de mutação necessários para explicar a ocorrência dos tipos mitocondriais, bem como do curto tempo de divergência existente entre *Poncirus*, *Citrus* e *Fortunella*, sugerido pela afinidade filogenética apresentada por estes táxons, consideramos pouco provável que tal incongruência tenha sido originada por convergência molecular. Portanto este segmento deve ter sido transferido por herança para os representantes do grupo *Citrus-Fortunella-Poncirus*, apresentando estes um “ancestral mitocondrial” comum D+R+. Este ancestral deveria ter ocorrido no sudoeste e centro da China, que corresponde ao centro de origem dos táxons *C. reticulata*, *Fortunella* e *Poncirus*.

SCORA (1975) e BARRET & RHODES (1976) propõem que *C. medica*, *C. grandis* e *C. reticulata* correspondam às espécies básicas para o subgênero *Citrus* sensu Swingle. A análise dos segmentos 18S-5S e trnL(UAA) - trnF(GAA) corrobora a separação destas espécies. Três tipos mitocondriais e de cloroplasto distinguem o citoplasma destes táxons, sugerindo duas linhagens maternas para os representantes do subgênero *Citrus*. A linhagem materna das toranjas, apresentando tipo mitocondrial D-R- e plastoma do tipo II, é formada por *C. grandis*, *C. sinensis*, *C. latifolia*, *C. limettioides*, *C. paradisi*, *C. aurantium* e *C. limon*. A mesma afinidade citoplasmática tem sido sugerida entre estes táxons, pela análise de RFLP dos genomas de cloroplasto (GREEN *et al.*, 1986) e mitocôndria (YAMAMOTO *et al.*, 1993). Já a linhagem materna das tangerinas, caracterizada pelo tipo mitocondrial D+R+ e plastoma do tipo III, é formada por *C. reticulata*, *C. sunki*, *C. unshiu*, *C. clementina*, *C. tangerina*, *C. limonia*, *C. jambhiri* e *C. volkameriana*. *C. medica* apresenta tipo mitocondrial D-R+ e plastoma do tipo I. Ambas linhagens maternas são corroboradas pela filogenia dos segmentos intergênicos de cloroplasto trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT(UGU) - trnL(UAA) (capítulo 1 dessa Tese).

A análise dos segmentos 18S-5S e trnL(UAA) - trnF(GAA) não sustenta a classificação proposta por SWINGLE (1943) que segrega os representantes de *Citrus* nos subgêneros *Papeda* e *Citrus* sensu Swingle. Um mesmo tipo de plastoma (tipo II) é observado para *C. grandis* e representantes *Papeda*, diferente daquele apresentado por *C. reticulata* (tipo III) e *C. medica* (tipo I). Os dados de cloroplasto sugerem grupo monofilético para representantes *Papeda*, *C. grandis* e *C. reticulata* (ARAÚJO *et al.*, no prelo), tendo *C. medica* apresentado uma ampla divergência citoplasmática em relação aos outros representantes de *Citrus* (GREEN *et al.*, 1986; HANDA *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1993; ARAÚJO *et al.*, no prelo). Além disto, a análise mais parcimoniosa dos dados mitocondriais (18S-5S) sugere que *C. grandis* (D-R-) e representantes *Papeda* (D-R+) compartilhem de um ancestral materno mais recente do que *C. reticulata* (D+R+). A transformação do genótipo D-R+ para D-R- exigiria apenas uma mutação de ponto do tipo transição dentro do sítio de restrição *BanI*, contra três eventos distintos de mutação (restrição, deleção e transversão) que se fazem necessários para uma transformação do tipo D+R+ em D-R-. Estes dados estão de acordo com as análises isoenzimáticas (HERRERO *et al.*, 1996) e genômicas (FEDERICI *et al.*, 1998), que também sugerem a existência de uma maior afinidade genética entre representantes *Papeda* e *C. grandis* em relação a *C. reticulata* e *C. medica*.

Estudos filogenéticos sugerem que as cidras tenham contribuído na formação das limas e dos limões (MALIK *et al.*, 1974). Uma clara afinidade genética é verificada entre estes táxons, revelada pela análise de dados morfológicos (BARRET & RHODES, 1976; MALIK *et al.*, 1974), bioquímicos (POTVIN *et al.*, 1983), isoenzimáticos (HERRERO *et al.*, 1996) e genômicos (FEDERICI *et al.*, 1998). No entanto os dados citoplasmáticos sugerem ampla divergência entre cidras e os representantes destes dois grupos (GREEN *et al.*, 1986; HANDA *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1993; ARAÚJO & MACHADO, capítulo 1 dessa tese). Os limões Cravo, Rugoso e Volkameriano apresentam tipo mitocondrial D+R+ e plastoma III, enquanto Eureka possui tipo mitocondrial D-R- e plastoma II. Os representantes das limas apresentam os tipos mitocondriais D-R- (Tahiti e lima da Pérsia) e D-R+ (Galego) e plastoma do tipo II. Estes dados sugerem que *C. limon*, *C. latifolia* e *C. limettioides* apresentam afinidade

materna com o grupo das toranjas, podendo qualquer um dos seus representantes ser o parental materno destes táxons.

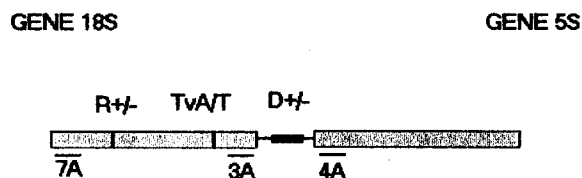
C. reticulata é considerado como um dos parentais de *C. jambhiri* (SWINGLE & REECE, 1967; BARRET & RHODES, 1976). Para a origem de *C. volkameriana* foi proposto o cruzamento *C. medica* x *C. aurantium* (DENG *et al.*, 1996; NICOLSI *et al.*, 2000). Os dados oriundos de mtDNA (18S-5S) e cpDNA (trnL_(UAA)-trnF_(GAA)), indicam que o cruzamento *C. medica* x *C. aurantium* não deva ter dado origem a *C. volkameriana*, e sugerem que *C. reticulata* corresponda ao provável parental materno na formação destes táxons. Esses dados citoplasmáticos apoiam a sugestão do cruzamento *C. medica* x *C. jambhiri* para a origem de *C. limonia* (HODGSON, 1967), uma vez *C. jambhiri* e *C. limonia* participam de uma mesma linhagem materna.

Táxons com padrão de evolução reticulado podem apresentar genomas de origens ancestrais distintas. Conseqüentemente, incongruências nas inferências filogenéticas têm sido observadas quando se analisam diferentes genomas da célula, em espécie de origem híbrida (RIESEBERG & SOLTIS, 1991; SANG *et al.*, 1997; SOLTIS & KUZOFF, 1995; WOLFE & ELISENS, 1995). Alguns conflitos foram observados nas relações citoplasmáticas entre os táxons *Fortunella* e *Citrus reticulata*, quando se comparou os dados do segmento trnL(UAA) - trnF(GAA) com os do 18S-5S. Estes conflitos poderiam ser explicados pela ocorrência de segregação de organelas ao longo do processo de formação destes táxons. SHORE & TRIASSI (1998), estudando *Turnera ulmifolia*, verificaram que a herança biparental de organelas citoplasmáticas, seguida de segregação somática, tem originado indivíduos quiméricos. Em *Citrus*, as organelas citoplasmáticas são consideradas como uma das causas da origem de mosaicos somáticos (Figura 4), podendo este padrão ser transferido para progênes tanto de origem nucelar quanto zigótica (CAMERON & FROST, 1969). Portanto a segregação vegetativa em um indivíduo quimérico poderia originar setores com as diferentes combinações de organelas (p. ex. D+R+/plastoma III; D+R+/plastoma IV; D-R+/plastoma IV), que através da embriogênese nucelar poderia resultar em indivíduos não quiméricos. Muito embora o padrão de herança do segmento 18S-5S se apresente como uniparental, herança biparental pode ser observada para as organelas citoplasmáticas em plantas. Portanto, a ocorrência de poucos eventos de herança

biparental envolvendo as organelas citoplasmáticas, e posterior fixação dos diferentes tipos citoplasmáticos pela ação da deriva genética, poderia explicar a incongruência entre as relações filogenéticas observadas a partir da análise dos genomas de mitocôndria e cloroplasto em *Citrus* e *Fortunella*. Tal proposta pressupõe a ocorrência de hibridação entre estes táxons. No entanto, é pouco provável que a possível mistura citoplasmática tenha sido resultado da manipulação do homem, uma vez que os dados sugerem uma origem citoplasmática única para as tangerinas (tipo mitocondrial D+R+ e de plastoma III), sendo este grupo considerado como o de maior diversidade genética dentro do subgênero *Citrus*. Por sua vez, estes táxons apresentam compatibilidade sexual, afinidade filogenética e condição de simpatria (sudoeste da China), que corroboram hipótese de introgressão natural ao longo da sua formação.

Uma grande diferença no padrão de evolução dos genomas de cloroplasto e mitocôndria é observada em plantas. No entanto, a análise das regiões de cloroplasto trnL(UAA) - trnF(GAA) e trnT(UGU) - trnL(UAA) e mitocôndria (18S-5S) sugerem as mesmas linhagens maternas (linhagens das toranjas e tangerinas), dentro do subgênero *Citrus*. Estes dados também sugerem que *Citrus* não deva corresponder a uma unidade taxonômica isolada dos representantes dos gêneros *Fortunella* e *Poncirus*, uma vez que é observada uma maior afinidade citoplasmática entre estes táxons e representantes de *Citrus* em relação a *C. medica*. Um padrão de evolução complexo, envolvendo herança biparental de organelas e introgressão intergenérica parece compor o processo de formação de *Citrus*.

A



B

Genótipo R+

5'-GGGAGCCGCGCCTTTCTGAAGCACTTTCTAGTGTGCTGCGCGCTTTAGTTTGATTGCAGC-3'

Genótipo R-

5'-GGGAGCCAGCGCCTTTCTGAAGCACTTTCTAGTGTGCTGCGCGCTTTAGTTTGATTGCAGC-3'

Genótipo Tv_A

5'-TAGTGGTACACAGAAGTCATGGGTGATCATTGGTCCGATGCTTCGGGCGAAACCAATTCC-3'

Genótipo Tv_T

5'-TAGTGGTACACAGAAGTCATGGGTGATCATTGGTCCGATGCTTCGGGCGAAACCTATTCC-3'

Genótipo D-

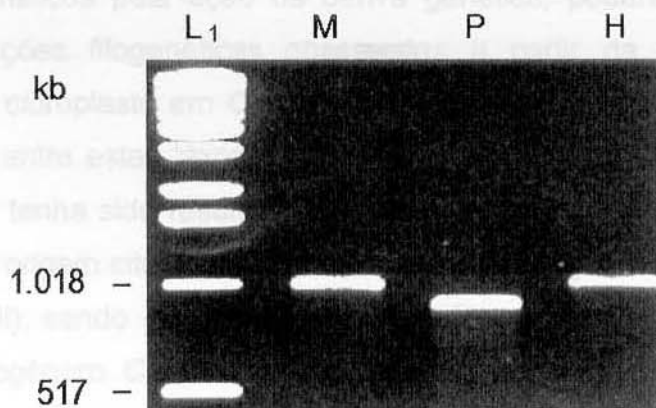
5'-GCCC GCCGCCAGTGGGAAGCAAGCTAGCCCCCTATGTTGGTTGGGGGAAGAGGGCATTTC-3'

Genótipo D+

5'-GCCC GCCGCCAGTGGGAAGCAAGCTAGCCCCCT-----GGTTGGGGGAAGAGGGCATTTC-3'

Figura 1. Região intergênica do mtDNA 18S-5S. A) Localização dos setores restrição (R+/-), transversão (TvA/T) e deleção/inserção (D+/-) e dos iniciadores 7A , 4A e 3A. B) Sequência de parte dos setores contendo os caracteres restrição, transversão e deleção/inserção: R+ (presença de restrição), R- (ausência de restrição); Tv_T (presença da transversão) Tv_A (ausência da transversão); D- (presença do pentanucleotídeo 3'ATGTT⁵) e D+ (ausência do pentanucleotídeo 3'ATGTT⁵).

A



B

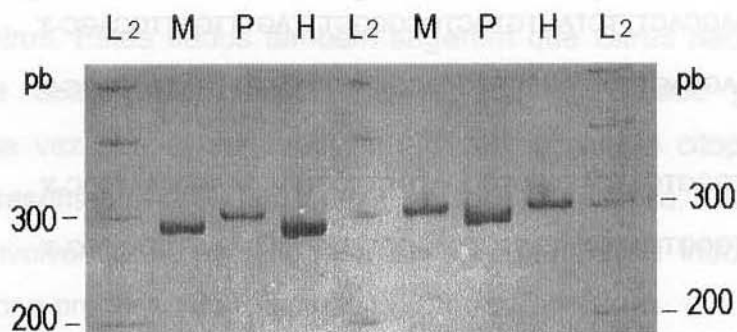


Figura 2. Padrão de herança do segmento 18S-5S. A - caráter restrição *Ban*I (segmento 7A-4A)- *C. paradisi*; *P. trifoliata* e híbrido (*C. paradisi* x *P. trifoliata*); B- caráter deleção (segmento 3A-4A)- *C. sinensis*, *C. limonia*, híbrido (*C. sinensis* x *C. limonia*). L1-ladder = 1kb; L2-ladder = 100pb; M= parental materno; P=parental paterno; H=híbrido.

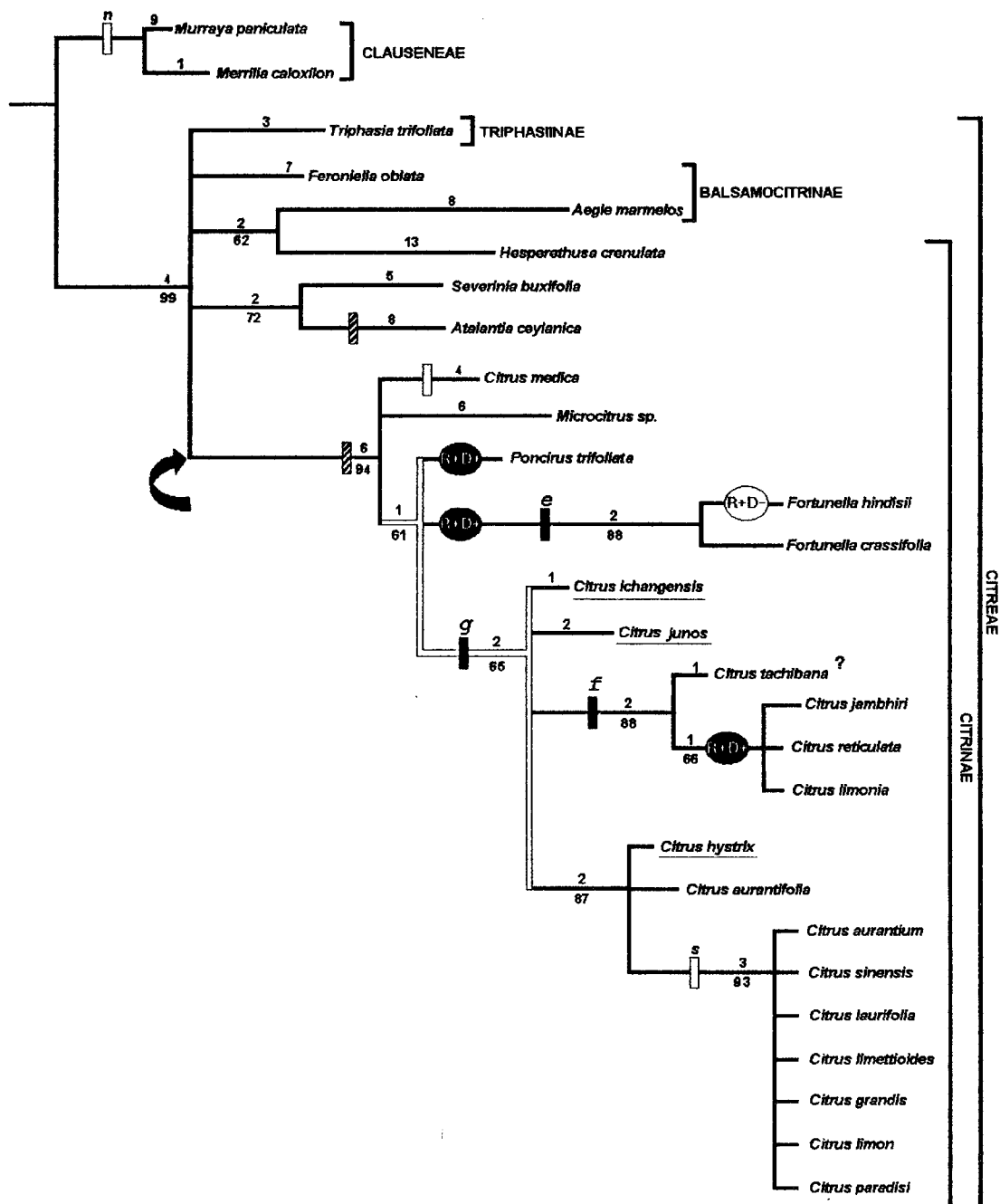


Figura 3. Distribuição dos tipos mitocondriais D+R+ em uma das árvores filogenéticas geradas para os representantes da subfamília Aurantioideae com base nas seqüências intergênicas trnL(UAA)-trnF(GAA) e trnT(UGU)-trnL(UAA). Círculo preto= Tipo mitocondrial D+R+; Círculo branco= reversão D+R+→D-R+; ?=ausência de informação do tipo mitocondrial.

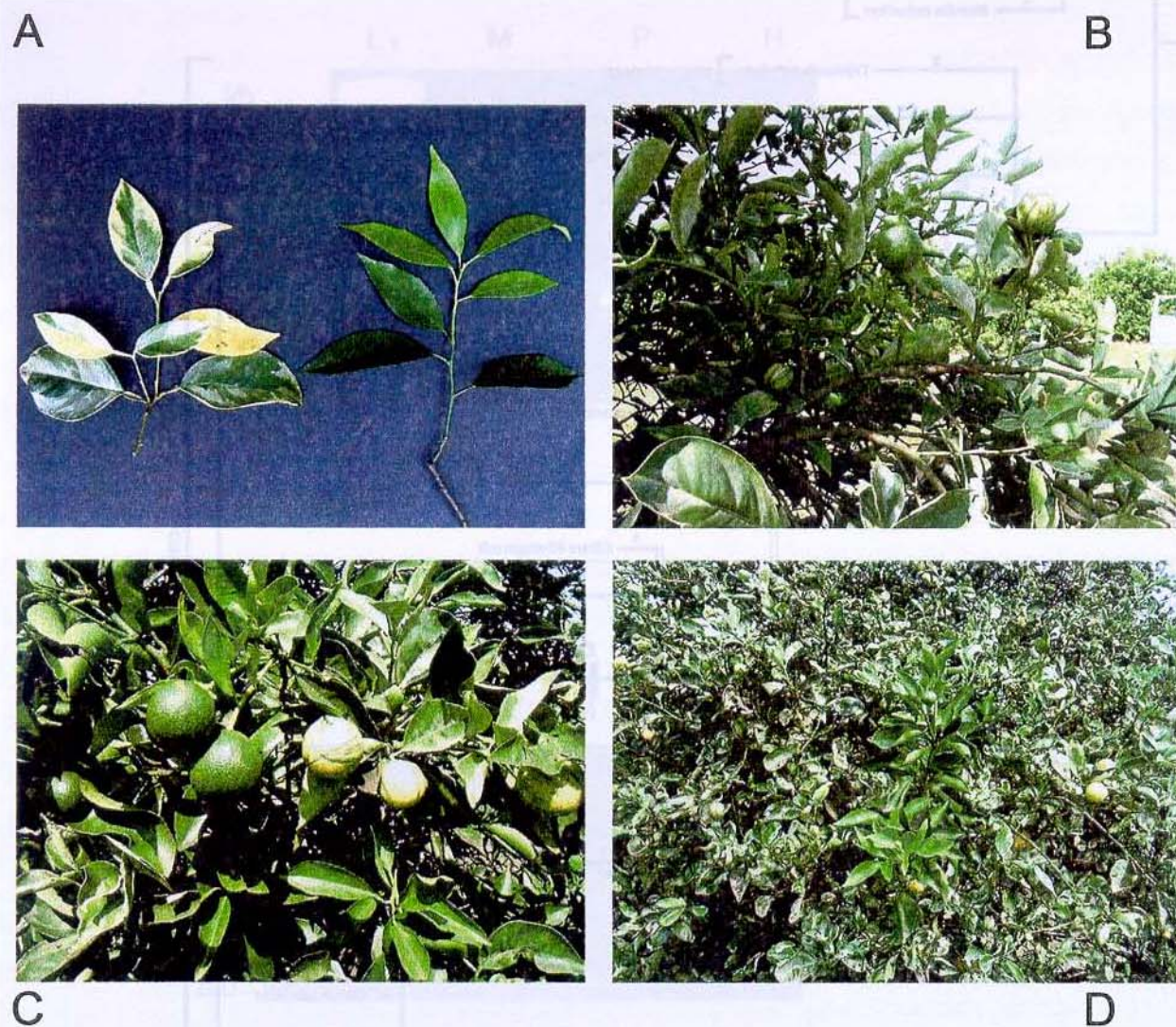


Figura 4. Padrão variegado em *Citrus*. A: ramo apresentando padrão quimérico e ramo normal; B: Fruto quimérico e fruto normal originado de um mesmo ramo, C: vista frontal de frutos quiméricos e frutos normais; D: Vista geral de um ramo normal fixado numa planta quimérica.

Tabela 1. Caracterização citoplasmática de representantes da subfamília Aurantioideae com base nos caracteres restrição (R+ ; R-), inserção/deleção (D+ ; D-) e transversão (Tv_A ; Tv_T) da região 18S-5S e tipos de cloroplasto (I, II, III e IV) com base nos tipos de segmentos (aurantioideae, citrus, reticulata e fortunella) apresentados pela região trnL(UAA) - trnF(GAA).

Espécies	18S-5S			trnL(UAA)-trnF(GAA)	
	Restrição	Deleção	Transversão	Segmento	Tipos de cloroplasto
<i>Murraya paniculata</i>	R+	D-	Tv _A	Aurantioideae	I
<i>Merrilia caloxilon</i>	R+	D-	Tv _A	Aurantioideae	I
<i>Hesperethusa crenulata</i>	R+	D-	Tv _A	Aurantioideae	I
<i>Atalantia monophylla</i>	R+	D-	Tv _A	Aurantioideae	I
<i>Triphasia trifolia</i>	R+	D-	Tv _A	Aurantioideae	I
<i>Severinia buxifolia</i>	R+	D-	Tv _A	Aurantioideae	I
<i>Feroniella oblata</i>	R+	D-	Tv _A	Aurantioideae	I
<i>Microcitrus sp.</i>	R+	D-	Tv _A	Aurantioideae	I
<i>Poncirus trifoliata</i>	R+	D+	Tv _T	Aurantioideae	I
<i>Fortunella margarita</i>	R+	D+	Tv _T	Fortunella	IV
<i>C. medica</i>	R+	D-	Tv _A	Aurantioideae	I
<i>C. ichangensis</i>	R+	D-	Tv _A	Citrus	II
<i>C. hystrix</i>	R+	D-	Tv _A	Citrus	II
<i>C. reticulata</i>	R+	D+	Tv _T	Reticulata	III
<i>C. grandis</i>	R-	D-	Tv _A	Citrus	II

Tabela 2. Tipos citoplasmáticos dos representantes do subgênero *Citrus* baseado nos caracteres deleção/inserção e restrição do segmento mitocondrial 18S-5S.

Swingle (1943)	Tanaka (1961)	Clone	Genótipo	Acesso
<i>C. medica</i>	<i>C. medica</i>	Doce	D-R+	CN364
		of commerce	D-R+	CV365
		Etrog	D-R+	CV367
		Mindanao	D-R+	CN693
		Diamante	D-R+	CN689
		Mão de buda	D-R+	CN687
		D.J.-=RJ	D-R+	CN686
<i>C. reticulata</i>	<i>C. reticulata</i>	Ponkan	D+R+	CN224
	<i>C. unshio</i>	Satsuma 'Owari'	D+R+	CV169
	<i>C. sunki</i>	Sunki	D+R+	CV200
	<i>C. clementina</i>	Clementina	D+R+	CV174
	<i>C. tangerina</i>	Dancy	D+R+	CV427
<i>C. grandis</i>	<i>C. grandis</i>	Siamesa	D-R-	CV357
		151-428	D-R-	CV347
		Sunshine	D-R-	CV350
		Shatenayan	D-R-	CV354
		Indochina	D-R-	CV358
<i>C. sinensis</i>	<i>C. sinensis</i>	Pêra	D-R-	MAT
		Hamlin	D-R-	MAT
		Caipira	D-R-	MAT
<i>C. aurantium</i>	<i>C. aurantium</i>	São Paulo	D-R-	CV244
<i>C. paradisi</i>	<i>C. paradisi</i>	Duncan	D-R-	CV333
<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Galego	D-R+	CN323
	<i>C. limettioides</i>	Lima da Pérsia	D-R-	CN318
	<i>C. latifolia</i>	Tahiti	D-R-	CN654
<i>C. limon</i>	<i>C. limon</i>	Eureka	D-R-	CN644
	<i>C. jambhiri</i>	Rugoso da Flórida	D+R+	CN695
	<i>C. limonia</i>	Limão Cravo	D+R+	CN685
	<i>C. volkameriana</i>	Volkameriano	D+R+	TEL

Tabela 3. Caracterização citoplasmática de representantes de *Fortunella*, *C. reticulata* e *Poncirus* com base nos caracteres restrição, deleção e transversão da região 18S-5S e tipos de cloroplasto (I, III e IV) com base nos tipos de segmentos trnL(UAA) - trnF(GAA) (SA = segmento aurantioideae; SR=segmento reticulata; SF=segmento fortunella).

Espécies (Swingle & Reece, 1967)	Clone	Restrição	18S-5S		trnL(UAA)-trnF(GAA)	
			Deleção	Transversão	Tipo de Segmento	Tipo de cloroplasto
<i>P. trifoliata</i>	Davis A	R+	D+	Tv _T	SA	I
	Small flower	R+	D+	Tv _T	SA	I
	Rubidoux	R+	D+	Tv _T	SA	I
	English large	R+	D+	Tv _T	SA	I
<i>C. reticulata</i>	Dancy	R+	D+	Tv _T	SR	III
	Sunki	R+	D+	Tv _T	SR	III
	Clementina	R+	D+	Tv _T	SR	III
	Satsuma	R+	D+	Tv _T	SR	III
	Ponkan	R+	D+	Tv _T	SR	III
<i>F. crassifolia</i>		R+	D+	Tv _T	SF	IV
<i>F. japonica</i>		R+	D+	Tv _T	SF	IV
<i>F. margarita</i>		R+	D+	Tv _T	SF	IV
<i>F. hindisii</i>		R+	D-	Tv _A	SF	IV

Tabela 4. Caráter restrição *BanI* apresentado pelo segmento 18S-5S em representantes das famílias Poaceae, Onagraceae, Cytinaceae, Brassicaceae, Santalaceae, Papilionideae, Solanaceae e Rutaceae: PR=Presença de restrição; AR=ausência de restrição.

Família	Espécie	Genótipo	Sítio de restrição <i>BanI</i>	Fenótipo
Poaceae	<i>Triticum aestivum</i> ¹	R+	GGTGCC	P R
	<i>Zea mays</i> ¹	R-	Deleção do sítio (8 pb)	A R
	<i>S. cereale</i> ¹	R+	GGTGCC	P R
Onagraceae	<i>O. berteriana</i> ¹	R+	GGTGCC	P R
Cytinaceae	<i>Cytinus ruber</i> ¹	R+	GGCGCC	P R
Brassicaceae	<i>A. thaliana</i> ¹	R+	GGCGCC	P R
Santalaceae	<i>L. chilensis</i> ¹	R+	GGCGCC	P R
Papilionideae	<i>Lupinus luteus</i> ¹	R+	GGCGCC	P R
Fabaceae	<i>Glycine max</i> ¹	R+	GGCGCC	P R
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i> ¹	R+	GGCGCC	P R
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>Fagara rhoifolia</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>Hellietta cuspidata</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>Murraya paniculata</i>	R+	GGCGCC	P R
	<i>Severinia buxifolia</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>H. crenulata</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>A. monophylla</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>Aegle marmelos</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>Feroniella oblata</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>Microcitrus sp.</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>Poncirus trifoliata</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>F. crassifolia</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>Citrus hystrix</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>C. medica</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>C. reticulata</i> ²	R+	GGCGCC	P R
	<i>C. grandis</i> ²	R-	AGCGCC	A R
	<i>C. aurantium</i> ²	R-	AGCGCC	A R
	<i>C. sinensis</i> ²	R-	AGCGCC	A R
	<i>C. limon</i> ²	R-	AGCGCC	A R
	<i>C. latifolia</i> ²	R-	AGCGCC	A R
	<i>C. limmetioides</i> ²	R-	AGCGCC	A R
	<i>C. paradis</i> ²	R-	AGCGCC	A R

Obs: ¹Informações obtidas do banco de dados GenBank.

²Caracterização direta do produto de amplificação, clivagem (*BanI*) e/ou sequenciamento da região 18S-5S.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-JANABI, S.M.; McCLELLAND, M.; PETERSEN, C.; SOBRAL, B.W.S. (1994) Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: Saccharinae. *Theor. Appl. Genet.* 88, 933-944.
- ARAÚJO, E.F.; MACHADO, M.A. (1999) Inferência filogenética de *Citrus* inferida a partir da evolução das regiões trnL(UAA)-trnF(GAA) e trnT(UGU)-trnL(UAA). Abstracts. 45^o Congresso Nacional de Genética, Gramado-RS Brazil, 3-6 October, 1999, v. 22 n^o 3 pp.382.
- ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, L.P.; MACHADO, M.A. What is *Citrus* ? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae)¹. *Org. Diver.Evol.* (no prelo).
- BARRET, H.C.; RHODES, A. M. (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst. Bot.* 1, 105-136.
- BOBLENZ, K.; NOTHNAGEL, T.; METZLAFF, M. (1990) Paternal inheritance of plastids in the genus *Daucus*. *Mol. Gen. Genet.* 220, 489-491.
- CRUZAN, M.B.; ARNOLD, M.L.; CARNEY, S.E.; WOLLENBERG, K.R. (1993) cpDNA inheritance in interspecific crosses and evolutionary inference in Louisiana irises. *Am. J. Bot.* 80, 344-350.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. (1969) Genetics, breeding and nucellar embryony. In Reuther W., Webber H.J., Batchelor L.D. (eds). *The Citrus industry*, Vol. 2, 2nd ed. University of California, Berkeley, pp. 325-370.
- DENG, Z.N.; GENTILE, A.; NICOLOSI, E.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. (1996) Parentage determination of some citrus hybrids by molecular markers. *Proc. Int. Soc. Citricul.* 2:849-854.
- DONG, J.; WAGNER, D.B. (1994) Paternally inherited chloroplast polymorphism in *Pinus*: Estimation of Diversity and Population subdivision, and tests of disequilibrium with a maternally inherited mitochondrial polymorphism. *Genetics* 136, 1187-1194.
- ERICKSON, L.; KEMBLE, R. (1990) Paternal inheritance of mitochondria in rapessed (*Brassica napus*). *Mol. Gen. Genet.* 222, 135-139.

- ERICKSON, L.; KEMBLE, R.; SWANSON, E. (1989) The *Brassica* mitochondrial plasmid can be sexually transmitted. Pollen transfer of a cytoplasmic genetic element. *Mol. Gen. Genet.* 218, 419-422.
- FEDERICI, C.T.; FANG, D.Q.; SCORA, R.W.; ROOSE, M.L. (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analyses. *Theor. Appl. Genet.* 96, 812-822.
- GREEN, R.M.; VARDI, A.; GALUN, E. (1986) The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species, and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.* 72, 170-177.
- HANDA, T.; ISHIZAWA, Y.; OOGAKI, C. (1986) Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. *Japan. J. Gent.* 61, 15-24.
- HANDA, T.; OOGAKI, C. (1985) Numerical taxonomic study of *Citrus* L. and *Fortunella* Swingle using morphological characters. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 54, 145-154.
- HARRIS, S.A.; INGRAM, R. (1991) Chloroplast DNA and biosystematics: The effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* 40, 393-412.
- HAVEY, M.J. (1997) Predominant paternal transmission of the mitochondrial genome in Cucumber. *J. Heredity.* 88 (3):232-235.
- HERRERO, R.; ASINS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, A.E.; NAVARRO, L. (1996) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1327-1334.
- MABBERLEY, D.J. (1998) Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae). *Telopea.* 7 (4):333-344.
- MACHADO, M.A.; COLLETA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; POMPEU J.JR. (1996) Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica.* 92, 321-326.
- MALIK, M.N.; SCORA, R.W.; SOOST, R.K. (1974) Studies on the origin of the lemon. *Hilgardia* 42, 361-382.
- MASON, R.; HOLSINGER, K.; JANSEN, R. (1994) Biparental inheritance of the chloroplast genome in *Coreopsis* (Asteraceae). *J. Heredity.* 85, 171-173.

- McCAULEI, D.E. (1994) Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 8127-8131.
- McCAULEI, D.E. (1995) The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* 10, 198-202.
- MEDGYESY, P.; PAY, A.; MARTON, L. (1986) Transmission of parental chloroplasts in *Nicotiana*. *Mol. Gen. Genet.* 204, 195-198.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.* 8, 4321-4325.
- NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; La MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATTO, E. (2000) *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 1155-1166.
- PALMER, J.D. (1992) Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. In Soltis, P.S.; Soltis, D.E.; Doyle, J.J. (eds) *Molecular systematics of plants*. Chapman and Hall, New York London, pp 36-49.
- POTVIN, C.; BERGERON, Y.; SIMON, J.P. (1983) A numerical taxonomic study of selected *Citrus* species (Rutaceae) based on biochemical characters. *Syst. Bot.* 8, 127-133.
- RIESEBERG, L.H.; SOLTIS, D. E. (1991) Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evol. Trends Plants* 5, 65-84.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS T. (1989) *Molecular Cloning a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SAMUEL, R. H.; GREGER, H.; CHASE, M.; EHRENDORFER, F. (1999) Phylogeny of Rutaceae-Aurantioideae: multidisciplinary studies, in particular cpDNA sequences from the *atpB/rbcL* spacer. Abstracts, XVI International Botanical Congress, St. Louis, USA, 1-7 August, 1999, pp.438.
- SANG, T.; CRAWFORD, D.J.; STUESSY, T.F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 84(8): 1120-1136.
- SCORA, R.W. (1975) On the history and origin of *Citrus*. *Bull. Torrey Bot. Club* 102, 369-375.
- SHORE, J. S.; TRIASSI, M. (1998) Paternally biased cpDNA inheritance in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Am. J. Bot.* 85 (3):328-332.

- SMITH, S.E. (1989) Biparental inheritance of organelles and its implications in crop improvement. *Plant Breed. Ver.* 6, 361-393.
- SOLTIS, D.E.; KUZOFF, R.K. (1995) Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the *Heuchera* group (Saxifragaceae). *Evolution*. 49, 727-742.
- SWINGLE, W.T. (1943) The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily. In Webber H.J. and L.D. Batchelor (eds.) *The Citrus industry*, Vol. I. University of California, Berkeley, pp. 129-474.
- SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In Reuther W., Webber H.J., Batchelor L.D. (eds). *The Citrus industry*, Vol. 1, 2nd ed. University of California, Berkeley, pp. 190-430.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17, 1105-1109.
- TANAKA, T. (1961) *Citrologia* (Semi-centennial commemoration papers on *Citrus* studies). Citrologia Supporting Foundation, Osaka, Japan.
- YAMAMOTO, M.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; YAMADA, Y. (1993) Phylogenetic relationships of *Citrus* revealed by diversity of cytoplasmic genomes. In Hayashi T, Omura M, Scott NS (eds) *Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees*. Fruit Trees Research Station, Okitsu, Japan, pp. 39-46.
- WALBOT, V. ; CULLIS, C. A. (1985) Rapid genomic change in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 367-96.
- WAGNER, D.B. (1992) Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New For.* 6, 373-390.
- WOLFE, A. D.; ELISENS, W. J. (1995) Evidence of chloroplast capture and pollen-mediated gene flow in *Penstemon* section *Peltanthera* (Scrophulariaceae). *Syst. Bot.* 20, 395-412.

CONCLUSÕES

- Os representantes da tribo Citreae formaram um clado separado de *Murraya* e *Merrilia* (tribo Clauseneae).
- As subtribos Balsamocitrinae, Triphasiinae e Citrinae se apresentaram como uma politomia basal no clado Citreae, não sendo sustentado o agrupamento proposto por SWINGLE & REECE (1967).
- O grupo subtribal “árvores de citros verdadeiro” (“True Citrus Fruit Trees”) corresponde a um grupo natural dentro da tribo Citreae. Não foi sustentada a condição monofilética para os grupos subtribais “árvores de citros primitivos” “Primitive Citrus Fruit Trees” e “árvores de frutos relacionados a citros (“Near-Citrus Fruit Trees”).
- *Citrus* se apresentou como grupo polifilético. Uma classificação mais natural para o referido grupo foi proposta, com a inclusão de *Microcitrus*, *Eremocitrus*, *Poncirus* e *Fortunella* em *Citrus*.
- *C. medica* apresentou uma ampla divergência citoplasmática dentro do grupo, não tendo participado como parental materno na formação das espécies comerciais de citros. Um padrão de evolução reticulado, com possível introgressão de representantes de “árvores de citros verdadeiro” (“True Citrus Fruit Trees”) foi proposto para a sua origem.
- Duas linhagens maternas foram definidas para os representantes de *Citrus* subgênero *Citrus* com base na análise do mtDNA e cpDNA. A linhagem das toranjas é formada por *C. grandis*, *C. aurantium*, *C. limon*, *C. limettioides*, *C. latifolia*, *C. paradisi* e *C. sinensis*, e a linhagem das tangerinas é formada por *C. reticulata* (‘Sunki’, ‘Ponkan’, ‘Clementina’, ‘Dancy’ e ‘Satsuma’), *C. limonia*, *C. jambhiri* e *C. volkameriana*. *C. grandis* e *C. reticulata* compõem a base materna da formação das “espécies” comerciais de citros.

- *C. reticulata* apresentou uma posição conflitua dentro do grupo “árvores de citros verdadeiros”. Os dados de origem mitocondrial sugerem a formação de um clado com *C. reticulata*, *Poncirus* e *Fortunella*, enquanto os dados originados de cloroplasto sugerem a formação de um clado com *C. reticulata* e *Citrus* spp. (exceção de *C. medica*). A hipótese apresentada para explicar tal incongruência sugere a ocorrência de um híbrido citoplasmático no processo de formação das tangerinas, com possível segregação de organelas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS REFERENTES À REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- AMORIN, D.S (1997) Elementos Básicos de Sistemática Filogenética. 2^a ed. Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Entomologia. Ribeirão Preto, SP, pp. 276.
- BARRET, H.C.; RHODES, A.M. (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. Syst. Bot. 1, 105-136.
- BOBLENZ, K.; NOTHNAGEL, T.; METZLAFF, M. (1990) Paternal inheritance of plastids in the genus *Daucus*. Mol. Gen. Genet. 220, 489-491.
- BURKILL, I. H. (1931) An enumeration of the species of *Paramignya*, *Atalantia* and *Citrus*, found in Malaya. Gard. Bull. Straits Settlem. 5, 212-220.
- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; MOREIRA, M.C.P.Q.D.G.; POMPEU, J.Jr. (1998) Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp) using RAPD markers. Euphytica. 102 (1):133-139.
- DONG, J.; WAGNER, D.D.B. (1994) Paternally inherited chloroplast polymorphism in *Pinus*: Estimation of Diversity and Population subdivision, and tests of disequilibrium with a maternally inherited mitochondrial polymorphism. Genetics 136, 1187-1194.
- ENGLER, A. (1896) Rutaceae. In Engler A.; Prantl, K. (eds.), Die natürlichen Pflanzenfamilien. Engelmann, Leipzig, teil 3, abt. 4, pp. 95-201.
- ENGLER, A. (1931) Rutaceae. In Engler, A.; Prantl, K. (eds.), Die natürlichen Pflanzenfamilien, ed. 2. Engelmann, Leipzig, 19a, pp. 187-359.
- ERICKSON, L.; KEMBLE, R.; SWANSON, E. (1989) The *Brassica* mitochondrial plasmid can be sexually transmitted. Pollen transfer of a cytoplasmic genetic element. Mol. Gen. Genet. 218, 419-422.
- ERICKSON, L.; KEMBLE, R. (1990) Paternal inheritance of mitochondria in rapessed (*Brassica napus*). Mol. Gen. Genet. 222, 135-139.
- FANG, D.; KRUEGER, R.R.; ROOSE, M.L. (1998) Phylogenetic Relationships among Selected *Citrus* Germplasm Accessions Revealed by Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123 (4):612-617.
- FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. (1997) Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor. Appl. Genet. 95, 408-417.

- FEDERICI, C.T.; FANG, D.Q.; SCORA, R.W.; ROOSE, M. L. (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96, 812-822.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. (1968) Seed production: development of gametes and embryos. In Reuther, Batchelor and Webber (ed.), *The Citrus Industry*, Univ. Calif. Press. Berkeley. 2, 290-324.
- GMITTER, F.G. (1995) Origin, evolution, and breeding of the grapefruit. In Janick J (ed) *Plant breeding reviews*. John Wiley and Sons, New York, vol 13, pp. 345-363.
- GREEN, R.M.; VARDI, A.; GALUN, E. (1986) The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species, and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.* 72, 170-177.
- GUERRA, M. (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High Chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71, 234-241.
- GUERRA, M.; DOS SANTOS, K.G. B.; SILVA, A.E. B.; EHRENDORFER, F. (2000) Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - a case of parallel chromosomal evolution. *Am. J. Bot.* 87 (5): 735-747.
- GULSEN, O.; ROOSE, M.L. (2001) Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126:(2) 210-215.
- HANDA, T.; ISHIZAWA, Y.; OOGAKI, C. (1986) Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. *Japan J. Gent.* 61, 15-24.
- HAVEY, M.J. (1997) Predominant paternal transmission of the mitochondrial genome in Cucumber. *J. Heredity.* 88 (3):232-235.
- HERRERO, R.; ASINS, M.J.; CARBONELL, A.E.; NAVARRO, L. (1996a). Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92, 599-609.
- HERRERO, R.; ASINS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, A.E.; NAVARRO, L. (1996b) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1327-1334.
- HIRAI, M.; KOZAKI, I. (1981) Isozymes of *Citrus* Leaves. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1:10-13.

- HODGSON, R.W. (1969) Horticultural varieties of *Citrus*. In: Reuther, W.; Webber, H.J.; Batchelor, L.B. (eds.), *The Citrus Industry*, vol. 1, pp. 431-591. University of California, Berkeley.
- IWAMASA, M.; NITO, N. (1988) Cytogenetics And The Evolution Of Modern Cultivated Citrus. In Goren, R.K. ; Mendel, K. (eds.) *Proc. 6th Int. Citrus, Cong*, vol. 1, pp. 265-275. Margraf Publ, Weikersheim, Germany.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. (1999) *Plants Systematics: A phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- LURO, F.; LAIGRET, F.; BOVÉ, J.M.; OLLITRAULT, P. (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (R.A.P.D.) to *Citrus* genetics and taxonomy. *Proc. Int. Soc. Citricult.*, 226-228.
- Li, W.-H. (1997) *Molecular evolution*. Sinauer Associates sunderland, Massachusetts, USA.
- MABBERLEY, D. J. (1998) Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae). *Telopea* 7 (4): 333-344.
- MALIK, M.N.; SCORA, R.W.; SOOST, R.K. (1974) Studies on the origin of the lemon. *Hilgardia* 42, 361-382
- MASON, R.; HOLSINGER, K.; JANSEN, R. (1994) Biparental inheritance of the chloroplast genome in *Coreopsis* (Asteraceae). *J. Heredity*. 85, 171-173.
- MEDGYESY, P.; PAY, A.; MARTON, L. (1986) Transmission of parental chloroplasts in *Nicotiana*. *Mol. Gen. Genet.* 204, 195-198.
- PALMER, J.D. (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am. Nat.* 130, 6-29.
- PALMER, J.D. (1992) Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. In Soltis, P.S.; Soltis, D.E.; Doyle J.J. (eds) *Molecular systematics of plants*. Chapman and Hall, New York London, pp. 36-49.
- POTVIN, C.; BERGERON, Y.; SIMON, J.P. (1983) A numerical taxonomic study of selected *Citrus* species (Rutaceae) based on biomechemical characters. *Syst. Bot.* 8, 127-133.

- RAHMAM, M.M.; NITO, N.; ISSHIKI, S. (1994) Genetic analyses of phosphoglucisomerase isozymes in "true citrus fruit trees". *Sci. Hortic.* 60, 17-22.
- SAMUEL, R.H.; GREGER, H.; CHASE, M.; EHRENDORFER, F. (1999) Phylogeny of Rutaceae-Aurantioideae: multidisciplinary studies, in particular cpDNA sequences from the *atpB/rbcL* spacer. Abstracts, XVI International Botanical Congress, St. Louis, USA, p. 438.
- SAMUEL, R.; EHRENDORFER, F.; CHASE, M.W.; GREGER, H. (2001) Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. *Plant Biol.* 3, 77-87.
- SCORA, R.W. (1975) On the history and origin of *Citrus*. *Bull. Torrey Bot. Club* 102, 369-375.
- SCORA R.W. (1988) Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated *Citrus*. In Goren, R.; Mendel, K. (eds) *Proc 6th Int Citrus Congr*, Vol. 1. Margraf Publ, Weikersheim, Germany, pp. 277-289.
- SINGH, R.; NATH, N. (1969) Practical approach to the classification of *Citrus*. In H.D. Chapman, ed., *Proceeding of the First International Citrus Symposium*, University of California at Riverside, March 16-26, 1968, vol. 1, pp 435-449. Publications Department, University of California, Riverside.
- SMITH, S.E. (1989) Biparental inheritance of organelles and its implications in crop improvement. *Plant Breed. Ver.* 6, 361-393.
- STEBBINS, G.L. (1950) *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- STONE, B.C.; LOWRY, J.B.; SCORA, R.W.; JONG, K. (1974) *Citrus halimii*: A new species from Malaya and Peninsular Thailand. *Biotropica* 5, 102-110.
- SWINGLE, W.T. (1915a) A new genus, *Fortunella*, comprising four species of kumquat oranges. *Jour. Wash. Acad. Sci.* 5, 165-76.
- SWINGLE, W.T. (1915b) *Microcitrus*, a new genus of Australian citrous fruit. *Jour. Wash. Acad. Sci.* 5, 569-78.
- SWINGLE, W.T. (1943) The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily. In Webber, H.J.; Batchelor, L.D. (eds.) *The Citrus industry*, Vol. I. University of California, Berkeley, pp. 129-474.

- SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In Reuther, W.; Webber, H.J.; Batchelor, L.D. (eds). The *Citrus* industry, Vol. 1, 2nd ed. University of California, Berkeley, pp. 190-430.
- TANAKA, T. (1954) Species problems in citrus. Japanese Society for the promotion of Science, Ueno, Tokio, 152 pp.
- TANAKA, T. (1961) Citrologia (Semi-centennial commemoration papers on *Citrus* studies). Citrologia Supporting Foundation, Osaka, Japan. pp. 114.
- TANAKA, T. (1969) Taxonomic problem of *Citrus* fruit in the orient. Bull. Univ. Osaka. Pref. Ser. B. 21, 133-138.
- TANAKA, T. (1977) Fundamental discussion of *Citrus* classification. Stud. Citrol. 14, 1-6.
- WAGNER, D.B. (1992) Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. New For. 6, 373-390.
- WALBOT, V.; CULLIS, C. A. (1985) Rapid genomic change in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 36, 367-96.
- YAMAMOTO, M.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; YAMADA, Y. (1993) Phylogenetic relationships of *Citrus* revealed by diversity of cytoplasmic genomes. In Hayashi, T.; Omura, M.; Scott, N.S. (eds.), Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees. Fruit Trees Research Station, Okitsu, Japan. pp. 39-46.