

INSTITUTO AGRONÔMICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**DISSERTAÇÃO**

# CARACTERIZAÇÃO DE LIMÃO-CRAVO (*Citrus* × *limonia* OSBECK) ATRAVÉS DE GENÔMICA COMPARATIVA

**NICHOLAS VINÍCIUS SILVA**

**Campinas, SP**
**2016**

**INSTITUTO AGRONÔMICO**
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL**

# CARACTERIZAÇÃO DE LIMÃO-CRAVO (*Citrus* × *limonia* OSBECK) ATRAVÉS DE GENÔMICA COMPARATIVA

**NICHOLAS VINÍCIUS SILVA**

**Orientador: Dr. Marco Aurélio Takita**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.

Campinas, SP
Abril, 2016

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

S586c Silva, Nicholas Vinícius
Caracterização de limão-cravo (*Citrus* × *limonia* osbeck) através de genômica comparativa /Nicholas Vinícius Silva. Campinas, 2016. 68 fls.

Orientador: Marco Aurélio Takita
Dissertação (Mestrado) Agricultura Tropical e Subtropical – Instituto Agronômico

1. Limão-cravo 2. Filogenia de citros 3. Comparação de genomas
4. Porta-enxerto 5. Bioinformática I. Takita, Marco Aurélio II Título

CDD. 634.334

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
**INSTITUTO AGRONÔMICO**
**Pós-Graduação**
Av. Barão de Itapura, 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(19) 2137-0601
pgiac@iac.sp.gov.br

INSTITUTO AGRONÔMICO

**Curso de Pós-Graduação**

**Agricultura Tropical e Subtropical**

**Certificado de Aprovação**

Título: **Caracterização de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) através de genômica comparativa**

Aluno: **Nicholas Vinícius Silva**

Área de Concentração: **Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia**

Processo SAA nº: **2.738/2014**

Orientador: **Dr. Marco Aurélio Takita**

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dr.Marco Aurélio Takita - IAC

Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle - UNICAMP

Dr. Jorge Mauricio Costa Mondego - IAC

Campinas, 15 de abril de 2016

Visto:

*Márcio Koiti Chiba*
Coordenador Pós-Graduação
Instituto Agronômico

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de pesquisa primeiramente a Deus, por ser presente e essencial a minha vida, autor do meu destino, minha força e proteção durante os momentos de decisão e de angústia. Seu fôlego de vida foi meu ânimo, incentivo e me deu a coragem necessária para enfrentar a realidade e aceitar novas possibilidades.

À minha família, que sempre através do amor, carinho e compreensão, me incentivou ao longo dos meus estudos e me ensinou que a humildade é a chave para o sucesso. Seus ensinamentos mostraram-me como ser uma pessoa íntegra e justa.

Aos meus amigos, por toda a confiança, carinho, incentivo, palavras e pelos momentos verdadeiros e incríveis. Com vocês, tudo se tornou mais leve e prazeroso.

*"Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem, você continuará vivendo, mas terá deixado de existir".*
*(Charles Chaplin)*

*"Aprendi que a coragem não é a ausência do medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas o que conquista esse medo."*
*(Nelson Mandela)*

*"Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim. Altos e baixos fazem parte da construção do nosso caráter. Afinal, cada momento, cada situação, que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas."*
*(Albert Einstein)*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar e me guiar durante toda a minha vida; por me permitir concretizar mais um sonho e dar mais um passo em minha caminhada. Por me ter concedido saúde, dedicação, perseverança para realizar mais este objetivo e muita paz para decidir sobre as escolhas difíceis que surgiram, que hoje concluo que foram as melhores.

À toda minha família, pelo amor, confiança, estimulo, apoio incondicional para minha formação. Obrigado por estarem sempre presente ao meu lado apesar da distância, por acreditarem e mim e pelo auxilio em todas as decisões e estímulo sempre presentes nos momentos difíceis, elevando minha autoconfiança e certeza da capacidade de realização. Obrigado pelo carinho e amor! Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu orientador Dr. Marco Aurélio Takita, pelo seu "sim" e por acreditar em minha capacidade. Obrigado pelo conhecimento e ensinamentos transmitidos, além da amizade, estimulo, confiança, críticas e correções e principalmente pelo apoio necessário para a realização deste trabalho.

À Glauco dos Santos Reis pelo auxílio inestimável na etapa de criação do programa Java para a análise dos dados resultante do Blastn, seus conhecimentos em programação Java foram essenciais para conclusão desta etapa.

À Pós-Graduação em Agricultura Tropical e subtropical do Instituto Agronômico - IAC pela oportunidade e direcionamentos.

Ao Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" e ao diretor atual Dr. Marcos A. Machado, pela grande oportunidade de me permitir realizar esta pesquisa e pelas oportunidades.

Aos membros da banca avaliadora Dr. Jorge M. C. Mondego, Dr. Jorgino Pompeu Junior, Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle, Dra. Marinês Bastianel e Dr. Fernando Alves de Azevedo, por terem aceitado participar desta defesa e pela contribuição nas correções que serão fundamentais para o enriquecimento desta dissertação.

Aos amigos e companheiros de viagem, José Dagoberto de Negri e Arthur A. Ghilardi pela amizade, ensinamentos, momentos incríveis e pela grande contribuição que tiveram para a concretização deste projeto e especialmente aos momentos descontraídos que tivemos durante as caronas oferecidas ao Centro de Citricultura em Cordeirópolis;

À todos os amigos do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” por todo auxílio, companhia, incentivo, pelos inúmeros momentos de alegria e pela amizade especial compartilhada nos mais diferentes momentos. Especialmente aos amigos da sala III de pós-graduação (Depósito): Fábio de Nadai, Karina Salomão, César Augusto Nascimento, Cristiano Ferreira, Rômulo M. Lima, Mayara Curtolo, Tatiany Soratto, Iasabella Picirillo, Amanda Bernardi, Thiago Oliveira, Mariana Tarallo, Henrique Bergamo e Isis Gabriela pelos momentos inesquecíveis durante a semana e principalmente pelo companheirismo, amizade, apoio e ensinamentos. Muito obrigado a todos e desejo que todos realizem seus objetivos e que suas vidas sejam repletas de muito sucesso e realizações.

Aos grandes amigos do mestrado: Acácia M. D. Souza, César A. Nascimento, Elaine S. Arruda, Laura M. Gómez-Krapp, Thaís L. Advíncula e Vanessa G. Monteiro por todos os momentos compartilhados, confiança, apoio, carinho, companhia, por serem grandes amigos e estarem presentes em momentos emocionantes, especiais e inesquecíveis da minha vida.

Aos meus amigos de República, Pedro Torres e Leonardo Mazzega pela companhia, convivência, brincadeiras, momentos de alegrias e amizade fundamental durante este período de pós-graduação.

Agradeço também aos amigos que conheci e se tornaram importantes em minha vida. A vocês, Laura M. Gómez-Krapp, Karina Salomão, César A. Nascimento, Tiago Oliveira e Fábio D. Nadai, meu sincero e eterno agradecimento pela grande amizade, companhia, conselhos, conquistas que alcançamos juntos durante este período e principalmente pela paciência de me aceitar como sou. Vocês foram fundamentais para que esta pesquisa fosse realizada e apesar das escolhas futuras e da possível distância, jamais esquecerei de tudo que vivemos e passamos juntos. Levarei um pouco de todos vocês comigo.

Aos amigos do Centro de Grãos e Fibras e Fitoquímica, Rodrigo Tunes, João Guilherme, Tamires Ribeiro, Daiana Alves, Elaine Macedo e Graziele Sasseron por todo apoio e amizade.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante a realização desta pesquisa.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, as quais participaram da minha formação como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão.

Este trabalho somente foi concretizado com a participação fundamental de cada um de vocês! Muito obrigado! **Nicholas (N.V.S)**

**SUMÁRIO**

ÍNDICE DE TABELAS ..... viii
ÍNDICE DE FIGURAS ..... ix
RESUMO ..... xi
ABSTRACT ..... xiii
1. INTRODUÇÃO ..... 15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 18
2.1 Gênero *Citrus* ..... 18
2.1.2 Origem, distribuição geográfica e importância econômica ..... 18
2.1.3 Taxonomia e filogenia das espécies de citros ..... 20
2.2 Porta-enxertos para citros ..... 26
2.2.1 Limão-cravo (*Citrus* × *limonia)* e sua importância para a citricultura paulista ..... 28
3. OBJETIVOS ..... 30
3.1 GERAL ..... 30
3.2 ESPECÍFICOS ..... 30
4. MATERIAL E MÉTODOS ..... 31
4.1 Mapeamentos de Sequências ..... 31
4.2 Genomas e Sequências ..... 31
4.3 Análise Comparativa ..... 32
4.4 Alinhamento Local e Extração de Sequências ..... 32
4.5 Alinhamento Múltiplo das Sequências ..... 35
4.6 Avaliação da Contribuição Genômica ..... 35
5. RESULTADOS ..... 38
5.1 Mapeamento de Sequências Genômicas ..... 38
5.2 Análise Comparativa de Sequências ..... 38
5.2.1 Comparação de sequências genômicas ..... 38
5.2.2 Comparação de sequências gênicas e genômicas ..... 41
6. DISCUSSÃO ..... 46
6.1 Contribuição das Cidras (*Citrus medica*) ..... 47
6.2 Contribuição das Tangerinas (*Citrus reticulata*) ..... 47
6.3 Contribuição das Toranjas (*Citrus maxima*), Laranja-doce (*Citrus* × *sinensis*) e Laranja-azeda (*Citrus* × *aurantium*) ..... 52
6.4 Contribuição dos Limões (*Citrus* × *limon*) e Limas (*Citrus* × *aurantiifolia*) ..... 52
6.5 Contribuição do Subgênero *Papeda* ..... 54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 55
8. CONCLUSÕES ..... 59
9. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS ..... 60

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Informações dos genomas (drafts) sequenciados pelo Centro de Citricultura ou disponíveis publicamente utilizados no primeiro painel comparativo..... 33

**Tabela 2.** Espécies de *Citrus* com sequências disponíveis utilizadas na etapa de comparação de genomas, oriundas de banco de dados de sequências.... 34

**Tabela 3.** Proporção genômica das espécies de *Citrus* utilizadas na etapa de comparação de genomas, oriundas de banco de dados de sequências. O número de sequências avaliadas, proporção genômica (%) relativo a o total de sequências avaliadas para cada espécie é apresentado..... 42

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1**. A origem e evolução das espécies cítricas. Os três principais ancestrais das espécies de citros incluídos no estudo, estão representadas no topo da figura, sendo eles: Citrus reticulata, Citrus maxima e Citrus medica e os possíveis cruzamentos que originou as espécies de citros atualmente cultivadas. Fonte: Velasco e Licciardello, 2014. ..... 24

**Figura 2.** **E**strutura filogenética global e origem dos principais grupos de limões e limas. Os três principais ancestrais das espécies de citros descritos anteriormente e o quarto representante, estão representadas no topo da figura, sendo eles: Citrus medica, Citrus reticulata, Citrus maxima e Citrus micrantha e os possíveis cruzamentos que originaram as espécies de limões e limas. Fonte: Curk et al., 2016. ..... 25

**Figura 3.** Anotação manual dos cladogramas que constituíram o segundo painel comparativo. Os 439 cladogramas que constituíram o segundo painel comparativo foram anotados individualmente e manualmente. Estipulou-se valores numéricos para cada uma das sete sequências que constituirão os cladogramas de acordo com a proximidade e distância a limão-cravo, espécie de referência (valor 1). Sequências de espécies situadas no mesmo clado de limão-cravo receberão o mesmo valor (valor1), enquanto que, sequências em clados diferentes receberam valores distintos de limão-cravo de acordo com sua distância. ..... 36

**Figura 4.** Pipelines utilizadas na comparação das sequências genômicas das espécies investigadas quanto à similaridade com *Citrus* × *limonia*. **(a)** etapas para a comparação de sequências advindas de genomas, e em **(b)** para sequências oriundas de genomas e banco de dados público (NCBI). ..... 37

**Figura 5.** Distribuição cromossômica das sequências de limão-cravo (*Citrus* × *limonia*). Um total de 9.553 sequências de limão-cravo foram mapeadas nos nove cromossomos de Citrus × clementina cv. Nules, usando-se o Blastn para localização especial das sequências e suas coordenadas para o mapeamento propriamente dito no genoma de referência haplóide de *C.* × *clementina*. ..... 38

**Figura 6.** Cladograma consenso de espécies cítricas. Todos os cladogramas obtidos através do programa T-coffee vs. 11.0 foram utilizados para a construção do cladograma consenso através do pacote PHYLIP v. 3.6 por meio do programa "consensus tree". **(a)** - cladograma consenso com os números de cladogramas similares entre as espécies. **(b)** - cladograma simplificado. ..... 40

**Figura 7.** Proporção do genoma de limão-cravo (*C.* × *limonia*) baseada na comparação de sequências genômicas de diferentes espécies de Citrus. ..... 40

**Figura 8.** Cladogramas consenso de sequências gênicas e genômicas de espécies de citros. Todos os cladogramas obtidos pelo programa T-Coffee foram utilizados para a construção dos cladogramas consenso por meio do pacote de programas PHYLIP vs. 3.6 utilizando o programa "consensus tree". Os cladogramas consenso com as respectivas espécies de citros analisadas em relação à similaridade com sequências genômicas de *C.* × *limonia*, *C. medica*, *C. maxima*, *C. reticulata* e *C.* × *clementina*, são apresentados; **(a)** *C. ambrycarpa*, **(b)** *C.* × *aurantifolia*, **(c)** *C.* × *aurantium*, **(d)** *C. bergamia*, **(e)** *C. deliciosa*, **(f)** *C. depressa*, **(g)** *C. halimii*, **(h)** *C. hystrix*, **(i)** *C. ichangensis*, **(j)** *C. indica*, **(k)** *C.* × *jambhiri*, **(l)** *C. limettioides*, **(m)** *C.* × *limon*, **(n)** *C. longispina*, **(o)** *C. nippokoreana*, **(p)** *C. reshni*, **(q)** *C. sunki*, **(r)** *C. tachibana* e **(s)** *C. unshiu*. Em cada cladograma consenso limão-cravo foi destacado em negrito e a localização de cada uma das dezenove espécies utilizadas é identificada com sublinhado. ..... 44

**Figura 9.** Possível origem de limão-cravo através de cruzamento simples. Limão-cravo seria originado de um cruzamento simples entre cidra e um híbrido ancestral do grupo das tangerinas, representado por clementina, a espécie deste grupo com maior similaridade genômica com limão-cravo. ..... 56

**Figura 10.** Possível origem de limão-cravo através de retrocruzamento. O híbrido F1 de limão-cravo seria originado do cruzamento entre cidra em uma tangerina ancestral próximo a C. clementina e das tangerinas ácidas com genoma constituído de sequências de toranja, tangerina 'Ponkan', laranja-doce e seria originado de um retrocruzamento entre cidra e um híbrido ancestral do grupo das tangerinas, representado por clementina, a espécie deste grupo com maior similaridade genômica com limão-cravo. ..... 57

**Figura 11.** Possível origem de limão-cravo através de cruzamento simples. Limão-cravo seria originado de um cruzamento simples entre cidra e um híbrido ancestral do grupo das tangerinas, representado por clementina, a espécie deste grupo com maior similaridade genômica com limão-cravo. ..... 58

**Caracterização de *Citrus* × *limonia* Osbeck através de genômica comparativa**


## RESUMO

Espécies cítricas estão entre as frutíferas mais importantes do mundo e possuem uma longa história de cultivo em áreas temperadas, tropicais e subtropicais. A maioria das cultivares modernas possuem origem interespecífica, sendo seleções ou híbridos de espécies progenitoras selvagens, cujas identidades e contribuições na domesticação aos poucos estão sendo estabelecidas. O limão-cravo (*Citrus* × *limonia* Osbeck) é um híbrido pertencente a este gênero com possível origem na Índia. Apesar de ser nomeado como limão, não apresenta morfologia dos limões verdadeiros, possuindo fruto que se assemelha ao de uma tangerina, com suco muito ácido, o que permite sua utilização como substituto para os limões ou limas ácidas comerciais. Entretanto, sua principal utilização é como porta-enxerto, pois apresenta inúmeras características que o tornaram o mais bem-sucedido e utilizado por décadas nos pomares citrícolas do Brasil. Existem diversas variedades desta espécie com características distintas, mas que compartilham uma origem controversa. As hipóteses levantadas a respeito de sua origem sugerem que limão-cravo resultou de um cruzamento de tangerina (*Citrus reticulata*) e limão (*Citrus* × *limon*), cidra (*Citrus medica*) e tangerina ou tangerina e limão rugoso (*C.* × *jambhiri*). Desta forma, o objetivo deste trabalho é caracterizar genomicamente *Citrus* × *limonia* de tal modo a identificar possíveis espécies envolvidas em sua origem. Para buscar conhecimento sobre a origem de limão-cravo, nós avaliamos um conjunto de 948,437,749 sequências (99,95% Illumina e 0,05% de 454) que resultaram em 409,783,077 nucleotídeos (1,1 x cobertura) em 513,098 contigs, que foram comparados com sequências genômicas de clementina (*Citrus* × *clementina*), laranja doce (*C.* × *sinensis*), tangerina Ponkan (*Citrus reticulata*), cidra (*Citrus medica*) e toranja (*Citrus máxima*), além de sequências de 19 outras espécies de citros, oriundas de banco público de sequências. Primeiramente foram analisados fragmentos maiores que 1,5 kb oriundos da comparação do genoma de limão-cravo com os cinco genomas (*C. medica*, *C. reticulata*, *C. máxima*, *C.* × *sinensis* e *C.* × *clementina*) e 300 pb para sequências oriundas de banco público de sequências. As sequências presentes em todas as espécies nestas comparações foram avaliadas quanto ao nível de similaridade entre si. As análises envolvendo sequências provenientes de genomas, revelou que cerca de 60% das sequências de limão-cravo foram mais similares às

sequências de *C. medica* enquanto 30% deles apresentaram maior similaridade com o genoma de *C.* × *clementina*, sendo essas, as espécies com maior similaridade com o genoma de *C.* × *limonia*. As demais espécies apresentaram os seguintes níveis de similaridade: tangerina 'Ponkan' (*Citrus reticulata*, 5-12%), toranja (*Citrus maxima*, 7-11%) e laranja doce (*C.* × *sinensis*, 2-8%). Para as análises envolvendo sequências advindas de banco de dados de sequências, apesar do menor número de sequências disponíveis a serem analisadas, sequências de limão-cravo mostraram maior similaridade às de *C. depressa*, 40 %, seguido das de tangerina Cleópatra (*C. reshni*, 21,6%), limão verdadeiro (*C.* × *limon*, 20,5%), limão rugoso (*C.* × *jambhiri*, 20%), tangerina sunki (*C. sunki*, 20%), *C. halimii* (20%), e *C. ichangensis* (13,3%). Os resultados apontam para cidra e um mandarim (ou um de seus híbridos), possivelmente próximo ao grupo das clementinas e tangerina ácidas como as espécies parentais de limão-cravo. Claramente cidra é o responsável pela maior parte do genoma do limão-cravo e curiosamente *C. reticulata* utilizada para a análise, que poderia ser o parental putativo, não é um dos mais próximos do genoma de limão-cravo.

**Palavras-Chave:** limão-cravo, filogenia de citros, comparação de genomas, porta-enxerto, bioinformática.

**Characterization of *Citrus* × *limonia* Osbeck through comparative genomics**

## ABSTRACT

*Citrus* species are among the most important fruit trees in the world and have a long cultivation history in temperate, tropical and subtropical areas. Most modern cultivars have an interspecific origin, being selections or hybrids of wild parent species, whose identities and contributions in the domestication are gradually being established. Rangpur lime (*Citrus* × *limonia* Osbeck) is a citrus hybrid possibly originated in India. Despite being named as lemon, it does not present morphology of real lemons, having fruits that resemble that of a mandarin, with very acidic juice, allowing its use as a substitute for commercial lemons or limes. However, its main use is as rootstock, since it has many features that made the most successful and used for decades in citrus orchards in Brazil. There are several varieties of this species with different characteristics, but share a controversial origin. The hypotheses raised about its origin suggest that Rangpur lime resulted from a cross between mandarin (*Citrus reticulata*) and lemon (*Citrus* × *limon*), citron (*Citrus medica*) and mandarin or mandarin and rough lemon (*Citrus* × *jambhiri*). Thus, the goal of this study is to genomically characterize *C.* × *limonia* to identify potential species involved in its origin. To get knowledge on the origin of *C.* × *limonia*, we evaluated an assembly of 948,437,749 sequences (99.95% Illumina and 0.05% 454) that resulted in 409,783,077 nucleotides (1.1 x coverage) in 513,098 contigs, which were compared to genomic sequences of clementine (*Citrus* × *clementina*), sweet orange (*Citrus* × *sinensis*), mandarin 'Ponkan' (*C. reticulata*), citron (*C. medica*) and pummelo (*Citrus maxima*), and sequences of 19 other species of citrus, from public sequences database. First, we analyzed fragments equal to or larger than 1.5 kb derived from the comparison of Rangpur lime genome with five genomes (*C. medica*, *C. reticulata*, *C. maxima*, *C.* × *sinensis* and *C.* × *clementina*) and 300 bp for sequences derived from public database sequences. The sequences present in all species were evaluated for their level of similarity among themselves. Analyses involving sequences from genomes revealed that around 60% of the Rangpur lime sequences were more similar to *C. medica* sequences while 20% of them showed higher similarity to the genome of *C. clementina*, being those, the species with higher similarities to the genome of *C.* × *limonia*. The other species showed the following levels of similarity: Ponkan mandarin (*C. reticulata*, 5-12%),

pummelo (*C. maxima*, 7-11%) and sweet orange (*C. × sinensis*, 2-8%). For analyzes involving sequences from the sequences database, despite the lower number of available sequences to be analyzed, Rangpur lime sequences showed greater similarity to *Citrus depressa*, 40%, followed by Cleopatra mandarin (*Citrus reshni*, 21.6%), lemon (*C. × limon*, 20.5%), rough lemon (*C. × jambhiri*, 20%), sunki mandarin (*Citrus sunki*, 20%), *Citrus halimii* (20%), and *Citrus ichangensis* (13.3%). The results point to citron and a mandarin (or one of its hybrids), possibly belonging to the group of clementines and acidic mandarin as the parental species of Rangpur lime. Clearly citron is the responsible for the majority of Rangpur genome and interestingly, *C. reticulata* used for the analysis, it could be the putative parent, is not one of the closest genomes for Rangpur lime.

**Keywords:** Rangpur lime, *Citrus* phylogeny, genome comparison, rootstock, bioinformatics.

# 1. INTRODUÇÃO

A citricultura se destaca no Brasil por ser umas das principais culturas do agronegócio, apresentando uma cadeia de produção estruturada em diversos segmentos, o que faz do Brasil o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado congelado do mundo. Dentre as regiões produtoras do país, São Paulo é estado responsável pela maior parte da produção nacional desta "commodity" (FAO, 2012; STUCHI; GIRARDI, 2010).

As espécies de citros encontraram no Brasil condições favoráveis para se desenvolverem e produzirem com alta eficiência. Inicialmente a citricultura desenvolveu-se mais nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, disseminando-se posteriormente por todo o país (DONADIO et al., 2005).

Na década de 40, o porta-enxerto dominante nos pomares paulistas era a laranja azeda (*C.* × *aurantium*), quando uma nova doença foi identificada em 1937, a tristeza dos citros, que levou ao extermínio de cerca de 10 milhões de plantas enxertadas neste porta-enxerto. O parque citrícola do estado de São Paulo possuía aproximadamente 12 milhões de plantas enxertadas sobre a laranja azeda, considerada susceptível a tristeza. A rápida disseminação do vírus da tristeza, por meio do pulgão-preto (*Toxoptera citricidus*) e borbulhas contaminadas, resultou em prejuízos enormes à citricultura brasileira (POMPEU JUNIOR, 2005). Entretanto, experimentos desenvolvidos em 1925 pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ desde 1925 (VASCONCELLOS, 1939) e em 1933 pelo Instituto Agronômico (MOREIRA, 1946) foram fundamentais para reverter a situação, e de todos os porta-enxertos que apresentaram resistência, o limão-cravo se mostrou superior, sendo indicado para substituir a laranja azeda. A citricultura foi restaurada graças às características disponíveis neste porta-enxerto, que passou a ser o preferido pelos viveiristas e citricultores (LARANJEIRA et al., 2005; POMPEU JUNIOR, 2005). No Estado de São Pulo, cerca de 80% das plantas que compõem os pomares estão enxertadas sobre o porta-enxerto limão 'Cravo' (*Citrus* × *limonia* Osbeck) (GIRARDI; MOURAO; PIEDADE, 2007; SCHAFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001). De acordo com POMPEU JUNIOR et al., 2004, 2005, no período de 1999-2004 o limão-cravo representava 74,7% das mudas formadas, continuando a ser o porta-enxerto dominante nos viveiros do estado no período

de 2004-2007, com participação de 56,1% da produção de mudas (JUNIOR & BLUMER, 2008). Diante disso, a importância de limão-cravo para a citricultura brasileira é inestimável.

A baixa variabilidade genética das variedades de citros utilizadas na citricultura brasileira e a utilização de poucos porta-enxertos é a causa de grandes problemas fitossanitários. As principais doenças que atingem a citricultura nacional são: a tristeza causado vírus da tristeza (Citrus tristeza vírus - CTV), o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*, a pinta preta causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*), a morte súbita (MSC) e o declínio dos citros com agentes causais desconhecidos, a leprose causada pelo vírus Citrus leprosis vírus (CiLV), a clorose variegada dos citros (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, gomose de Phytophthora é causada pelos fungos *P. parasitica e P. citrophthora*, nematoides como o nematóide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*) e *o* nematóide das lesões radiculares dos citros (*Pratylenchus jaehni*), viróides da exocorte (Citrus exocortis viroid - CEVd) e xiloporose (Hop stunt viroid, HSVd) e o "huanglongbing" (HLB) ou "greening" causada pela bactéria *Candidatus* Liberibacter ssp. (BARBASSO, 2005).

O gênero *Citrus* é originário do sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão e leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE; REECE, 1967; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). São conhecidos outros centros de origem, como a região de Yunnam, no centro sul da China e o norte da região Indo-Burma (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Entretanto, a origem exata das espécies de citros modernas cultivadas como laranja doce (*C.* × *sinensis*), limão (*Citrus* × *limon*) e pomelo (*Citrus* × *paradisi*) se manteve por muito tempo desconhecida. Devido à compatibilidade sexual entre citros e gêneros afins, a alta frequência de mutações somáticas, a longa história de cultivo e a ampla dispersão, informações sobre a filogenia das espécies selvagens ancestrais e as relações genéticas entre as espécies cultivadas e seus progenitores selvagens putativos permaneceram sem solução (CURK et al., 2016; UCHOI et al., 2016).

As cultivares de citros são multiplicadas através da clonagem, o que ocorre por enxertia ou através da apomixia via poliembrionia de sementes para manter combinações desejáveis de características. Desta forma, as cultivares possuem genótipos básicos característicos, que surgiram das espécies ancestrais selvagens através de hibridação interespecífica ou sucessivas hibridizações introgressivas.

O entendimento da filogenia das espécies de citros mediante a análise do genoma é de extrema importância, pois, esclarece as relações taxonômicas e origem das espécies modernas cultivadas, assim como indicar possíveis parentais que originaram essas espécies. Outro fator importante é a utilização destes dados no melhoramento dirigido por sequência (VELASCO & LICCIARDELLO, 2014).

No caso de limão-cravo, além de se conhecer sua origem para melhor controle de um possível programa de melhoramento, os dados genômicos possibilitariam identificar e isolar genes de interesse nas espécies parentais, que são importantes em limão cravo, como aqueles relacionados à tolerância ao déficit hídrico e a resistência a tristeza, para serem utilizados na transferência de genes, seleção em progênies de plantas com sequências específicas e o direcionamento de cruzamentos para produzir híbridos com características superiores às encontradas em limão-cravo.

A utilização dos resultados gerados pelo sequenciamento de genomas de espécies cultivadas de citros no melhoramento poderá proporcionar novas oportunidades para a criação de novas variedades com maior resistência a patógenos e a condições ambientais extremas, além de proporcionar novas combinações de cruzamentos, gerando maior diversidade de cor, sabor, tamanho e aroma (VELASCO & LICCIARDELLO, 2014; WU et al., 2014). A disponibilização de variedades resistentes geraria economia à cadeia citrícola, principalmente pelo fato de que o principal fator limitante da citricultura nacional são as doenças, ocasionando mais de 60% do custo de produção (MACHADO et al., 2005).

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 Gênero *Citrus*

### 2.1.2 Origem, distribuição geográfica e importância econômica

Espécies cítricas estão entre as frutíferas mais importantes do mundo e possuem uma longa história de cultivo, que permitiu sua ampla distribuição geográfica e cultivo em áreas temperadas tropicais e subtropicais (SCORA, 1988; WEBBER et al, 1967).

O gênero *Citrus* é classificado botanicamente como pertencente à família Rutaceae, subgênero Eucitrus, tribo Citreae e subtribo Citrinae, subfamília Aurantioideae, tendo ramos filogenéticos que se estendem do Sul da Ásia Oriental, Malásia, Nova Caledônia até a Austrália (SWINGLE e REECE, 1967). A família Rutaceae é distribuída amplamente nos trópicos sendo composta por 160 gêneros e 1.800 espécies. Em geral, compreendem espécies autógamas, sexualmente compatíveis, altamente heterozigotas e basicamente diplóides, com número de cromossomos nas células somáticas 2n = 18 e havendo raros poliplóides, como a lima ácida 'Tahiti' (*C. latifolia* Tan.), de constituição triplóide e origem desconhecida (CAMERON e FROST, 1968; GUERRA et al., 1997). O gênero *Citrus* é constituído de diversas espécies de interesse econômico, como as laranjas doces (*C.* × *sinensis* (L.) Osbeck), laranjas azedas (*C.* × *aurantium* L.), limões (*C.* × *limon* Burm F.), cidras (*C. medica* L.), tangerinas (*C. reticulata* Blanco, diversas espécies), pomelos (*C. paradisi* Macf.), limas ácidas (*C.* × *aurantiifolia* Swing.), limas doces (*C. limettioides* Tan.), e toranjas (*C. maxima* (Burm.) Merr.) (CHAPOT, 1975; SOOST e CAMERON, 1975).

As rotas exatas da dispersão dos citros são desconhecidas, entretanto, há menção de sua importância em textos antigos em chinês, grego e na literatura romana (CARVALHO et al., 2005). Na cultura chinesa e indiana, as evidências da utilização das cidras datam de aproximadamente 800 a.C. A grande importância da cidra nestas culturas, talvez, se deve à variedade conhecida como mão-de-buda, que frequentemente era utilizada em cerimônias religiosas. As cruzadas auxiliaram na dispersão dos citros no ocidente, no entanto, foram os Macedônios os primeiros a descrever a presença de citros na Pérsia, a cidra, sendo esta possivelmente a precursora dos citros no ocidente, apresentando resistência no período pós-colheita, boa aparência e odor agradável, assim,

possivelmente sendo utilizada em conservas para servir de alimento em viagens prolongadas. Além disso, a cidra foi por muitos anos a única espécie de citros conhecida e consequentemente, a primeira a ser distribuída para outras regiões próximas. Acredita-se que em 500-1300 d.C. algumas espécies de citros, como cidra, laranjas e limões, foram dispersadas lentamente para outras áreas e para a Europa por viajantes, invasores e outros que se deslocaram ao longo das rotas comerciais. Durante os séculos XII e XIV diversas espécies de citros foram distribuídas na Itália, Sul da França e Espanha. No final do século XIV, quatro tipos de citros ocorriam na Itália (cidra, laranja azeda, limão e lima). Acredita-se que a laranja-azeda e o limão foram distribuídos após a cidra, no entanto, sua chegada ao ocidente é datada de 700 d.C., início da era cristã, a partir daí, passaram a ser distribuídas juntamente com a laranja doce e lima. Os primeiros relatos a respeito da região de origem da laranja doce indicam que possivelmente esta originou-se no arquipélago índico e, posteriormente, foi levada ao Egito e distribuída no Ocidente. No século XVI, com o bloqueio do mar do mediterrâneo pelos turcos, os portugueses passaram a realizar expedições à Índia, de onde possivelmente trouxeram e introduziram na Europa algumas variedades de laranja doce, sendo, em seguida, distribuída para as Américas. As tangerinas e kunquats embora cultivadas na China e no Japão desde a antiguidade, somente em 1805 foram levados para o ocidente (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005; MOORE, 2001; SCORA, 1975).

A disseminação dos citros para o continente americano ocorreu principalmente pela ação de coleta e intercâmbio de sementes e material vegetal para propagação realizada pelos portugueses, principalmente quando retornavam da Ásia durante suas viagens exploratórias. A primeira introdução de citros no Brasil talvez tenha ocorrido no começo do século XVI, possivelmente a partir de 1530, quando teve início a colonização feita pelos portugueses (MOORE, 2001; SCORA, 1975; OLIVEIRA et al., 2012). Segundo DONADIO et al. (2005), as plantas cítricas encontraram no litoral brasileiro melhores condições de desenvolvimento do que nas próprias regiões de origem, assim, houve uma rápida expansão dessas plantas pelo litoral e posteriormente com o aumento do consumo, foram sendo plantadas em muitas regiões, em pequenos pomares caseiros e pomares comerciais, contribuindo para a dispersão de citros para outras regiões do país.

A importância histórica e econômica atual dos citros, faz da citricultura uma atividade importante para a economia e agricultura brasileira. O Brasil é considerado o maior produtor de laranjas do mundo, entretanto, é no suco de laranja, que o país se

destaca com sua hegemonia, sendo o maior produtor e exportador de suco concentrado congelado (FCOJ).

A citricultura brasileira encontrou no estado de São Paulo as condições favoráveis para seu desenvolvimento e crescimento. O estado de São Paulo juntamente com o Triângulo Mineiro, abrigam o maior parque citrícola interno do país, o cinturão citrícola, que corresponde a cerca de 174,13 milhões de árvores produtivas, com 1,84 caixas por planta e corresponde a 76.5% da produção. A área de pomares de citros no cinturão citrícola totaliza 482.591 hectares e está distribuída em 11.561 propriedades que abrangem 320 municípios no estado de São Paulo, 29 municípios nas regiões do Triângulo Mineiro e Sudoeste de Minas Gerais (FUNDECITRUS, 2015; IBGE, 2015; MONACO et al., 2015).

A laranja é a fruta cítrica com maior área plantada, com 444.583 hectares, seguida por limas ácidas e limões com 27.938 hectares e por tangerinas com 10.070 hectares. A safra total brasileira de laranja para 2015/16 é estimada em 410 milhões de caixas de 40,8 kg. A produção de suco de laranja concentrado e congelado (FCOJ) será de 1.092 milhões de toneladas (BERK et al., 2015).

Para o cinturão citrícola, o Fundecitrus, estimou uma produção na safra 2015/16 de 278,99 milhões de caixas de 40,8 kg de laranja. O setor do cinturão que apresenta maior produção de laranja, cerca de 65,95%, é o setor central, constituídos pelos municípios de Brotas, Duartina e Matão (FUNDECITRUS, 2015; IBGE, 2015; MONACO et al., 2015). Na safra de laranja 2013/14, do total de 268,6 milhões de caixas colhidos no estado de São Paulo, 80 % (215,3 milhões de caixas) foram destinadas às indústrias de processamento de suco e 20 % (53,3 milhões de caixas) para a comercialização in natura (CONAB, 2013).

### 2.1.3 Taxonomia e filogenia das espécies de citros

O gênero citros tem sido o foco de diversos estudos envolvendo taxonomia e evolução, devido a sua grande importância econômica (CARVALHO et al., 2005). No entanto, a taxonomia e filogenia em citros é considerada complexa, havendo diferenças no número de espécies consideradas, de acordo com o sistema de classificação adotado. Isso se deve ao fato de existir grande variabilidade neste gênero, decorrente de mutações espontâneas, hibridações naturais interespecíficas, cultivo em ampla área geográfica,

alterações cromossômicas estruturais, apomixia e a longa história de cultivo (OLIVEIRA; RADMANN, 2005). Por este motivo, sempre existiu muita divergência quanto à origem e a classificação dos citros, principalmente no que diz respeito ao número de espécies conhecidas. Até o momento, existem duas principais classificações que são amplamente aceitas, a de SWINGLE e REECE (1967) e a de TANAKA (1977). A taxonomia sugerida por SWINGLE e REECE (1967) é constituída de 16 espécies, subdivididas no subgênero *Papeda*, formado por seis espécies sem valor comercial e consideradas primitivas e o subgênero *Citrus*, abrangendo dez espécies de grande importância econômica. Já a sugerida por TANAKA (1977) reconheceu o gênero *Citrus* como sendo constituído de 159 espécies e 14 variantes subdivididos nos subgêneros *Archicitrus* e *Metacitrus*. A diferença no número de espécies em cada uma é resultante da classificação das tangerinas, por Swingle agrupando todas as espécies de tangerina no grupo de *Citrus reticulata*, enquanto Tanaka as separou em 36 espécies independentes.

De acordo com análises químicas e morfológicas, SCORA (1975) e BARRETT & RHODES, (1976), sugeriram que o grupo constituído de espécies verdadeiras de citros (não-híbridos) é constituído de apenas três espécies botânicas, *C. maxima*, *C. medica* e *C. reticulata* e demais espécies como *C.* × *sinensis* (laranja doce), *C.* × *aurantium* (laranja azeda), *C.* × *limon* (limão), *C. paradisi* (grapefruit) e *C.* × *aurantiifolia* (lima) foram todos derivados de híbridos, cultivares, ou espécies variantes, sendo seus genomas considerados mosaicos de grandes fragmentos de DNA das espécies ancestrais que resultaram de poucos eventos de recombinação interespecíficos (GARCÍA-LOR et al., 2012; LI et al., 2010). MABBERLEY (1997) propôs uma nova classificação, que reconhece três espécies e quatro grupos de híbridos. A classificação de Mabberley confirma o estudo taxonômico realizado por BARRETT & RHODES (1976) que haviam proposto os três táxons principais [*C. medica* L. (cidras), *C. maxima* (Bir.) Osbeck (toranjas) e *C. reticulata* Blanco (tangerina)], sendo estes os ancestrais das espécies de citros modernas cultivadas. Entretanto, permanece questionável a subdivisão em quatro grupos, sendo pouco adotada por autores. Estudos realizados, envolvendo a diversidade de características morfológicas (OLLITRAULT ET AL., 2003), a análise de metabólitos primários (LURO et al., 2011) e metabólitos secundários (FANCIULLINO et al., 2006) indicaram que a diversidade fenotípica das espécies cítricas derivou da diferenciação inicial dos três grupos.

Embora existam inúmeras dificuldades que impediram o estabelecimento de um sistema consenso para a classificação deste gênero, grande parte dos autores concordam

sobre as origens das principais espécies. Atualmente quatro táxons [*C. medica* L. (cidra), *C. reticulata* Blanco (tangerina), *C. maxima* (Burm.) Merr. (toranja) e *C. micrantha* Wester (papeda)] são considerados ancestrais de todos os demais híbridos cultivados (CASPERMEYER, 2015; CURK et al., 2014, 2015a, 2015b; GARCÍA-LOR et al., 2013a; VELASCO; LICCIARDELLO, 2014). O último táxon a ser considerado como espécie fundamental foi o subgênero *Papeda*, com *C. micrantha* como sendo a quarta espécie, que teria contribuído para a origem dos limões (BARKLEY et al., 2006; GARCÍA-LOR et al., 2012, 2013a, 2013b; NICOLOSI et al., 2000; OLLITRAULT et al., 2012a). Acredita-se que a diferenciação destes táxons sexualmente compatíveis nas demais espécies conhecidas atualmente, é resultado de um efeito fundador em três diferentes regiões, seguido de uma especiação alopátrica inicial. Desta forma, a cidra (*C. medica*) teria surgido no norte-oriental da Índia e na região vizinha de Mianmar e China, a toranja (*C. maxima*) teria originado no arquipélago malaio e Indonésia e a diversificação das tangerinas (*C. reticulata*) teria ocorrido nas regiões que incluem Vietnã, sul da China e Japão, sendo sua principal região inicial de distribuição o Leste da Índia (CURK et al., 2015b; GARCÍA-LOR et al., 2012; NICOLOSI, 2007; SCORA, 1975). *C. micrantha* teria origem nas Filipinas, entretanto, acredita-se que algumas espécies de *Papeda* (*C. hystrix* e *C. ichangensis*) são de origem continental, oriundas da Birmânia, Tailândia e extinta Indochina (TANAKA, 1954, SWINGLE e REECE, 1967, SCORA, 1975). A laranja doce (*C.* × *sinensis* (L.) Osbeck), é um híbrido que se acredita tenha originado no sudeste da Ásia, possivelmente, na região da antiga Indochina e Sul da China, estendendo-se até o Sul da Indonésia. A laranja azeda (*C.* × *aurantium* L.) é provavelmente nativa do Sul da Ásia, possivelmente da Índia. A lima ácida (*C.* × *aurantiifolia* (Christm.) Swingle) tem possível origem no arquipélago do Leste da Índia, sendo posteriormente distribuída pelo continente indiano (SAUNT, 1990). Posteriormente, segundo GARCÍA-LOR et al. (2012), a ação humana facilitou a migração e a hibridação entre os "pools" genéticos diferenciados da taxa básica, entretanto, a ocorrência de apomixia parcial observada na maioria das espécies secundárias limitou o fluxo de genes entre as espécies.

As pesquisas realizadas anteriormente sobre a filogenia e origem genética das espécies de citros cultivadas se basearam em descritores morfológicos (FANG et al., 1993; IBPGR, 1988; HERRERO et al., 1996a, 1996b; SWINGLE e REECE, 1967; ZHONG e YE, 1993), dados de distribuição geográfica (FEDERICI et al., 1998) e marcadores bioquímicos isoenzimáticos (OLLITRAULT et al. 2003). Com o avanço na área de biologia molecular, novos estudos envolvendo inúmeras técnicas de marcadores

moleculares passaram a ser utilizados para investigar variabilidade em citros, no intuito de identificar e determinar as relações filogenéticas ao nível de espécies e cultivares, e na tentativa de decifrar a constituição genômica, possíveis parentais e cruzamentos que originaram as diversas espécies existentes. Diversos métodos de análise molecular, ao nível de DNA foram utilizados em estudos filogenéticos utilizando sequências ou marcadores de cloroplastos (cpDNA) (ABKENAR; ISSHIKI; TASHIRO, 2004; BAYER et al., 2009; PENJOR et al., 2010; WU et al., 2014), sequências ou marcadores mitocondriais (FROELICHER et al., 2011; YAMAMOTO et al., 1993), polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs) (FEDERICI et al., 1998), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPDs) (ABKENAR; ISSHIKI, 2003; FEDERICI et al., 1998; NICOLOSI et al., 2000), polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (AFLP) (LI et al., 2010; LIANG et al. 2007), polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição em amplicons (PCR-RFLP) (ABKENAR; ISSHIKI; TASHIRO, 2004; JENA; KUMAR; NAIR, 2009), regiões amplificadas de sequências caracterizadas (SCAR) (NICOLOSI et al., 2000), repetições de sequência simples (SSRs) (BARKLEY et al., 2006; GULSEN & ROOSE, 2001b; OLLITRAULT et al., 2010; PANG; HU; DENG, 2003), SSR e inserção-deleção (Indels) (GARCÍA-LOR et al., 2012, 2013a), sequências simples repetitivas internas (ISSR) (FANG et al., 1998; GULSEN & ROOSE, 2001a, 2001b; SHAHSAVAR et al., 2007), sequências nucleares de espaçadores transcritos internos (ITS) (HYNNIEWTA; MALIK; RAO, 2014; LI et al., 2010; PESSINA et al., 2011; XU et al., 2006), polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (CURK et al., 2014, 2015b; GARCÍA-LOR et al., 2013a, 2013b; OLLITRAULT et al., 2012b; WU et al., 2014). Estas técnicas confirmam a influência de três (*C. medica*, *C. maxima* e *C. reticulata*) espécies na origem e evolução das espécies de citros, além de sugerirem que *Citrus micrantha* seria o parental paterno para algumas espécies de limas (*Citrus* × *aurantiifolia* Christm.). Apesar desses estudos terem fornecido informações importantes para a origem e taxonomia das espécies de citros, os resultados não têm sido sempre concordantes, exigindo uma compreensão genética mais profunda para uma melhor caracterização e utilização das espécies de citros (LI et al., 2010). Dados baseados em marcadores moleculares e sequências genômicas geralmente suportam que as laranjas doce (*C.* × *sinensis* (L.) Osb.) e azeda (*C.* × *aurantium* L.) são possivelmente híbridos que tiveram tangerina (*C. reticulata*) como parental paterno e toranja (*C. maxima*) como parental materno, entretanto, a laranja azeda possivelmente é um F1 de toranja e tangerina e a laranja doce possivelmente é resultado do retrocruzamento entre toranja e um híbrido

tangerina e toranja, sendo a toranja doadora do óvulo e *C. reticulata* (com alguma introgressão de *C. máxima*) o doador de pólen (FROELICHER et al., 2011; GREEN; VARDI; GALUN, 1986; LI et al., 2010; NICOLOSI et al., 2000; VELASCO & LICCIARDELLO, 2014; WU et al., 2014). O pomelo (*Citrus paradisi* Macf. (grapefruits)) possui maior semelhança com a toranja, e poderia ser um híbrido de toranja (parental materno) e laranja doce (parental paterno) (BARRETT; RHODES, 1976; DE MORAES; DOS SANTOS SOARES FILHO; GUERRA, 2007; VELASCO; LICCIARDELLO, 2014; WU et al., 2014). Os dados demonstram ainda que a cidra é a principal espécie envolvida na origem dos limões verdadeiros (*C.* × *limon*) e não verdadeiros (*C.* × *limonia*, *C.* × *jambhiri*), e das limas ácidas (*C.* × *aurantiifolia*). A mexerica do Rio (*C.* × *deliciosa*) e as clementinas (*C.* × *clementina*) mostraram-se intimamente relacionadas, sendo que a mexerica do 'Rio' foi possivelmente originada de tangerina (parental materno). No entanto, eventos de introgressão simples com toranja teria originado as espécies atuais. As clementinas seriam originadas do cruzamento entre mexerica do Rio (parental materno) e a laranja doce (*C.* × *sinensis*) (Figura 1) (VELASCO & LICCIARDELLO, 2014; WU et al., 2014).

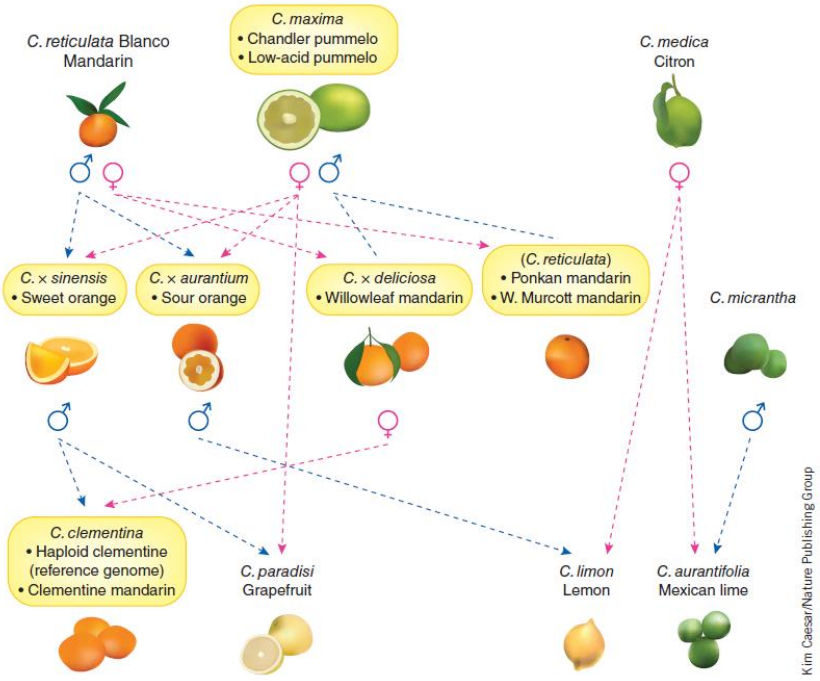



**Figura 1**. A origem e evolução das espécies cítricas. Os três principais ancestrais das espécies de citros incluídos no estudo, estão representadas no topo da figura, sendo eles: Citrus reticulata, Citrus maxima e Citrus medica e os possíveis cruzamentos que originou as espécies de citros atualmente cultivadas. Fonte: Velasco e Licciardello, 2014.

Os limões verdadeiros e a bergamota (*C. bergamia*) teriam originado da hibridação de laranja azeda como parente materno e cidra como parental paterno

(FEDERICI et al., 1998; GULSEN & ROOSE, 2001b; LI et al., 2010; NICOLOSI et al., 2000; TORRESS; SOOST; DIEDENHOFEN, 1978). Para limão mexicano (*C.* × *aurantiifolia*), os dados moleculares confirmaram que uma espécie de *Papeda*, possivelmente *C. micrantha*, poderia ser o parental materno e cidra o paterno (FEDERICI et al., 1998; LI et al., 2010; NICOLOSI et al., 2000). Os limões cravo e rugoso (*C.* × *limonia*, *C.* × *jambhiri*), considerados não-verdadeiros ou conhecidos como "mandarin-like", por apresentarem mais semelhanças com tangerinas e não com os limões, seriam oriundos do cruzamento de cidra (parental materno) e uma espécie de tangerina ácida (*C. reticulata* - parental paterno), não sendo constatada nenhuma relação destas espécies com os limões verdadeiros, que possuem mais semelhanças com laranja azeda (Figura 2) (CARBONELL-CABALLERO et al., 2015; CURK et al., 2015a, 2015b; FROELICHER et al., 2011; LI et al., 2010; OLLITRAULT et al., 2012b).

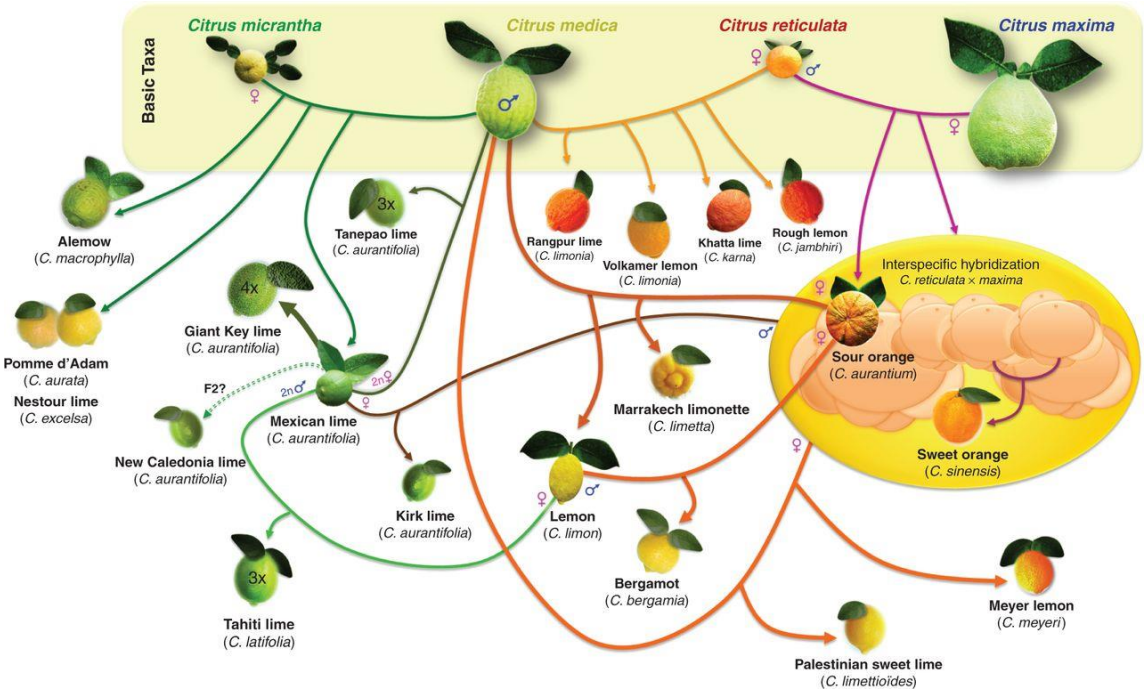



**Figura 2. E**strutura filogenética global e origem dos principais grupos de limões e limas. Os três principais ancestrais das espécies de citros descritos anteriormente e o quarto representante, estão representadas no topo da figura, sendo eles: Citrus medica, Citrus reticulata, Citrus maxima e Citrus micrantha e os possíveis cruzamentos que originaram as espécies de limões e limas. Fonte: Curk et al., 2016.

Apesar da disponibilização de genomas para novos estudos envolvendo filogenia de citros e a confirmação de eventos de hibridação em *C.* × *sinensis*, *C.* × *clementina*, *C.* × *aurantium* e demais espécies de citros de grande importância econômica, a estrutura genômica de outras espécies secundárias e a maioria das variedades modernas continuam

a ser estudadas. Além disso, nenhuma análise de filogenia de fragmentos de DNA a partir de todo o genoma foi ainda realizada. O sequenciamento do genoma inteiro (WGS) em grandes populações continua a ser caro e requer análises de bioinformática (CURK et al., 2014).

## 2.2 Porta-enxertos para citros

Todas as plantas comerciais de citros são constituídas de uma copa enxertada sobre um porta-enxerto. Os porta-enxertos influenciam muitas características dos citros, tais como: crescimento, absorção, resposta aos produtos de abscisão de folhas e de frutos; transpiração e composição química das folhas; síntese e utilização de nutrientes; porte, longevidade das plantas e precocidade de produção; maturação, coloração da casca e do suco; permanência e peso de frutos na planta; teores de açúcares, ácidos e de outros componentes do suco; tolerância fatores bióticos e abióticos, como salinidade; frio e seca; conservação pós-colheita; produtividade e qualidade da frutas (POMPEU JUNIOR, 1991; 2005; ERISMANN et al, 2008; SOUZA et al, 2010). Desta forma, muitas pesquisas ressaltam a importância da escolha correta dos porta-enxertos a serem utilizados e a influência que o porta-enxerto possui sobre a variedade de copa a ser utilizada.

Os porta-enxertos possuem grande efeito sobre o desenvolvimento do fruto, pois são responsáveis por fornecer água e nutrientes para a planta (ALBRIGO, 1992). Assim sendo, porta-enxertos que possuem maior vigor, possuem maior eficiência em extrair a umidade do solo, mantendo a planta hidratada. Por conta disto, muitos porta-enxertos induzem baixa concentração de sólidos solúveis nos frutos, mas produzem mais sólidos solúveis por planta (STUCHI et al., 1996).

Variações nas fases de maturação e desenvolvimento de frutos podem ser observadas, pelo fato, de haver grande influência do porta-enxerto no ciclo de frutificação. No entanto, a maior influência verificada é em relação ao desenvolvimento em tamanho das copas utilizadas (CASTLE e PHILLIPS, 1977; QUAGGIO et al., 2004).

A utilização de um único porta-enxerto para todas as variedades de copa não permite que as características particulares de cada cultivar sejam atendidas, impedindo que a planta manifeste seu potencial produtivo total, além de compor um grande problema por causa de moléstias endêmicas (SIQUEIRA et al., 2002).

Os porta-enxertos são induzidos pelas condições do solo e do clima, além de sofrer grande influência da copa e vice-versa. A ocorrência de doenças é influenciada pela umidade presente no solo, entretanto, isto depende da característica do porta-enxerto de ser resistente ou susceptível. No entanto, as condições do clima ocasionam mudanças no comportamento geral da combinação copa/porta-enxerto, sendo que a disponibilidade sazonal de água é a mudança climática que mais influência a produção, alterando várias fases do desenvolvimento da planta, tais como, o florescimento, a pega do fruto, o volume da produção e a qualidade do fruto. Os porta-enxertos são afetados pelo solo, pois apresentam diferentes características adaptativas aos diferentes tipos de solos. Essa plasticidade e adaptação do porta-enxerto é muito importante, pois admite a ampliação de áreas destinadas à exploração da cultura em distintos tipos de solos, condições climáticas e de manejo, empregando o uso de porta-enxertos com melhores condições de adaptação às condições de cada situação. Para o aumento na produção por área, solução de problemas fitossanitários, aumento da rentabilidade e qualidade dos frutos é de suma importância o conhecimento das características e comportamentos dos porta-enxertos a serem utilizados (PRUDENTE e SILVA, 2007).

Durante a escolha do melhor porta-enxerto a ser utilizado, os principais fatores a serem considerados são a tolerância às principais doenças e a resistência à seca. A tolerância a doenças é muito importante para a cadeia citrícola, sendo que os principais problemas ocorridos na citricultura nacional, como Gomose (*Phytophthora parasitica e Phytophthora citrophthora*), Tristeza (citrus tristeza vírus - CTV) e Declínio, em ordem cronológica, se instalaram em pomares em função da intolerância dos porta-enxertos utilizados em cada época (POMPEU JUNIOR, 1991; CARLOS et al., 1997).

Na década de 1940, o porta-enxerto que era exclusivamente utilizado na citricultura paulista era a laranjeira ‘Azeda’. O surgimento da tristeza em São Paulo em 1937 e a sua crescente dispersão pelo pulgão-preto e por borbulhas ocasionou a morte de plantas de citros, que haviam sido enxertadas no porta-enxerto dominante nos pomares, a laranjeira ‘Azeda’. A ocorrência desta doença nos pomares ocasionou a morte de aproximadamente 10 milhões de árvores, do total de 12 milhões existentes (MOREIRA; MOREIRA, 1991). Nesse momento, a busca de porta-enxertos tolerantes à tristeza, que possivelmente poderiam ser utilizados para reconstrução da citricultura, como limão-cravo e a tangerineira ‘Cleópatra’ foram utilizados (POMPEU JUNIOR, 2005).

Com a ocorrência do declínio dos citros, na década de 1970, houve uma grande diversificação na utilização dos porta-enxertos (RODRIGUEZ et al., 1979). Contudo, as

excepcionais características do limão-cravo, fizeram com que ele continuasse a predominar nos novos plantios (POMPEU JUNIOR, 2005).

O aparecimento da morte súbita dos citros (MSC), ocasionou novamente a diversificação dos porta-enxertos, sendo que a produção de mudas no ano de 2003, passou a ser 39,8 % de mudas de limão-cravo, 32,6% tangerineira 'Cleópatra' e 13,7 % citrumeleiro 'Swingle'. Variedades tolerantes como o *Poncirus trifoliata* e a tangerineira 'Sunki' também são utilizadas (POMPEU JUNIOR et al, 2004; 2005). A utilização de porta-enxertos substitutos do limão-cravo, o qual é susceptível à morte súbita dos citros (MSC) por outros resistentes, como tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex. Tanaka), 'Sunki' (*C. sunki* hort. ex Tanaka) e o citrumelo 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus* × *paradisi* Macfad.), aumentou significativamente (MÜLLER et al., 2002; POMPEU JUNIOR et al., 2004). Eembora o controle do declínio dos citros (RODRIGUEZ et al., 1979) e da morte súbita dos citros (BASSANEZZI et al., 2003) seja realizado através do uso de porta-enxertos tolerantes, como a tangerinas Cleópatra (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e Sunki [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] e citrumelo Swingle (*C.* × *paradisi* Macfaden x *Poncirus trifoliata* Rafinesque), estas espécies são menos tolerantes ao déficit hídrico do que o limão-cravo.

### 2.2.1 Limão-cravo (*Citrus* × *limonia)* e sua importância para a citricultura paulista

A partir da década de 60, com a utilização de clones nucelares na citricultura, o limão-cravo (*C.* × *limonia* L. Osbeck) se tornou o porta-enxerto mais utilizado para formação de pomares no Brasil, sendo fundamental para a citricultura paulista (POMPEU JUNIOR, 2005). A sua liderança no mercado citrícola, por apresentar características consideradas excepcionais, fez com que em 1970, 99% do total de mudas produzidas pertencessem a esse porta-enxerto (MOREIRA et al., 1991).

As excepcionais características apresentadas pelo limão-cravo, como grande vigor no viveiro antes e depois da enxertia, produção precoce, bom comportamento nos solos arenosos e de média a baixa fertilidade, compatibilidade com todas as cultivares copas, bom pegamento das mudas por ocasião do plantio no pomar, facilidade na obtenção das sementes, média resistência ao frio, rápido crescimento das plantas, altas produções de frutos de regular qualidade, média tolerância a gomose, tolerância as raças fracas do vírus da tristeza dos citros (CTV) e principalmente sua tolerância ao déficit hídrico tornaram-

no o preferido pelos viveiristas e citricultores. A tolerância a seca é essencial para a citricultura brasileira, uma vez que é pouco irrigada e depende de chuvas para o suprimento de água (CARNEIRO et al., 2011; POMPEU JUNIOR, 2005; SALIBE; MOREIRA, 1984).

Segundo SWINGLE, 1943, o limão-cravo era considerado um lemandarin, ou seja, um híbrido natural de limão (*C.* × *limon*) e tangerina, originado na região de Cantão, sul da China. Na classificação de TANAKA (1954) foi considerado uma espécie (*C.* × *limonia*), nativa da Índia onde é conhecido como Jamir (POMPEU JUNIOR, 2005). Há diversas denominações para esta espécie: Ragpur lime ou mandarin-lime (Estados Unidos), Canton lemon (China), Sylhet lime, Surrh nimboo e Sharbati (Índia), Hime lemon (Japão), Japansche citroen (Java), lima Rangpur (Argentina). No Brasil, além de limão-cravo, é conhecido também como limão rosa, vermelho, vinagre, selvagem, bugre e limpa-tacho (ROLFS & ROLFS, 1931).

Supõe-se que o limão-cravo tenha sido levado da Ásia para a Europa e posteriormente para as Américas, onde possivelmente foi introduzido no Brasil por colonizadores. O primeiro registro do uso de limão-cravo como porta-enxerto no Brasil foi relatado por ROLFS & ROLFS (1931), que encontraram plantas de laranjas enxertadas nesse porta-enxerto em Minas Gerais, em 1900 (POMPEU JUNIOR, 2005).

O limão-cravo vem sendo utilizado no Estado de São Paulo, desde 1920, porém em 1950 seu uso foi ampliado como substituto ao porta-enxerto predominante neste período; a laranja Azeda, que é susceptível ao vírus da tristeza dos citros (POMPEU JUNIOR, 2005).

Além da susceptibilidade as raças severas do vírus da tristeza dos citros, como a variante Capão Bonito (MULLER et al., 1968) e a morte súbita dos citros (BASSANEZI et al., 2002), o limão cravo é suscetível aos nematóides *T. semipenetrans* e *P. jaheni* (CAMPOS, 2002), ao declínio dos citros (BERETTA et al., 1986a), aos viróides da exocorte e xiloporose (POMPEU JUNIOR & SALIBE, 2002) e algumas seleções como Rangpur lime D.22.30 e o limão cravo híbrido n.2 mostraram-se suscetíveis ao vírus da galha lenhosa (CARVALHO et al., 2001).

# 3. OBJETIVOS

## 3.1 GERAL

Desvendar por meio de comparação de sequência genômicas a constituição genômica de limão-cravo (*Citrus* × *limonia*).

## 3.2 ESPECÍFICOS

Atribuir por meio da comparação de sequências genômicas a contribuição das espécies de citros utilizadas na análise comparativa para o genoma de limão ‘Cravo’.

Atribuir parentabilidade as sequências de limão-cravo utilizadas.

Avaliar a distribuição e a representatividade das sequências utilizadas na análise.

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Genomas e Sequências Disponíveis

O painel comparativo utilizado para estabelecer a origem filogenética de limão-cravo (*C.* × *limonia*) foi constituído da comparação de seu genoma com genomas de cinco espécies de citros (primeiro painel comparativo). Os genomas de *Citrus* × *limonia*, *Citrus medica* e *Citrus maxima* foram sequenciados pelo Centro APTA Citros "Sylvio Moreira", Cordeirópolis, Brasil. As informações sobre a montagem, assim como a descrição das espécies que compõem o primeiro painel comparativo são descritos na Tabela 1. Além dos genomas sequenciados pelo Centro de Citricultura, genomas de duas espécies já disponíveis, foram incluídos nas análises, sendo eles: *Citrus* × *clementina* e *C.* × *sinensis* (WU et al., 2014). Posteriormente, foram incluídos nas análises sequências públicas de dezenove outras espécies de citros (Tabela 2). A inclusão das sequências se deu pelo fato, de haver ausência de espécies pertencentes ao grupo dos limões (*C. limon*), limas (*C.* × *aurantiifolia*) na análise do primeiro painel comparativa. Além disso, se recorreu a bancos de sequências públicos, pois, ambos os grupos não apresentam genomas disponíveis e pelo fato de que outras espécies com sequências disponíveis poderiam ser inseridas nas análises de comparação genômica do segundo painel comparativo.

## 4.2 Mapeamentos de Sequências

Para avaliar a distribuição cromossômica das sequências de limão-cravo utilizadas na análise comparativa entre os os seis genomas disponíveis, 9.553 sequências que foram utilizadas no primeiro painel comparativo foram ancoradas nos nove cromossomos de *Citrus* × *clementina* haplóde (http://www.phytozome.net/clementine.php) (WU et al., 2014). A ancoragem das sequências de limão-cravo no genoma de referência foi realizada por meio de Blastn. O resultado do Blastn foi filtrado por meio de um programa Java, para obter as coordenadas genômicas de cada sequência. Em seguida, as coordenadas genômicas foram utilizadas para o mapeamento nos respectivos cromossomos de *C.* × *clementina*. Para a construção do mapa de ancoragem e visualização utilizou-se o programa MapChart vs. 2.3 (VOORRIPS, 2002).

### 4.3 Análise Comparativa

Para a comparação entre os genomas, duas etapas foram realizadas; primeiramente se realizou a comparação de sequências oriundas dos genomas de citros. Para esta etapa, foi necessária a criação de uma base de dados (banco de dados) para a realização das análises *in sílico* constituído das sequências genômicas das espécies. A base de dados foi constituída de 513.098 sequências de *Citrus* × *limonia*, 78.481 de *Citrus medica*, 297.599 de *Citrus reticulata*, 1.398 de *Citrus* × *clementina*, 132.150 de *C.* × *sinensis* e 315.837 de *Citrus maxima.* Posteriormente, as sequências disponíveis neste banco de dados foram comparadas às sequências de limão cravo através de buscas de similaridade.

Na segunda etapa foi realizada a integração de sequências de outros representantes do gênero que não foram anteriormente incluídas nas análises por não apresentarem genoma disponível. Diferentemente da etapa anteriormente descrita, nesta recorreu-se a busca de sequências em banco de dados público [NCBI (National Center for Biotechnology Information) - www.ncbi.nlm.nih.gov]. Alguns critérios foram estabelecidos para a seleção das sequências; adotou-se a exclusão manual de sequências de origem citoplasmáticas (cpDNA e mtDNA) e nucleares correspondentes a transposases e marcadores microssatélites (SSRs). Após a remoção de sequências citoplasmáticas, transposons e de microssatélites, realizou-se a criação de um segundo banco de dados constituído das sequências selecionadas nesta segunda etapa e dos genomas utilizados na primeira etapa.

### 4.4 Alinhamento Local e Extração de Sequências

A busca por similaridade foi realizada com o programa de alinhamento local Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL, 1997). O resultado do alinhamento foi filtrado com auxílio de um programa Java, com o objetivo selecionar apenas fragmentos de sequências de limão-cravo que apresentavam alta similaridade com sequências de todos as outras espécies utilizadas, o programa também realizou a seleção de fragmentos igual ou maiores que 1,5 Kb no primeiro painel e 300 pb no segundo painel. Na segunda etapa, utilizou-se o limite inferior de 300 pb, pois, buscou-se regiões que

**Tabela 1.** Informações dos genomas (drafts) sequenciados pelo Centro de Citricultura ou disponíveis publicamente utilizados no primeiro painel comparativo.

| Espécie | Nome comum | Sequenciamento | N50 | Número de contigs | Cobertura genômica | Número de reads sequenciados | Total de bases |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Citrus* × *limonia* Osbeck cv. St. Barbara [1] | Limão-cravo cv. St. Barbara | Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' | 1.184 | 513.098 | 31,65 | 942.659.464 | 95.393.157.060 |
| *Citrus medica* [1] | Cidra doce | Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' | 11.275 | 78.481 | 17,40 | 532.157.632 | 52.439.734.239 |
| *Citrus maxima* [1] | Toranja cv. Vermelha | Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' | 2.251 | 315.837 | 26,88 | 830.305.994 | 81.028.318.358 |
| *Citrus reticulata* Blanco[1] | Tangerina 'Ponkan' | Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' | 2.745 | 297.599 | 26,93 | 830.877.303 | 81.158.950.455 |
| *Citrus* × *clementina* Hort. ex Tan. cv. Nules[2*] | Clementina Nules Haplóide | WU et al. 2014 | n/a | 1398* | n/a | n/a | n/a |
| *C.* × *sinensis* (L.) Osb. cv. Pineapple[2] | Laranja doce 'Pineapple' | WU et al. 2014 | n/a | 132.150 | n/a | n/a | n/a |

[1] - Genomas sequenciados pelo Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' - CCSM.

[2] - Genomas disponíveis publicamente (WU et al. 2014).

* - O genoma de *Citrus* × *clementina* está montado a nível de cromossomo (nove cromossomos e scaffolds não alocados), por isso, apresenta menor número de contigs em relação aos demais genomas que encontram-se como drafts.

n/a - informações não avaliadas.

| Espécie | Taxonomy ID | Nome comum | Sistema de Swingle (1943) | Sistema de Tanaka (1954) | Nº de sequências (NCBI)[1] | Nº de sequências utilizadas[2] | Nº de sequências avaliadas[3] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *C. unshiu* | 55188 | Tang. 'Satsuma' | *C. reticulata* Blanco | *C. unshiu* Marcow | 288 | 260 | 156 |
| *C. limon* | 2708 | Limão verdaeiro | *C. limon* | *C. limon* (L.) Burm.f. | 191 | 92 | 44 |
| *C. reshni* | 171252 | Tang. 'Cleopatra' | *C. reticulata* Blanco | *C. reshni* Hort. ex Tan | 82 | 75 | 37 |
| *C. aurantium* | 43166 | Laranja azeda | *C. aurantium* | *C. aurantium* L. | 109 | 58 | 49 |
| *C. aurantiifolia* | 159033 | Lima ácida | *C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle | *C. aurantiifolia* (Christm.) | 58 | 36 | 25 |
| *C. jambhiri* | 64884 | Limão rugoso | *C. limon* | *C. jambhiri* Lush | 52 | 33 | 25 |
| *C. ichangensis* | 2709 | Ichang papeda | *C. ichangensis* Swing. | *C. ichangensis* Swing. | 52 | 31 | 15 |
| *C. nippokoreana* | 237570 | Korai tachibana | *C. reticulata* Blanco | *C. nippokoreana* Tan. | 17 | 14 | 13 |
| *C. amblycarpa* | 481546 | Tang. 'Nasnaran' | *C. reticulata* Blanco | *C. amblycarpa* (Hassk.) | 12 | 12 | 12 |
| *C. halimii* | 416192 | Mountain | *C. halimii* B.C. Stone (Tan. Class.) | *C. halimii* B.C.Stone | 19 | 11 | 10 |
| *C. limettioides* | 200542 | Lima doce | *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. | *C. limettioides* Tan. | 26 | 11 | 11 |
| *C. hystrix* | 170989 | Combava/Makrut lime | *C. hystrix* DC. | *C. hystrix* DC. | 25 | 10 | 10 |
| *C. longispina* | 481548 | Canniisan | *C. longispina* Wester | *C. longispina* Wester | 9 | 9 | 9 |
| *C. tachibana* | 200544 | Tachibana | *C. tachibana* (Mak.) Tan | *C. tachibana* Tanaka | 37 | 6 | 5 |
| *C. depressa* | 697036 | Tang. 'Shekwasha' | *C. reticulata* Blanco | *C. depressa* Hayata | 27 | 5 | 5 |
| *C. sunki* | 237574 | Tang. 'Sunki' | *C. reticulata* Blanco | *C. sunki* (Hayata) Hort. ex Tan. | 7 | 5 | 5 |
| *C. indica* | 341931 | Indian wild orange | *C. indica* | *C. indica* Tan. | 21 | 5 | 5 |
| *C. deliciosa* | 558547 | Mex. do 'Rio' | *C. reticulata* Blanco | *C. deliciosa* Ten. | 5 | 4 | 2 |
| *C. bergamia* | 380129 | Bergamota | *C. aurantifolia* var Bergamia | *C. bergamia* Risso and Poit. | 10 | 2 | 1 |

**Tabela 2.** Espécies de *Citrus* com sequências disponíveis utilizadas na etapa de comparação de genomas, oriundas de banco de dados de sequências.

**[1]-** Número total de sequências nucleotídicas disponíveis no NCBI, **[2]-** Número de sequências remanescentes após remoção de marcadores microssatélites, transposons e de origem citoplasmática, **[3]-** Número total de sequências avaliadas após a Blastn, somente sequências presentes em todas as espécies foram avaliadas.

estivessem presentes em todas as espécies incluídas na análise e como as sequências possuíam tamanho menor e eram de diferentes espécies, preferiu-se utilizar este paramêtro. No total, 9.594 sequências maiores ou iguais a 1,5 Kb (1.500 pb - 4.925 pb) foram selecionadas pelo programa na primeira etapa e valores distintos de sequências para cada espécie utilizada no segundo painel comparativo foram obtidos na segunda etapa. As sequências selecionadas na primeira etapa, originaram arquivos de coordenadas genômicas e posteriormente foram utilizadas para a extração das sequências nos respectivos genomas. A extração das sequências, foi realizado a partir do arquivo multi-fasta com o auxílio do programa BedTools vs. 2.25, comando "getfasta" (QUINLAN; HALL, 2010). Para isto, um script wrapper em Perl (perl wrapper script) foi escrito para executar o programa Bedtools com o comando "getfasta".

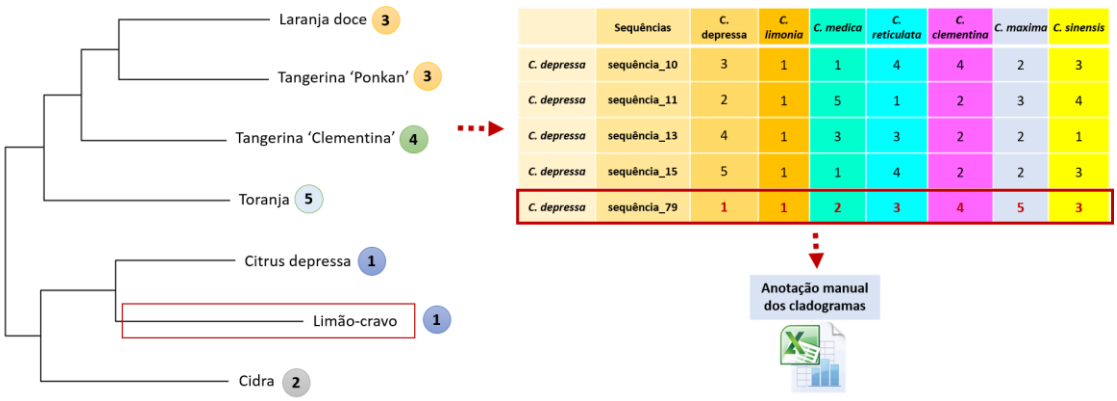
### 4.5 Alinhamento Múltiplo das Sequências

Os arquivos de sequências nucleotídicas de origem genômicas foram utilizados para alinhamento múltiplo utilizando-se o modo de alinhamento progressivo no programa Tcoffee vs. 11.0 (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). O alinhamento múltiplo individual dos arquivos de sequências foi realizado por meio de um script wrapper em Perl, onde o programa T-coffee foi executado com a opção "cdna" como padrão. Como resultado padrão do alinhamento múltiplo realizado pelo programa T-coffee, três arquivos são gerados: o resultado do alinhamento em formato de texto (.txt), o alinhamento em formato HTML e um cladograma gerado pelo método neighbor joining. Os cladogramas gerados foram utilizados para análise de contribuição genômica das diferentes espécies para o genoma de limão-cravo.

### 4.6 Avaliação da Contribuição Genômica

Para a estimativa da contribuição de cada espécie para o genoma de limão-cravo, os cladogramas gerados na etapa de alinhamento múltiplo foram avaliados individualmente. Dois métodos distintos de avaliação foram realizados para os 9.594 cladogramas provenientes do alinhamento múltiplo das sequências genômicas pertencentes ao primeiro painel comparativo, sendo que o primeiro foi através de um

script Perl e a segundo por meio do pacote Phylip vs. 3.6 (FELSENSTEIN, 1993). No entanto, para a avaliação dos 439 cladogramas originados da comparação de sequências genômicas e gênicas que constituíram o segundo painel comparativo, nenhum script Perl foi utilizado. Para a avaliação individual de cada cladograma, realizou-se a anotação manual de cada cladograma e em seguida utilizou o programa Phylip. Para a avaliação individual de cada cladograma, estipulou-se valores numéricos para cada sequência, sendo que, os cladogramas foram constituídos de sete sequências, cada uma representando uma espécie distinta e os valores estipulados a cada sequência variavam de um a sete. As sequências foram avaliadas de acordo com a similaridade entre si e estipulou-se valores de acordo com a proximidade e distância, sendo que a espécie avaliada por padrão sempre recebia o valor ‘um’ e as demais ou o mesmo valor, caso fossem próximas e estivessem no mesmo clado ou um valor diferente caso fossem distantes. Posteriormente, os valores estipulados para cada sequência foram anotados individualmente em uma planilha e os cladogramas com ausência de alguma sequência foram desconsiderados. Por fim, se contabilizou a ocorrência do valor “um” em cada coluna e o valor de sequências similares a limão-cravo foi obtido (Figura 3).




| | Sequências | C. depressa | C. limonia | C. medica | C. reticulata | C. clementina | C. maxima | C. sinensis |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C. depressa | sequência_10 | 3 | 1 | 1 | 4 | 4 | 2 | 3 |
| C. depressa | sequência_11 | 2 | 1 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| C. depressa | sequência_13 | 4 | 1 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 |
| C. depressa | sequência_15 | 5 | 1 | 1 | 4 | 2 | 2 | 3 |
| C. depressa | sequência_79 | 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 3 |

**Figura 3.** Anotação manual dos cladogramas que constituíram o segundo painel comparativo. Os 439 cladogramas que constituíram o segundo painel comparativo foram anotados individualmente e manualmente. Estipulou-se valores numéricos para cada uma das sete sequências que constituirão os cladogramas de acordo com a proximidade e distância a limão-cravo, espécie de referência (valor 1). Sequências de espécies situadas no mesmo clado de limão-cravo receberão o mesmo valor (valor1), enquanto que, sequências em clados diferentes receberam valores distintos de limão-cravo de acordo com sua distância.

Para a construção de um cladograma consenso das sequências presentes em cada painel comparativo, o pacote Phylip vs. 3.6 com o programa “consensus tree” foi

utilizado. As pipelines utilizadas em cada painel comparativo são demostradas na Figura 4.

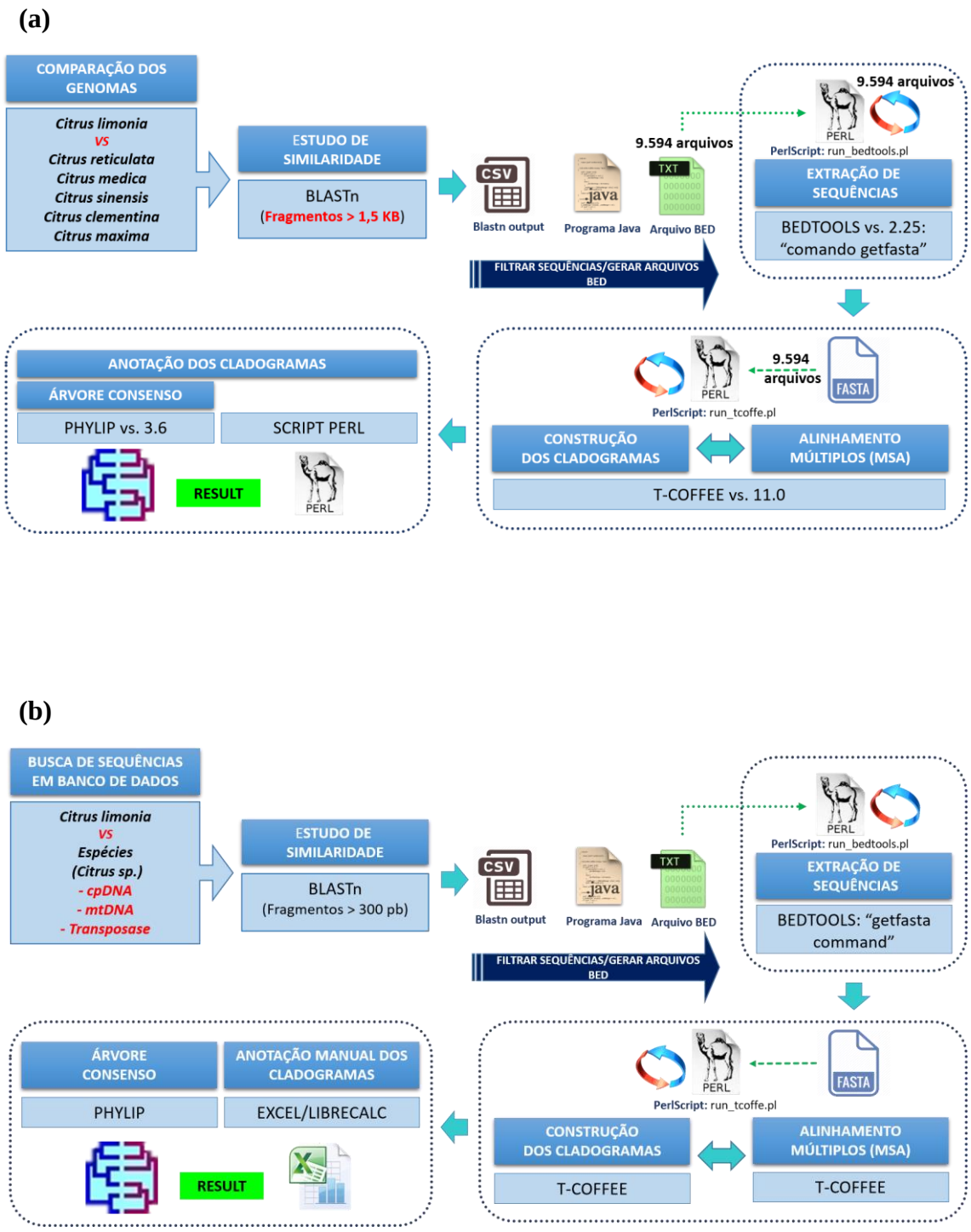



**Figura 4.** Pipelines utilizadas na comparação das sequências genômicas das espécies investigadas quanto à similaridade com *Citrus* × *limonia*. **(a)** etapas para a comparação de sequências advindas de genomas, e em **(b)** para sequências oriundas de genomas e banco de dados público (NCBI).

# 5. RESULTADOS

## 5.1 Mapeamento de Sequências Genômicas

Afim de esclarecer a distribuição cromossômicas e a representatividade das sequências de limão-cravo (*C.* × *limonia*) utilizadas, 9,553 sequências foram mapeadas nos cromossomos de clementina (*C.* × *clementina*). A localização genômica das sequências nos nove cromossomos (scaffolds, conjunto básico) de *Citrus* × *clementina* (WU et al., 2014) é fornecido na Figura 5. Os dados confirmam a representatividade das sequências utilizadas, sendo que, todos os nove cromossomos de clementina apresentaram sequências similares a limão-cravo, além disso, verificou-se que as sequências apresentaram uma distribuição cromossômica uniforme.




**Figura 5.** Distribuição cromossômica das sequências de limão-cravo (*Citrus* × *limonia*). Um total de 9.553 sequências de limão-cravo foram mapeadas nos nove cromossomos de *Citrus* × *clementina* cv. Nules, usando-se o Blastn para localização especial das sequências e suas coordenadas para o mapeamento propriamente dito no genoma de referência haplóide de *C.* × *clementina*.

## 5.2 Análise Comparativa de Sequências

### 5.2.1 Comparação de sequências genômicas

Para obter conhecimento sobre a origem de limão-cravo, foi avaliado um conjunto de 948.437.749 sequências (99,95% Illumina e 0,05% de 454) que resultaram em 409.783.077 nucleotídeos (1,1 x cobertura), distribuídos em 513.098 contigs, que foram

comparados com o primeiro painel, contendo sequências genômicas de *Citrus* × *clementina*, *Citrus* × *sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus medica* e *Citrus maxima*. Os fragmentos maiores que 1,5 kb presentes em todas as espécies foram avaliados quanto ao nível de similaridade entre si.

A análise de comparação dos genomas pertencentes ao primeiro painel, retornou como resultados 9.594 arquivos. O processamento destes arquivos de saída do Blastn gerou novos arquivos, contendo agora as coordenadas das regiões similares de cada sequência de cada uma das seis espécies utilizadas na análise, totalizando 57,564 sequências. Posteriormente, estes 9.594 novos arquivos foram utilizados para gerarem os cladogramas, que foram avaliados de duas formas, a primeira, por meio de um script na linguagem Perl e a segunda forma de análise dos cladogramas, por meio do pacote de programas PHYLIP. Ambos os métodos retornaram os mesmos valores, sendo que do total de cladogramas gerados, 6.968 (72,63%) apresentaram similaridades entre as sequências de limão-cravo e as demais espécies utilizadas na análise e, em 2.626 (27,37 %) cladogramas, as sequências de limão-cravo não mostraram similaridade com todas as demais espécies.

De acordo, com os cladogramas avaliados, a cidra (*C. medica*) foi a espécie que apresentou maior similaridade com as sequências genômicas de limão-cravo. No total, cerca de 4.338 cladogramas evidenciaram a clusterização das sequências de limão-cravo com a cidra. Quando considerados somente os 6.968 cladogramas, ou seja, aqueles que apresentaram clusterização das sequências de limão-cravo com as sequências de alguma das espécies inseridas na análise, a correspondência seria de 62,3%, enquanto que, ao considerar-se o total de 9.594 cladogramas, isto representaria 45,2%. A segunda espécie a apresentar o maior número de sequências mais similares a limão-cravo foi *C. clementina*, com 1.459, cerca de 20,9% dos cladogramas que apresentaram maior similaridade com limão-cravo e 15,2% do total de cladogramas avaliados. A toranja (*C. maxima*), foi a terceira espécie a apresentar maior similaridade com *C.* × *limonia*, em um total de 534 cladogramas. As demais espécies com similaridade foram: tangerina ‘Ponkan’ (*C. reticulata*) com cerca de 409 cladogramas e, em seguida, laranja doce (*C.* × *sinensis*) com 228 cladogramas apresentando maior similaridade com as sequências de limão-cravo. Para a visualização dos resultados, um cladograma consenso foi gerado (Figura 6).

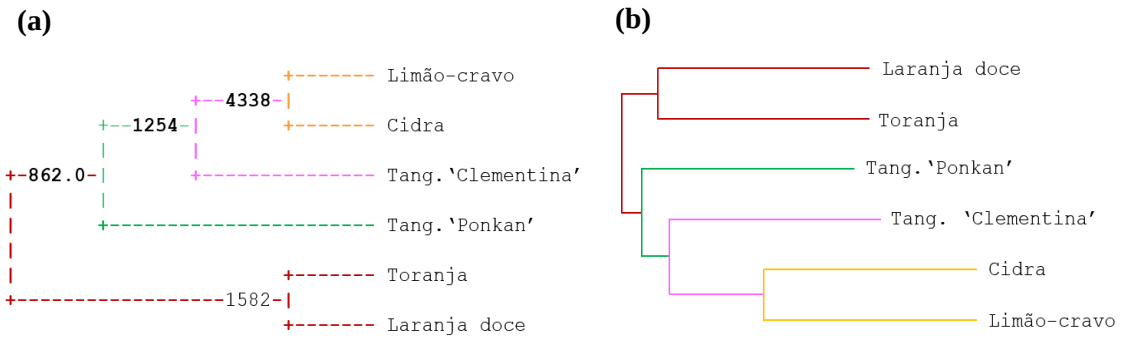



**Figura 6.** Cladograma consenso de espécies cítricas. Todos os cladogramas obtidos através do programa T-coffee vs. 11.0 foram utilizados para a construção do cladograma consenso através do pacote PHYLIP v. 3.6 por meio do programa "consensus tree". **(a)** - cladograma consenso com os números de cladogramas similares entre as espécies. **(b)** - cladograma simplificado.

Todos os 9.594 cladogramas foram utilizados pelo pacote de programas PHYLIP, e a árvore consenso foi determinada através do programa "consensus tree". O cladograma consenso gerado demonstrou que 4.359 sequências genômicas de limão-cravo relacionadas com as sequências genômicas de cidra, enquanto que 1.254 sequências apresentaram similaridade entre as três espécies (*C.* × *limonia*, *C. medica* e *C.* × *clementina*). Somente 862 cladogramas, do total avaliado, apresentaram sequências similares entre *C. reticulata* e *C. limonia*, *C. medica* e *C. clementina*. A toranja e laranja doce apresentaram, 1.582 cladogramas em que suas sequências apresentaram maior similaridade. Nenhum cladograma apresentou sequências similares entre todas as espécies avaliadas. A proporção genômica de limão-cravo é apresentada na Figura 7.

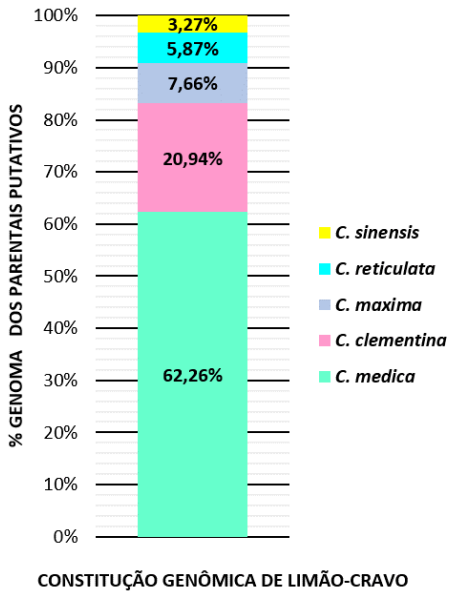



**Figura 7.** Proporção do genoma de limão-cravo (*C.* × *limonia*) baseada na comparação de sequências genômicas de diferentes espécies de *Citrus*.

### 5.2.2 Comparação de sequências gênicas e genômicas

Para incluir outras espécies de citros, principalmente, representantes do grupo dos limões e tangerinas ácidas nas análises e ter maiores informações a respeito da filogenia de limão-cravo, recorremos a banco de dados públicos de sequências (NCBI) e no total dezenove espécies de citros com sequências disponíveis foram incluídas nas análises.

As análises de comparação das sequências oriundas de banco de dados públicos e dos genomas completos utilizados no primeiro painel foi similar à realizada no primeiro painel comparativo, agora com dezenove espécies de *Citrus*, sendo oito espécies representantes do grupo das tangerinas (*C. depressa*, *C. reshni*, *C. sunki*, *C. unshiu*, *C. amblycarpa*, *C. nippokoreana*, *C. tachibana*, *C. deliciosa*), cinco espécies de *Papeda* (*C. halimii*, *C. hystrix*, *C. longispina*, *C. bergamia* e *C. ichangensis*, assim como limão-cravo, designado como "mandarin-like"), duas espécies do grupo dos limões (*C.* × *limon* e *C.* × *jambhiri*), duas limas (*C.* × *aurantiifolia* e *C. limettioides*), uma laranja azeda (*C. aurantium*) e uma espécie selvagem primitiva de citros, *C. indica*. No total, foram selecionadas 1.047 sequências oriundas do NCBI, que após a filtragem para a remoção de sequências de origem citoplasmática e regiões genômicas correspondentes à transposons, resultaram em apenas 679 sequências, que foram submetidas as análises. O resultado do alinhamento obtido e analisado pelo programa Java, resultou em 439 sequências, que foram utilizadas e avaliadas separadamente, de acordo com cada espécie utilizada, para a busca de similaridade com os genomas de limão-cravo, toranja, cidra, tangerina e clementina (Tabela 2).

Dentre todas as espécies cítricas utilizadas no segundo painel comparativo, a que apresentou maior número de sequências com maior similaridade a limão-cravo foi uma tangerina, *C. depressa*, com cerca de 40% do total de sequências avaliadas. *C. depressa* é um porta-enxerto possivelmente originária de Taiwan e Okinawa, no Japão e possui como característica um fruto pequeno com sementes poliembriônicas com cotilédones verdes, de cor laranja e ácido, alcançando um sabor palatável com o amadurecimento. As sequências gênicas de *C. depressa* utilizadas, não apresentaram maior similaridade com nenhuma das demais espécies utilizadas na análise, inclusive com as sequências de *C.* × *clementina*. Tangerina 'Cleopatra' (*C. reshni*) apresentou cerca de 21,6% de suas sequências com maior similaridade a limão-cravo, ao contrário, do resultado encontrados para *C. depressa*, tangerina 'Cleopatra' apresentou o mesmo valor de similaridade para as sequências de limão-cravo e *C.* × *clementina*, cerca de 21.6% e 18,9%.

**Tabela 3.** Proporção genômica das espécies de *Citrus* utilizadas na etapa de comparação de genomas, oriundas de banco de dados de sequências. O número de sequências avaliadas, proporção genômica (%) relativo a o total de sequências avaliadas para cada espécie é apresentado.

| **Espécie** | **Nº de sequências** | ***C.* × *limonia*** | **%** | ***C. medica*** | **%** | ***C. reticulata*** | **%** | ***C.* × *clementina*** | **%** | ***C. maxima*** | **%** | ***C.* × *sinensis*** | **%** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***C. depressa*** | 5,0 | 2,0 | 40,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ***C. reshni*** | 37,0 | 8,0 | 21,6 | 2,0 | 5,4 | 7,0 | 18,9 | 8,0 | 21,6 | 3,0 | 8,1 | 6,0 | 16,2 |
| ***C.* × *limon*** | 44,0 | 9,0 | 20,5 | 10,0 | 22,7 | 6,0 | 13,6 | 2,0 | 4,5 | 3,0 | 6,8 | 3,0 | 6,8 |
| ***C.* × *jambhiri*** | 25,0 | 5,0 | 20,0 | 6,0 | 24,0 | 3,0 | 12,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 8,0 | 3,0 | 12,0 |
| ***C. sunki*** | 5,0 | 1,0 | 20,0 | 1,0 | 20,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ***C. halimii*** | 10,0 | 2,0 | 20,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ***C. unshiu*** | 156,0 | 23,0 | 14,7 | 20,0 | 12,8 | 22,0 | 14,1 | 17,0 | 10,9 | 25,0 | 16,0 | 26,0 | 16,7 |
| ***C. ichangensis*** | 15,0 | 2,0 | 13,3 | 1,0 | 6,7 | 1,0 | 6,7 | 2,0 | 13,3 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 6,7 |
| ***C. aurantifolia*** | 25,0 | 3,0 | 12,0 | 9,0 | 36,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 4,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ***C. limettioides*** | 11,0 | 1,0 | 9,1 | 4,0 | 36,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 18,2 | 1,0 | 9,1 |
| ***C. amblycarpa*** | 12,0 | 1,0 | 8,3 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 25,0 | 1,0 | 8,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ***C.* × *aurantium*** | 49,0 | 4,0 | 8,2 | 11,0 | 22,4 | 7,0 | 14,3 | 4,0 | 8,2 | 3,0 | 6,1 | 2,0 | 4,1 |
| ***C. nippokoreana*** | 13,0 | 1,0 | 7,7 | 1,0 | 7,7 | 3,0 | 23,1 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 15,4 | 0,0 | 0,0 |
| ***C. hystrix*** | 10,0 | 0,0 | 0,0 | 6,0 | 60,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ***C. tachibana*** | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 40,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 20,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ***C. longispina*** | 9,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 22,2 | 1,0 | 11,1 | 3,0 | 33,3 | 0,0 | 0,0 |
| ***C. bergamia*** | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ***C.* × *deliciosa*** | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| ***C. indica*** | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

A tangerina ‘Cleopatra’, possivelmente é originária da Índia, apresenta fruto vermelho-alaranjado, pequeno e áspero, com sabor um pouco de ácido e com frutificação durante o ano todo. Assim como limão-cravo, tangerina ‘Cleopatra’ é utilizada na citricultura como porta-enxerto.

Limão-cravo também apresentou alta similaridade de sequências com limão verdadeiro (*C.* × *limon*) 20,5% e limão rugoso (*C.* × *jambhiri*) 20%, no entanto, ambas as espécies apresentaram maior similaridade com cidra (*C. medica*), cerca de 22,7% e 24,0%, respectivamente. O limão rugoso é possivelmente nativo da Índia e é utilizado como porta-enxerto, apresenta fruto ácido de cor que varia do amarelo-limão ao amarelo-alaranjado. *C. sunki*, uma tangerina ácida utilizada como porta-enxerto, exibiu sequências similares apenas com limão-cravo e clementina, apresentando concomitantemente, 20 % de sequências mais similares a essas duas espécies. Entre as espécies pertencentes ao subgênero *Papeda*, somente *C. halimii* e *C. ichangensis* apresentaram sequências gênicas mais similares a limão-cravo, e as demais espécies, (*C. hystrix, C. longispina, C. bergamia*), não apresentaram sequências com maior similaridade com limão ‘Cravo’. *C. hystrix, C. tachibana* e as duas limas, *C.* × *aurantiifolia* e *C. limettioides*, apresentaram maior similaridade com cidra, cerca de 60%, 40%, 36% e 36,4%, respectivamente das sequências avaliadas. Já bergamota (*C. bergamia - Papeda)*, tangerina do ‘Rio’ (*C.* × *deliciosa*) e a espécie selvagem de citros, *C. indica* não apresentaram nenhuma sequência com mais alta similaridade com nenhuma das espécies utilizadas nas análises.

As espécies que apresentaram maior número de sequências similares a *C.* × *limonia*, foram *C. depressa, C. reshni, C. sunki*, representantes do grupo das tangerinas e *C. halimii* e *C. ichangensis* do subgênero *Papeda*. Quando os cladogramas consenso das respectivas espécies são avaliados (Figura 8), verifica-se a clusterização destas espécies no grupo contendo limão ‘Cravo’ (*C.* × *limonia*) e cidra (*C. medica*).

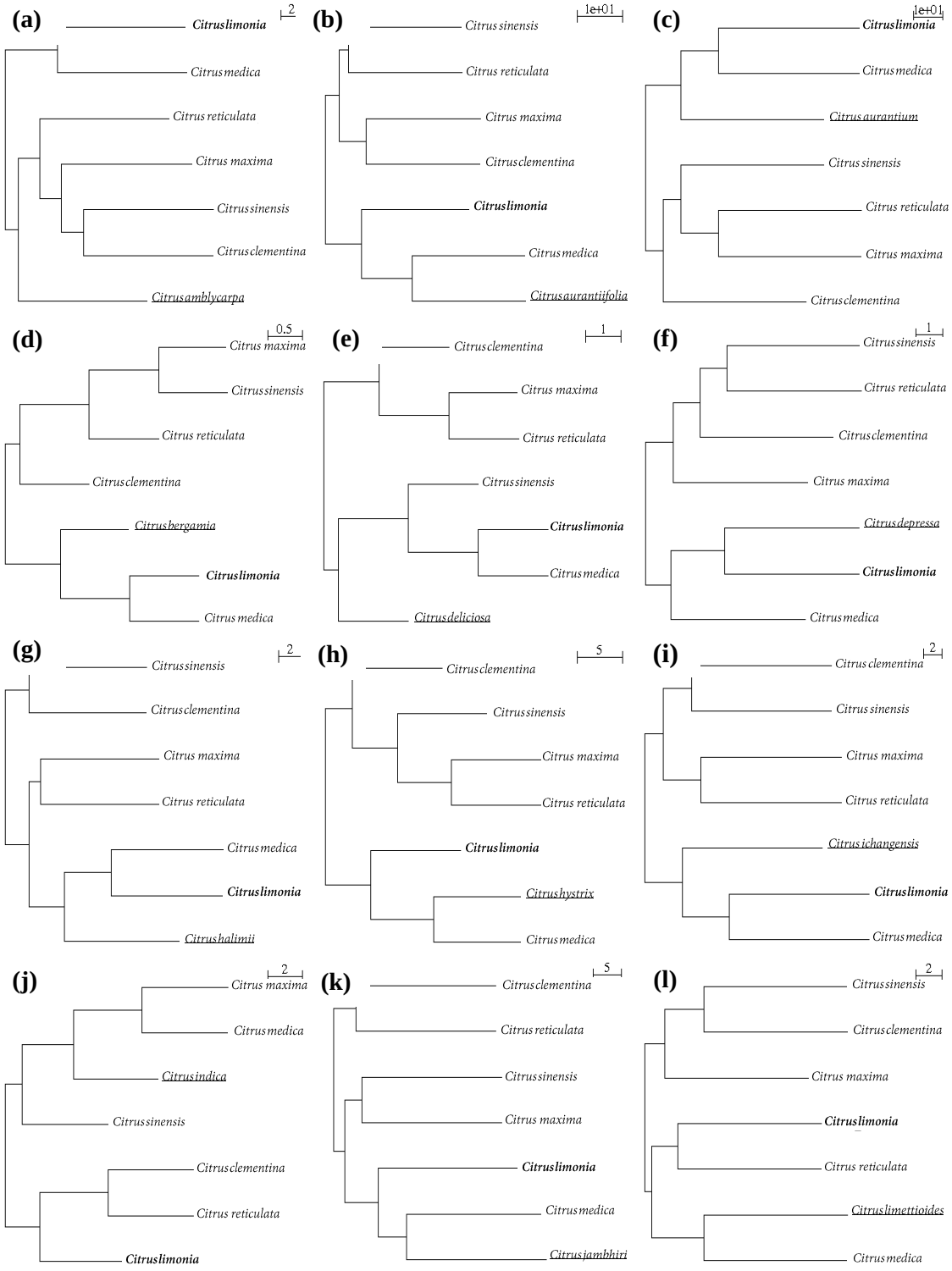



**Figura 8.** Cladogramas consenso de sequências gênicas e genômicas de espécies de citros. Todos os cladogramas obtidos pelo programa T-Coffee foram utilizados para a construção dos cladogramas consenso por meio do pacote de programas PHYLIP vs. 3.6 utilizando o programa "consensus tree". Os cladogramas consenso com as respectivas espécies de citros analisadas em relação à similaridade com sequências genômicas de *C.* × *limonia*, *C. medica*, *C. maxima*, *C. reticulata* e *C.* × *clementina*, são apresentados; **(a)** *C. ambrycarpa*, **(b)** *C.* × *aurantifolia*, **(c)** *C.* × *aurantium*, **(d)** *C. bergamia*, **(e)** *C. deliciosa*, **(f)** *C. depressa*, **(g)** *C. halimii*, **(h)** *C. hystrix*, **(i)** *C. ichangensis*, **(j)** *C. indica*, **(k)** *C.* × *jambhiri*, **(l)** *C. limettioides*, **(m)** *C.* × *limon*, **(n)** *C. longispina*, **(o)** *C. nippokoreana*, **(p)** *C. reshni*, **(q)** *C. sunki*, **(r)** *C. tachibana* e **(s)** *C. unshiu*. Em cada cladograma consenso limão-cravo foi destacado em negrito e a localização de cada uma das dezenove espécies utilizadas é identificada com sublinhado.

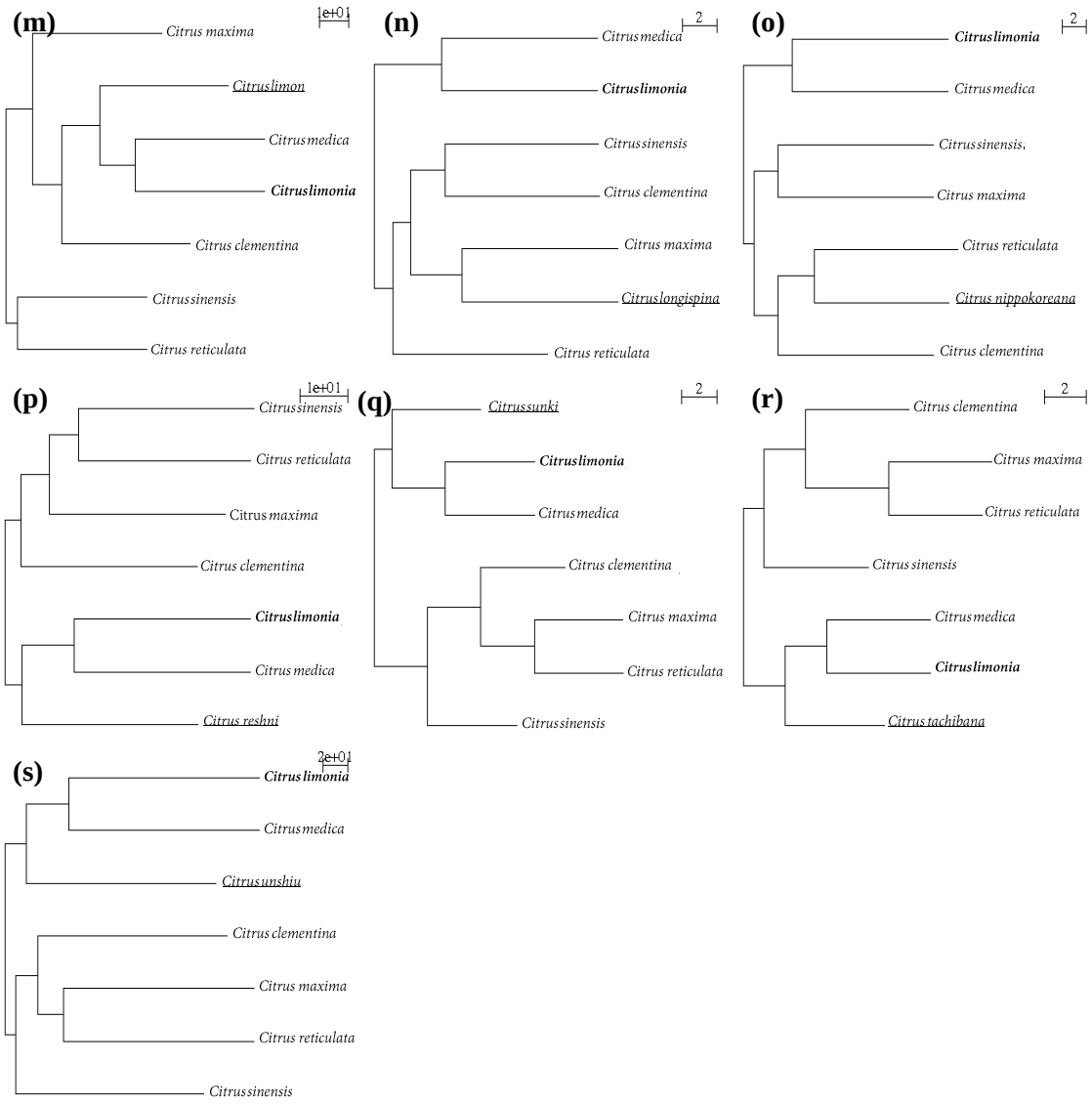



**Figura 8 (Continuação).** Cladogramas consenso de sequências gênicas e genômicas de espécies de citros. Todos os cladogramas obtidos pelo programa T-Coffee foram utilizados para a construção dos cladogramas consenso por meio do pacote de programas PHYLIP vs. 3.6 utilizando o programa "consensus tree". Os cladogramas consenso com as respectivas espécies de citros analisadas em relação à similaridade com sequências genômicas de *C.* × *limonia*, *C. medica*, *C. maxima*, *C. reticulata* e *C.* × *clementina*, são apresentados; **(a)** *C. ambrycarpa,* **(b)** *C.* × *aurantifolia*, **(c)** *C.* × *aurantium*, **(d)** *C. bergamia*, **(e)** *C. deliciosa*, **(f)** *C. depressa*, **(g)** *C. halimii*, **(h)** *C. hystrix*, **(i)** *C. ichangensis*, **(j)** *C. indica*, **(k)** *C.* × *jambhiri*, **(l)** *C. limettioides*, **(m)** *C.* × *limon*, **(n)** *C. longispina*, **(o)** *C. nippokoreana*, **(p)** *C. reshni*, **(q)** *C. sunki*, **(r)** *C. tachibana* e **(s)** *C. unshiu*. Em cada cladograma consenso limão-cravo foi destacado em negrito e a localização de cada uma das dezenove espécies utilizadas é identificada com sublinhado.

# 6. DISCUSSÃO

Desde o início das pesquisas envolvendo caracterização e filogenia de citros, a fim de esclarecer e facilitar sua classificação botânica, inúmeros relatos e sugestões foram feitas na tentativa de elucidar a história evolutiva e as etapas da domesticação que levaram à origem desde grupo de frutíferas de grande importância histórica e econômica.

Os sistemas de classificação propostos para o gênero citros e atualmente aceitos, SWINGLE (1943) revisado por REECE (1967) e o de TANAKA (1954, 1961), desempenharam um grande papel para a compreensão das relações filogenéticas deste grupo de plantas. Apesar destes sistemas terem se baseado simplesmente em dados morfológicos, suposições já foram feitas a respeito da origem de algumas espécies cítricas, especialmente a de limão-cravo (*C.* × *limonia*). Uma das primeiras suposições a respeito da origem de limão-cravo foi feita por WEBBER (1943) que acreditava que limão-cravo era originário do cruzamento entre lima ácida (*C.* × *aurantiifolia*) e tangerina (*C. reticulata* Blanco), sendo mais próximo das tangerinas. Com o avanço nas pesquisas envolvendo filogenia de citros, novas sugestões foram surgindo, e desde a proposta inicial, outras espécies foram incluídas como possíveis parentais, como o limão-rugoso (*Citrus* × *jambhiri* Lush.) (SINGH & SCHROEDER, 1962; GULSEN & ROOSE, 2001a; LI et al., 2010) e a cidra (*C. medica*) (BARRETT & RHODES, 1976; FEDERICI et al., 1998; NICOLOSI et al., 2000). Entretanto, a maioria das sugestões a respeito da origem de limão-cravo, assumiam que *C. reticulata* era seu parental materno, uma suposição além dos dados gerados, baseada principalmente pelas características fenotípicas e morfológicas, principalmente do fruto. O fruto de limão-cravo é muito parecido com o de uma tangerina, apresenta facilidade de descascamento, a cor do fruto é laranja-avermelhado e a polpa de cor laranja, isto, fez com que esta espécie recebesse alguns nomes como “mandarin-like” e “lemandarin”, que designavam a sua relação ao grupo das tangerinas.

A seguir, discute-se a contribuição dos grupos de espécies de citros (cidras, tangerinas, toranjas e laranjas, limões e limas, e espécies do subgênero *Papeda*) para o genoma de limão ‘Cravo’.

## 6.1 Contribuição das Cidras (*Citrus medica*)

No presente estudo, os dados referentes à análise comparativa de sequências genômicas exclusivas entre as espécies avaliadas, confirmou a predominância de sequências de cidra (*C. medica*) na constituição genômica de limão-cravo. Do total de 6.968 cladogramas com sequências de limão-cravo avaliados, 4.338 apresentaram sequências com maior similaridade com a cidra, correspondendo a cerca de 62.3% dos cladogramas avaliados. Esse resultado está de acordo com os descritos anteriormente (BARRETT & RHODES, 1976; FEDERICI et al., 1998; GULSEN & ROOSE, 2001b; NICOLOSI et al., 2000), de que o genoma de limão-cravo é constituído principalmente de sequências de cidra. Dados citogenéticos também comprovam a contribuição de *C. medica* para o genoma de limão-cravo (CARVALHO et al., 2005). Entretanto, dados cloroplastidiais, sugeriram que a tangerina seria o parental materno de limão-cravo (GULSEN & ROOSE, 2001a), o que é totalmente contraditório com os dados genômicos encontrados em nossas análises. Na análise referente ao primeiro painel comparativo, constituído apenas de drafts das seis espécies de citros avaliadas, incluindo limão-cravo, uma espécie de *C. reticulata* foi incluída, tangerina 'Ponkan', entretanto, ao contrário do que se acreditava, esta espécie não apresentou número suficiente de sequências genômicas similares a limão-cravo, contradizendo as hipóteses advindas de análises mitocondriais e cloroplastidiais de que *Citrus reticulata* seria o parental materno de *C.* × *limonia*.

## 6.2 Contribuição das Tangerinas (*Citrus reticulata*)

Neste estudo, tangerina 'Ponkan' teve apenas 409 cladogramas apresentando sequências exclusivas com similaridade apenas com limão-cravo e 862 cladogramas com sequências compartilhadas com *C.* × *clementina* e *C. medica* similares a limão-cravo. Além disso, numerosas exceções da herança materna do genoma citoplasmático, resultando em diferentes graus de herança mtDNA e cpDNA paternal ou biparental foram relatados, comprovando que a herança de genomas citoplasmáticos não é universalmente materna e a presença de uma série de padrões de herança, indica que diferentes estratégias foram adotadas por diferentes organismos (KORPELAINEN, 2004). Em citros, BERNET

et al. (2010), usando toranja ‘Chandler’ × tangerina ‘Fortune’, confirmaram esta possível exceção ao padrão conhecido de herança materna, comprovando que as organelas também podem ser herdadas do parental paterno, em uma porcentagem muito pequena, no entanto, representativa. De acordo com o resultados de BERNET et al. (2010) cerca de 10% das mudas provenientes do cruzamento em que toranja ‘Chandler’ foi progenitor feminino, apresentaram marcadores organelares de tangerina. Segundo FROELICHER et al. (2011), a contribuição citoplasmática das tangerinas para as espécies secundárias de citros é limitada, e isto, já foi confirmado por dados cloroplastidiais (BAYER et al., 2009; JENA; KUMAR; NAIR, 2009; NICOLOSI et al., 2000; YINGZHI et al., 2007).

Estudos desenvolvidos por CARBONELL-CABALLERO et al. (2015) com sítios de heteroplasmia, ou seja, a mistura de genomas de organelas (mitocôndrias ou cloroplastos) dentro de uma célula ou indivíduo, e atribuído a mutações ou herança biparental, em 34 genomas de cloroplasto de citros avaliados, demonstrou um nível inesperado de heteroplasmia nesses genomas plastidiais e confirmou-se que esse evento é relativamente frequente e está frequentemente relacionado a herança biparental, mais do que eventos de mutação. Os dados apresentados indicam que a filogenia de citros apenas através de dados organelares pode ser insuficiente para o entendimento da filogenia deste gênero tão complexo e inferências filogenéticas derivadas da análise de sequências de genes nucleares pode ser mais informativas para determinar as relações entre as diferentes cultivares (RAMADUGU et al., 2013).

Nossas análises demostraram, que a espécie de tangerina ‘Ponkan’ utilizada não contribui em proporção suficiente para ser considerado como parental de limão-cravo, sendo mais apropriado assumir a cidra como parental deste híbrido. Os resultados demostraram que a tangerina ‘Ponkan’, por apresentar uma baixa proporção de sequências mais similares a limão-cravo não pode ser considerada como parental. Contudo, a participação de uma tangerina não pode ser descartada. Nossos dados confirmam a participação de uma tangerina, com constituição genômica diferente de tangerina ‘Ponkan’, no genoma de limão-cravo. Aparentemente, surpreendendo as expectativas, *Citrus* × *clementina*, uma tangerina híbrida, originada possivelmente do cruzamento de mexerica do ‘Rio’ (*Citrus* × *deliciosa*, como parental feminino) e laranja doce (*C.* × *sinensis*, como parental paterno) (SAMAAN, 1982; WU et al., 2014), foi a segunda espécie a apresentar o maior número de sequência exclusivas similares ao limão ‘Cravo’.

Se considerarmos, a constituição genômica das espécies utilizados, cidra (*C. medica*), toranja (*C. maxima*) são consideradas espécies selvagens e ancestrais de citros, sendo consideradas não-híbridas. A terceira espécie considerada pura e ancestral é uma tangerina (*C. reticulata* Blanco) desconhecida ou que possivelmente se perdeu durante o processo de domesticação, a única espécie de tangerina com genoma sequenciado e utilizado neste estudo é a tangerina 'Ponkan', que anteriormente acreditava-se ser uma espécie pura, no entanto, as análises genômicas comprovaram que o genoma desta espécie apresenta introgressões de toranja (*C. maxima*) e, assim, não pode ser considerada uma espécie não-híbrida ancestral (WU et al., 2014). A última espécie utilizada como parental, a laranja doce (*C. × sinensis*), é comprovadamente um híbrido originado de um cruzamento entre toranja e tangerina e o híbrido resultante deve ter sido retrocruzado com toranja ((*C. maxima* × *C. reticulata*) × *C. maxima*), sendo a toranja doadora do óvulo e *C. reticulata* (com alguma introgressão de *C. máxima*) o doador de pólen (WU et al., 2014). Sendo assim, podemos concluir que as espécies ancestrais possuem sequências exclusivas, pois são homozigotas e os híbridos resultantes (heterozigotos), como clementina e laranja doce, além das sequências oriundas de seus respectivos parentais, possuem sequências próprias que sofreram mutação e evoluíram independentemente. Sabidamente, citros apresenta alta taxa de mutação, e acredita-se que todas as variedades de laranja doce originaram apenas de um exemplar, que após processos espontâneos de mutação somática durante sua evolução originaram as diversas cultivares de laranja doce disponíveis atualmente (WU et al., 2014; XU et al., 2013).

*C. × clementina*, apresentou um valor de sequências similares a limão-cravo considerado representativo, e se considerarmos as sequências presentes no genoma de citros clementina, seu genoma seria composto de sequências de tangerina (*C. reticulata*), toranja (*C. maxima*) e de laranja doce (*C. × sinensis*). As sequências de tangerina e toranja encontradas no genoma de *C. clementina* adviriam de ambos os parentais, pois, seu parental materno, a mexerica do 'Rio' (*C. × deliciosa*), é possivelmente um híbrido de tangerina (*C. reticulata*) com introgressões simples de toranja (*C. maxima*) e seu parental paterno, a laranja doce (*C. × sinensis*), supostamente originada de retrocruzamento de toranja e tangerina (VELASCO & LICCIARDELLO, 2014; WU et al., 2014). No entanto, possivelmente há sequências oriundas de laranja que poderiam sofrer mutações, sendo possivelmente transmitida para clementina. Como as sequências utilizadas em nossas análises são oriundas dos genomas de todos as espécies doadores de sequências para *C.*

× *clementina*, exceto mexerica do 'Rio' (*C.* × *deliciosa*), as sequências que apresentaram exclusividade (1.459 sequências), apenas com limão-cravo, não possuem similaridade com as sequências de *C. maxima*, *C. reticulata* e *C.* × *sinensis*, evidenciando que uma tangerina diferente de tangerina 'Ponkan' (*C. reticulata*), que teria contribuído para o genoma de *C.* × *clementina* e algum de seus parentais (*C.* × *deliciosa* e *C.* × *sinensis*), e consequentemente, esta espécie desconhecida, possui grande importância na contribuição da constituição genômica de limão-cravo.

As sequências presentes no genoma de limão-cravo que são mais similares a clementina (*C.* × *clementina*) e divergem das sequências de tangerina 'Ponkan' (*C. reticulata*) e das demais espécies de citros utilizadas, demostram o que foi relatado recentemente por alguns autores, a existência de tangerinas distantes genomicamente de tangerina 'Ponkan' e que possivelmente são distintas das espécies de tangerinas conhecidas atualmente (CARBONELL-CABALLERO et al., 2015; WU et al., 2014). A análise genômica revelou que, o genoma da tangerina Mangshan da China, considerada uma espécie selvagem, e que anteriormente, se considerava ter a mesma origem das demais tangerinas (*C. reticulata*), revelou ser uma espécie distinta, reconhecida como *C. mangshanensis* e que apresenta parentesco distante e divergência substancial de sequências das demais tangerinas (*C. reticulata*) (WU et al., 2014). A divergência de *C. mangshanensis* dos demais mandarins foi confirmado por dados cloroplastidiais (CARBONELL-CABALLERO et al., 2015).

Os resultados obtidos através da análise comparativa de sequência gênicas e genômicas, revelaram similaridade de limão-cravo com tangerinas utilizadas como porta-enxerto, como tangerina 'cleopatra' (*C. reshni*), tangerina sunki (*C. sunki*) e *C. depressa*. FROELICHER et al. (2011), através de marcadores mitocondriais, demonstrou o agrupamento de limão-cravo em um grupo de tangerinas, denominado 'tangerinas ácidas', constituído de sete acessos, todos de porta-enxertos, sendo que três desses acessos foram do grupo das tangerinas (*C. sunki* 'Sunki mandarin', *C. reshni* 'Cleópatra mandarin' e *C. depressa* 'Shekwasha'), três acessos de limão-cravo (*C.* × *limonia* 'Rangpur lime', *C.* × *limonia* 'Rangpur nepal' e *C.* × *limonia* 'Volkamer lemon') e um de limão-rugoso (*C.* × *jambhiri* 'Rough lemon'). O limão rugoso, também é considerado por FROELICHER et al. (2011), como pertencente ao grupo das 'tangerinas ácidas', também apresentou grande similaridade com limão-cravo, cerca de 20% do total de suas sequências avaliadas. Interessantemente, todas as espécies citadas anteriormente,

possuem em comum seu uso na citricultura como porta-enxerto, desta forma, nossos resultados confirmam a grande semelhança entre essas espécies e são apoiados pelos dados anteriores descritos por FROELICHER et al. (2011), através de dados de marcadores mitocondriais e por (CURK et al., 2015a) por dados de marcadores SSRs nucleares, SSRs cloroplastidiais, SNPs e indels mitocondriais.

Segundo OLLITRAULT et al. (2012a), o grupo das tangerinas ácidas (*C. reshni* 'Cleópatra mandarin', *C. sunki* 'Sunki mandarin', *C. reticulata* 'Depressa' e *C. reticulata* 'Sun Chu Sha') apesar de estarem no grupo das tangerinas, apresentam particularidades que as diferem substancialmente das demais espécies de tangerinas. A possível explicação para a divergência entre as tangerinas tradicionais e as ácidas (OLLITRAULT et al., 2012a), pode estar relacionada a sua constituição genômica. A comparação entre as sequências das chamadas tangerinas "tradicionais", como a cultivar asiática 'Ponkan' e a cultivar mediterrânea mexerica do 'Rio', evidenciaram que essas espécies possuem introgressões de toranja (*C. maxima*), enquanto que outras tangerinas anteriormente agrupadas neste mesmo grupo, possuem origem distinta das tangerinas tradicionais (WU et al., 2014).

De acordo com FROELICHER et al. (2011) o grupo de tangerinas ácidas (*C. sunki* 'Sunki mandarin', *C. reshni* 'Cleópatra mandarin' e *C. depressa* 'Shekwasha') podem ser ou estar relacionadas ao parental materno de limão-cravo, pois possivelmente o citoplasma de limão-cravo é oriundo destas tangerinas ácidas (BAUSHER et al., 2006), no entanto, os resultados obtidos pelas análises de comparação de sequências genômicas, demonstram o oposto do que foi proposto por FROELICHER et al. (2011), apesar da limitação do número de sequências disponíveis destas espécies e utilizadas nas análises, as tangerinas ácidas utilizadas não poderiam apresentam contribuição suficientemente superior a cidra (62,3%), para serem consideradas possivelmente o parental materno de limão-cravo. Entretanto, a contribuição de um híbrido ancestral em comum, não poderia ser descartada como parental de limão-cravo, pois, essas espécies compartilham características em comum, como tolerância a diversas fatores bióticos e abióticos, características particulares do grupo das tangerinas, e que, possivelmente poderiam ter sido transmitidas para estes porta-enxertos. Entretanto, a hipótese de FROELICHER et al. (2011) de que uma espécie de tangerina ácida seria possível parental de limão-cravo é confirmada por dados de marcadores SSRs nucleares, SSRs cloroplastidiais, SNPs e indels mitocondriais (CURK et al., 2015a).

### 6.3 Contribuição das Toranjas (*Citrus maxima*), Laranja-doce (*Citrus* × *sinensis*) e Laranja-azeda (*Citrus* × *aurantium*)

As espécies de toranja (*C. maxima*) e laranja-doce (*C.* × *sinensis*) utilizadas nas análises de comparação de sequências genômicas, não apresentaram alto número de sequências com limão-cravo. Toranja e laranja doce, apresentaram 534 e 228 sequências mais similares a limão-cravo, respectivamente, entretanto, o número de sequências em comum entre essas duas espécies foi de 1582, possivelmente pelo fato de laranja-doce ser um híbrido desta espécie com tangerina.

Os valores encontrados para toranja superam os de tangerina 'Ponkan' (409), e confirma a nossa hipótese, que tangerina 'Ponkan' não é um dos mais próximos do genoma de limão 'Cravo'.

A contribuição de |*C. maxima*, *C.* × *sinensis* e *C.* × *aurantium* para os genomas de limas e limões é reportado. *C.* × *aurantium* possivelmente contribuiu para a origem de *C. limetta* e *C.* × *limon* e híbridos entre *C. maxima* e *C. reticulata* teriam contribuído para a origem de *C. limettioides e C. meyeri* (CURK et al., 2016). Entretanto, para espécies consideradas "mandarin-like", como limão-cravo e limão rugoso, a pouca informação a respeito da contribuição direta destas espécies, possivelmente, sequências compartilhadas foram advindas de híbridos que possuem sequências de toranja e laranja em seu genoma.

### 6.4 Contribuição dos Limões (*Citrus* × *limon*) e Limas (*Citrus* × *aurantiifolia*)

Inúmeros trabalhos sugeriram que limão-cravo é um híbrido de limão verdadeiro (*C.* × *limon*) (SWINGLE e REECE, 1967) ou lima (*C.* × *aurantiifolia*) (BARKLEY et al., 2006). Acredita-se que o limão comum (*C.* × *limon*) é possivelmente um híbrido entre cidra (*C. medica* - parental materno) e laranja azeda (*C. aurantium* - parental paterno) (CURK et al., 2016; FROELICHER et al., 2011). A contribuição da cidra para os genomas dos grupos dos limões e limas é conhecida e descrita por marcadores moleculares e dados citogenéticos (CARVALHO et al., 2005; CURK et al., 2015a; LI et al., 2010; NICOLOSI et al., 2000). Entretanto, GARCIA-LOR et al. (2013), confirmaram que *Citrus* × *limon* apresenta uma constituição genômica diversificada, com *C. medica* contribuindo com 50% de seu genoma, *C. reticulata* com 38,5% e *C. maxima* com 11,5%.

Análises filogenéticas de limões e limas, por meio de genes nucleares, genoma mitocondrial e cloroplastidial, demostraram a formação de três grupos principais, possivelmente derivados de hibridação interespecífica direta: o primeiro constituído de lima ácida (*C.* × *aurantiifolia*) e *C. macrophylla*, resultantes da hibridação de papeda (*C. micrantha*) e cidra (*C. medica*); o segundo denominado de grupo dos "limões amarelos", constituído pelos limões verdadeiros (*C.* × *limon*), possíveis híbridos entre laranja azeda (*C.* × *aurantium*, que se acredita ser um híbrido entre *C. maxima* e *C. reticulata*) e cidra, e o terceiro constituído de dois porta-enxertos, limão-cravo (*C.* × *limonia*) e limão rugoso (*C.* × *jambhiri*), possíveis híbridos entre cidra e tangerina ácida (CURK et al., 2015a). Em nossas análises, limão verdadeiro (*C.* × *limon*), apresentou cerca de 20,4% de sequências com maior similaridade a limão-cravo, entretanto, como ambos possuem a mesma origem genética, possivelmente estas sequências poderiam ser sequências com a mesma origem (originadas de cidra), mas que evoluíram e divergiram diferentemente. Dados citogenéticos, apontam a divergência de limão verdadeiro de limão 'Cravo', limão 'Rugoso' e 'Volkameriano' (*C. volkameriana*), pela presença de um cromossomo exclusivo do tipo C em limão verdadeiro. No entanto, as três espécies (limão 'Cravo', limão 'Rugoso' e 'Volkameriano') distintas de limão verdadeiro , apresentaram cariótipo muito similar, sendo que, *C. volkameriana* e *C.* × *jambhiri*, diferiram de *C.* × *limonia*, por apresentar dois pequenos sítios extras de DNAr 45S em dois cromossomos, um do tipo D e outro do tipo F. Desta forma, foi verificado que todas as espécies se mostraram relacionadas com cidra (*C. medica*), sobretudo pela presença de um cromossomo tipo B (CARVALHO et al., 2005). De acordo, com CURK et al. (2015b), polimorfismo de SNPs presentes em acessos de limão-cravo diferem dos padrões presentes em limão e lima e de acordo com a análise de estrutura genômica a contribuição de cidra é de 50%.

Os resultados demostraram pouca similaridade de limão-cravo com lima doce (*C. limettioides*) 12,3% e lima ácida (*C.* × *aurantiifolia*) 9,1%, ambas as espécies apresentarem maior semelhança com cidra, possivelmente suposto parental dessas espécies. A lima doce é possivelmente originada do cruzamento de um híbrido entre *C. maxima* e *C. reticulata* com cidra e a lima ácida do cruzamento entre *C. micrantha* (papeda) e *C. medica* (CURK et al., 2016; UCHOI et al., 2016). Apesar de as limas, limões verdadeiros e limão 'Cravo' terem a cidra como espécie parental, aparentemente estas espécies apresentam constituições genômicas distintas.

### 6.5 Contribuição do subgênero *Papeda*

Interessante foi à similaridade de limão ‘cravo’ com espécies do subgênero *Papeda*. Em nenhum estudo anterior tal agrupamento havia sido relatado. As sequências de *C. jambhiri* apresentaram maior similaridade com cidra (24 %), mas foi a quarta espécie a apresentar maior similaridade com limão-cravo (20%). A outra espécie a apresentar similaridade com limão ‘Cravo’ foi *C. ichangensis*, que apresentou a mesma proporção genômica para clementina e limão-cravo, cerca de 13,3% do total de sequências avaliadas. A contribuição de espécies do subgênero *Papeda* para o grupo dos limões, só é confirmada para lima ácida (*C.* × *aurantifolia*), considerada híbrido de cidra (*C. medica*) e papeda (*C. micrantha*) (CURK et al., 2016; OLLITRAULT et al., 2012b; UCHOI et al., 2016). *C. ichangensis* é considerado um ‘mandarin-like’, assim como limão-cravo, por possuir características semelhantes a tangerinas e é considerada a mais resistentes espécies do gênero *Citrus*, além disso, essa espécie difere das demais espécies do subgênero *Papeda*, a qual pertence, em algumas características morfológicas, como apresentar flores e sementes grandes, que são monoembriônicas.

# 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através da análise de genômica comparativa entre os genomas de limão-cravo e outros cinco genomas, alguns de espécies ancestrais (*C. medica* e *C. maxima*) e sequências oriunas de banco de dados públicos possibilitou informações a respeito da origem e constituição genômica dessa espécie de grande importância para citricultura paulista.

Nossos resultados, condiz com hipóteses baseadas em estudos filogenéticos por meio de sequências cloroplastidiais e marcadores nucleares descritas anteriormente, de que a cidra é um possível parental para limão-cravo. Entretanto, ao contrário do que se acreditava, nossos resultados demostram que a espécie com maior contribuição genômica para o genoma de limão-cravo é a cidra e não tangerina 'Ponkan'.

Apesar de tangerina 'Ponkan' não ser umas das espécies mais relacionadas a limão-cravo, não podemos descartar a influência de um representante do grupo das tangerinas na constituição do genoma desse porta-enxerto, uma vez que em seu genoma há presença de sequências de tangerina 'Ponkan' e clementina. Apesar de o genoma de limão-cravo apresentar sequências de tangerina 'Ponkan', os resultados demostram que tangerina 'Ponkan' e *Citrus* × *clementina* apesar de serem consideradas tangerinas, apresentam origens distintas e consequentemente, o grupo das tangerinas apresenta espécies distintas.

Neste sentido, acreditamos que possivelmente um híbrido a ncestral pertencente ao grupo das tangerinas ácidas e muito próximo de *Citrus* × *clementina* é a segunda espécie com maior contribuição para o genoma de *Citrus* × *limonia*, pelo fato de clementina ter sido a segunda espécie entre todos os genomas analisados a apresentar o segundo maior número de sequências similares as de limão-cravo.

Assim, tendo em consideração as evidências apresentadas a respeito da contribuição dos cinco genomas analisados na constituição genômica de limão-cravo, três possíveis hipóteses foram formuladas para explicar a alta contribuição da cidra (62,26%) e a presença de sequências das demais espécies no genoma desta espécie.

A primeira hipótese, seria a de que possivelmente, limão-cravo teria sido originado do cruzamento simples entre cidra (*C. medica*) e um híbrido ancestral desconhecido, mas pertencente ou próximo ao grupo das tangerinas ácidas. Este híbrido

ancestral, deveria possuir em seu genoma, sequências de tangerina (*C. reticulata*), toranja (*C. maxima*) e laranja (*C. × sinensis*), desta forma, o híbrido de limão-cravo resultante teria maior contribuição de cidra e tangerina em seu genoma e pequenas proporções de toranja e laranja. Além disso, essa afirmação se baseia na grande similaridade de limão-cravo com espécies pertencentes ao grupo das tangerinas ácidas e a clementina, assumindo a um ancestral em comum a estas espécies (Figura 9).

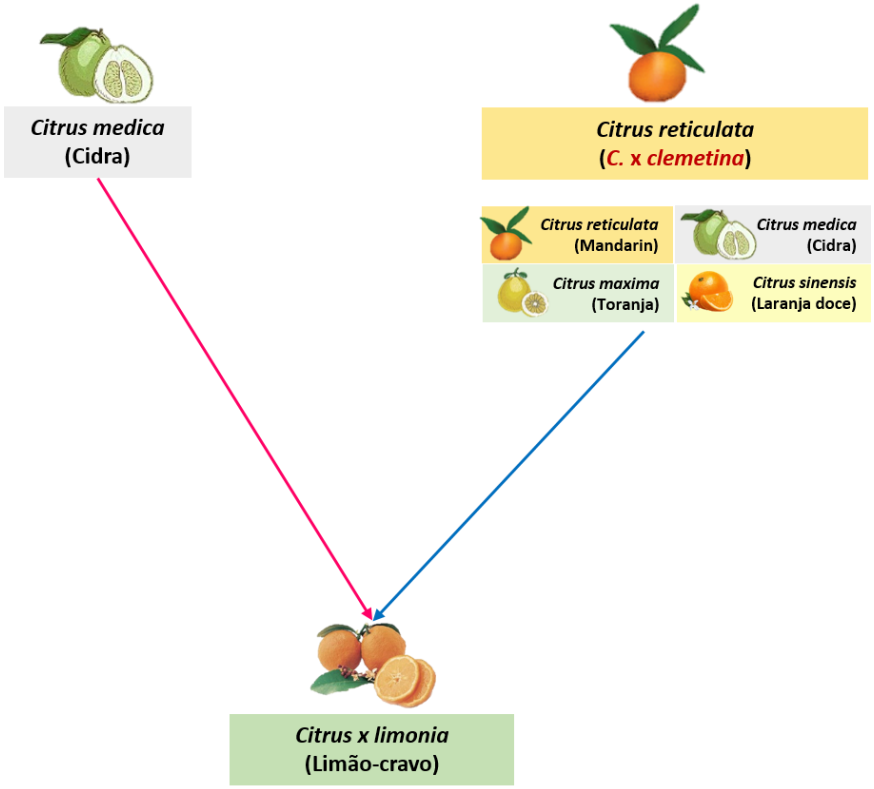



**Figura 9.** Possível origem de limão-cravo através de cruzamento simples. Limão-cravo seria originado de um cruzamento simples entre cidra e um híbrido ancestral do grupo das tangerinas, representado por clementina, a espécie deste grupo com maior similaridade genômica com limão-cravo.

Na segunda hipótese, limão ‘Cravo’ seria originado do retrocruzamento entre cidra e o ancestral do grupo das tangerinas ácidas com sequências de *C. reticulata*, *C. maxima* e laranja, sendo que o híbrido resultante teria retrocruzado com cidra ((cidra × híbrido de tangerina ácida) × cidra), isto explicaria a alta contribuição de cidra (62,26%) para o genoma de limão ‘Cravo’ (Figura 10).

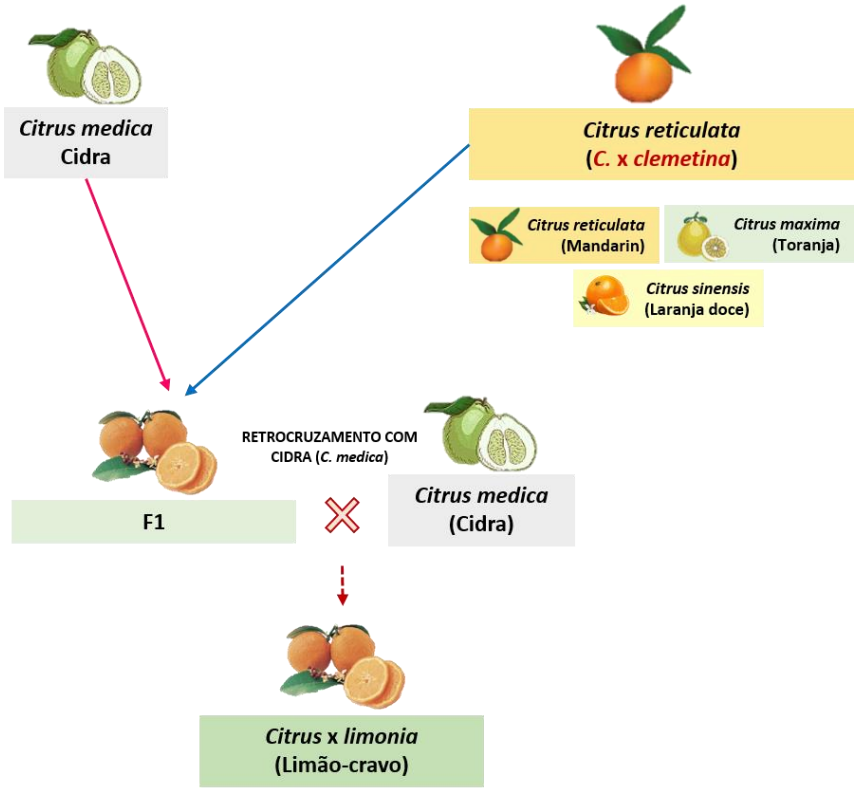



**Figura 10.** Possível origem de limão-cravo através de retrocruzamento. O híbrido F1 de limão-cravo seria originado do cruzamento entre cidra em uma tangerina ancestral próximo a *C. clementina* e das tangerinas ácidas com genoma constituído de sequências de toranja, tangerina ‘Ponkan’, laranja-doce e seria originado de um retrocruzamento entre cidra e um híbrido ancestral do grupo das tangerinas, representado por clementina, a espécie deste grupo com maior similaridade genômica com limão-cravo.

A terceira hipótese, seria o cruzamento de cidra com tangerina ácida com sequências de tangerina, toranja e laranja, no entanto, o híbrido resultante sofreria introgressões de cidra (Figura 11).

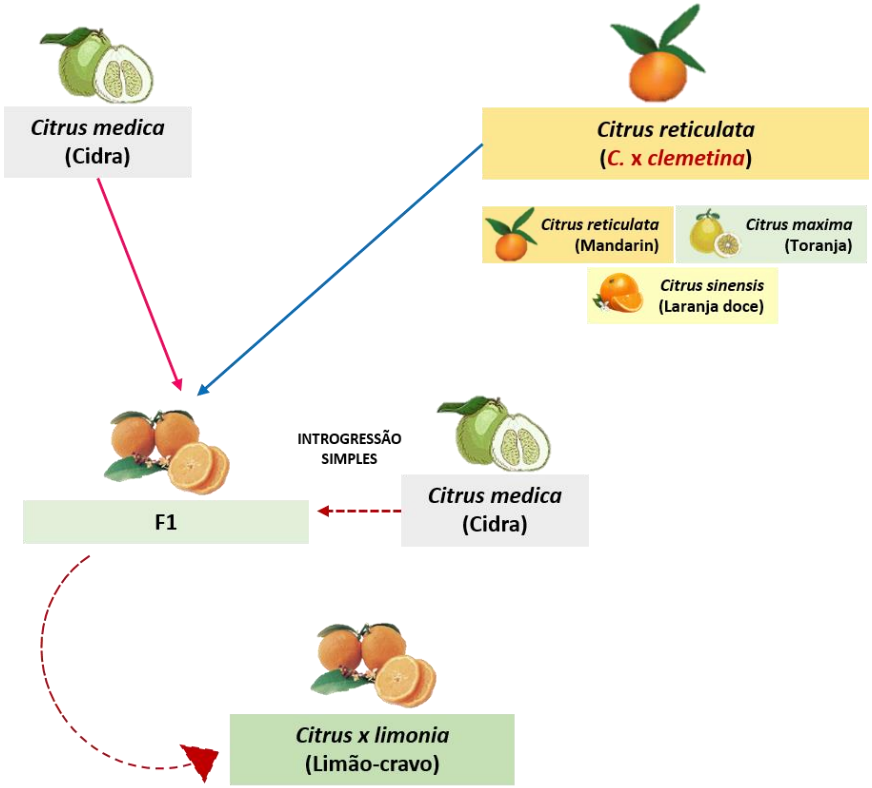



**Figura 11.** Possível origem de limão-cravo através de cruzamento simples. Limão-cravo seria originado de um cruzamento simples entre cidra e um híbrido ancestral do grupo das tangerinas, representado por clementina, a espécie deste grupo com maior similaridade genômica com limão-cravo.

# 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

a) Dentre todas as espécies de citros utilizadas para nossa análise de sequências, cidra (*C. medica*) foi a que apresentou maior similaridade com o limão-cravo (*C.* × *limonia*), sendo considerado de grande importância para a origem genômica de limão-cravo.
b) *C.* × *clementina*, uma tangerina, foi a segunda espécie a apresentar o maior número de sequências nucleares com mais alta similaridade a limão-cravo, confirmando a participação de uma espécie de tangerina como possível parental de limão-cravo.
c) Tangerina (*C. reticulata*), que se acreditava ser um parental de limão-cravo e em nossa análise representado pela tangerina "Ponkan", apresentou um menor número de sequências com mais alta similaridade a limão-cravo, indicando que o possível parental de limão 'Cravo', do grupo das tangerinas, seria próximo das clementinas e distante de tangerina "Ponkan", utilizada na análise.
d) Sequências oriundas de banco de dados públicos e de outras espécies de citros, revelaram que limão-cravo, apresentou grande similaridade com espécies pertencentes ao grupo das tangerinas ácidas e a limão rugoso. Possivelmente, um híbrido em comum ou pertencente a este grupo e próximo das espécies *C.* × *clementina* e *C.* × *jambhiri*, teria participação no genoma de limão 'Cravo'.

## 9. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS


ABKENAR, A. A.; ISSHIKI, S. Molecular characterization and genetic diversity among Japanese acid citrus (Citrus spp.) based on RAPD markers. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, v. 78, n. 1, p. 108-112, 2003.

ABKENAR, A. A.; ISSHIKI, S.; TASHIRO, Y. Phylogenetic relationships in the "true citrus fruit trees" revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. Scientia Horticulturae, v. 102, n. 2, p. 233-242, nov. 2004.

ALBRIGO, G. Influências ambientais no desenvolvimento dos frutos cítricos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CITROS - FISIOLOGIA, 2, Bebedouro. Anais... Bebedouro: Fundação Cargill, 1992. p. 100-106, 1992.

ALTSCHUL, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1 set. 1997.

BARBASSO, D.V. Caracterização fenológica e físico-química de variedades de tangerinas em três porta-enxertos. Campinas: Instituto Agronômico, p. 108, 2005.

BARKLEY, N.A.; M. L. ROOSE, KRUEGER, R.R.; FEDERICI, C.T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theoretical and Applied Genetics, v. 112, n. 8, p. 1519-1531, 20 maio 2006.

BARRETT, H.C.; RHODES, A.M.A Numerical Taxonomic Study of Affinity Relationships in Cultivated Citrus and Its Close Relatives. Systematic Botany, v. 1, n. 2, p. 105, jan. 1976.

BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T.R. & BOVÉ, J.M. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death, as a tool to generated hypotheses concerning its etiology. Phytopathology, v. 93, p. 502-512, 2003.

BASSANEZI, R.B.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C.A. Resultados do levantamento detalhado da morte súbita dos citros na região afetada - junho a setembro de 2002. Araraquara: Fundecitrus, 9p, 2002.

BAUSHER, M.G.; SINGH, N.D.; LEE, S.B.; JANSEN, R.K.; DANIELL, H. The complete chloroplast genome sequence of Citrus sinensis (L.) Osbeck var "Ridge Pineapple": organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. BMC plant biology, v. 6, p. 21, 2006.

BAYER, R.J.; MABBERLEY, D.J.; MORTON, C.; et al. A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. American Journal of Botany, v. 96, n. 3, p. 668-685, 1 mar. 2009.

BERETTA, M.J.G.; POMPEU JUNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. et al. Avaliação do declínio de plantas cítricas em clones de limões 'Cravo' e 'Volkameriano'. In: CONGRESSO. BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8, Brasília, 1986. Anais. Brasilia: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. 243-247, 1986a.

BERK, C. et al. Citrus Annual Annual Report. 2015.

BERNET, G.P.; FERNANDEZ-RIBACOBA, J.; CARBONELL, E.A.; ASINS, M.J. Comparative genome-wide segregation analysis and map construction using a reciprocal cross design to facilitate citrus germplasm utilization. Molecular Breeding, v. 25, n. 4, p. 659-673, 15 abr. 2010.

CAMERON, J.W. AND FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: Reuther W, Batchelor L.D. and Webber H. J. (eds) The Citrus Industry, Vol. 1. University of California, Riverside, California, pp. 325-370, 1968.

CAMPOS, A.S. Distribuição de Tylenchulus semipenetrans e Pratylenchus jaehni em citros, no Estado de São Paulo, e estudo morfométrico comparativo de populações anfimíticas de Pratylenchus spp. 2002. 65p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal.

CARBONELL-CABALLERO, J. et al. A Phylogenetic Analysis of 34 Chloroplast Genomes Elucidates the Relationships between Wild and Domestic Species within the Genus Citrus. Molecular Biology and Evolution, v. 32, n. 8, p. 2015-2035, ago. 2015.

CARLOS, E. F.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C. Porta-enxertos para a citricultura paulista Jaboticabal: FUNEP, 47 p. (Boletim citrícola, n. 1), 1997.

CARNEIRO, P.A.P.; LOPES, P.S.N.; OLIVEIRA, N.C.C.; FERNANDES, L.A.; MELO, B. Produção de porta-enxerto de limão cravo, em resposta à adubação organomineral. Bioscience Journal, v. 27, n. 3, p. 427-432, 2011.

CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W.S.; BRASILEIRO-VIDAL, A.C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. Cytogenetic and Genome Research, v. 109, n. 1-3, p. 276-282, 2005.

CARVALHO, S.A.; MULLER, G.W.; POMPEU JUNIOR, J.; CASTRO, J.L. Transmissão do agente causal da enação das nervuras-galha lenhosa dos citros por *Toxoptera citricidus*. Fitopatologia Brasileira, v. 26, n. 1, p. 95-98, 2001.

CASPERMEYER, J. Most Comprehensive Study to Date Reveals Evolutionary History of Citrus. Molecular Biology and Evolution, v. 32, n. 8, p. 2217.2-2218, ago. 2015.

CASTLE, W.S. AND KREZDORN, A.H. Soil water use and apparent root efficiencies of citrus trees on four rootstocks. Journal of the American Society for Horticultural Science 102, 403-406, 1977.

CHAPOT, H. The Citrus plant. In: Hafliger, E. (ed) Citrus. Techn. Monogr., n.4, Ciba-Geigy Agrochemicals, p.6-13, 1975.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira - laranja 2013/14 Terceiro Levantamento - São Paulo e Triângulo Mineiro Dezembro / 2013. p. 16, 2013.

CURK, F.; GARCIA-LOR, A.; SNOUSSI TRIFA, H.; FROELICHER, Y.; ANCILLO, G.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. New insights on Limes and Lemons origin from nuclear and cytoplasmic markers genotyping and targeted nuclear gene sequencing. Acta Horticulturae, n. 1065, p. 135-146, jan. 2015a.

CURK, F.; ANCILLO, G.; GARCIA-LOR, A.; LURO, F.; PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J-P.; et al. Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in Citrus species: analysis of chromosome 2. BMC Genetics, v. 15, n. 1, p. 152, 2014.

CURK, F.; ANCILLO, G.; OLLITRAULT, F.; PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P.; GARCIA- LOR, A.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Nuclear Species-Diagnostic SNP Markers Mined from 454 Amplicon Sequencing Reveal Admixture Genomic Structure of Modern Citrus Varieties. PLOS ONE, v. 10, n. 5, p. 1 - 25, 14 maio 2015b.

CURK, F.; OLLITRAULT, F.; GARCIA-LOR, A.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Phylogenetic Origin of Limes and Lemons Revealed by Cytoplasmic and Nuclear Markers. Annals of Botany, 2016.

DE MORAES, A. P.; DOS SANTOS SOARES FILHO, W.; GUERRA, M. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. Chromosome Research, v. 15, n. 1, p. 115-121, 12 jan. 2007.

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (eds) Citros. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, p.1-18, 2005.

ERISMANN, N.M.; MACHADO, E.C.; TUCCI, M.L.S. Photosynthetic limitation by CO2 diffusion in drought stressed orange leaves on three rootstocks. Photosynthesis Research, v. 96, p. 163-172. 2008.

FANCIULLINO, A.L.; TOMI, F; LURO, F.; DESJOBERT, J.M., CASANOVA, J. Chemical variability of peel and leaf oils of mandarins. Flavour Fragrance J 21:359-367, 2006.

FANG, D.Q.; KRUEGER, R.R.; ROOSE, M.L. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter- simple sequence repeat (ISSR) markers. J Am Soc Hortic Sci 123:612-617, 1998.

FANG, D.Q.; ZHANG, W.C; XIAO, S.Y. Studies on taxonomy and evolution of Citrus and its related genera by isozyme analysis. (in Chinese with English abstract). Acta Phytotaxon Sinica 31: 329-352, 1993.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Citrus fruit fresh and processed annual statistics. Annual Statistics, p. 46, 2012.

FROELICHER, Y.; MOUHAYA, W.; BASSENE, J.B.; COSTANTINO, G.; KAMIRI, M.; LURO, F.; MORILLON, R.; OLLITRAULT, P. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. Tree Genetics & Genomes, v. 7, n. 1, p. 49-61, 27 fev. 2011.

FUNDECITRUS. Estimativa da safra de laranja 2015/16 do cinturão citrícola de São Paulo e Trângulo/Sudeste Mineiro. p. 13, 2015.

GARCIA-LOR, A.; CURK, F.; MORILLON, R.; SNOUSSI, H.; ANCILLO, G.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the “true citrus fruit trees” group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. Annals of Botany, v. 111, n. 1967, p. 1-19, 2013a.

GARCIA-LOR, A.; ANCILLO, G.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Citrus (Rutaceae) SNP Markers Based on Competitive Allele-Specific PCR; Transferability Across the Aurantioideae Subfamily. Applications in Plant Sciences, v. 1, n. 4, p. 1200406, abr. 2013b.

GARCIA-LOR, A.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: A perspective for genetic association studies. Molecular Genetics and Genomics, v. 287, n. 1, p. 77-94, 2012.

GIRARDI, E.A.; MOURAO, F.D.A.; PIEDADE, S.M.D. Vegetative development and production cost of citrus rootstocks in containers for inarching. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v. 42, n. 5, p. 679-687, 2007.

GREEN, R. M.; VARDI, A.; GALUN, E. The plastome of Citrus. Physical map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related genera. Theoretical and Applied Genetics, v. 72, n. 2, p. 170-177, 1986.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B.; CORNELIO, M.T.M.; SANTOS, K. G.B.; SOARES FILHO, W.S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a Citrus germplasm bank. Braz. J. Genet. 20: 489-496, 1997.

GULSEN, O.; ROOSE, M. L. Chloroplast and Nuclear Genome Analysis of the Parentage of Lemons. J. Amr. Soc. Hort. Sci, v. 126, n. 2, p. 210-215, 2001a.

GULSEN, O.; ROOSE, M. L. Lemons: Diversity and Relationships with Selected Citrus Genotypes as Measured with Nuclear Genome Markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci., v. 126, n. 3, p. 309-317, 2001b.

HERRERO, R.; ASÍNS, M.J.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraespecific and intragenus genetic variability. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 92, p. 599-609, 1996a.

HERRERO, R.; ASÍNS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 93, p. 1.327-1.334, 1996b.

HYNNIEWTA, M.; MALIK, S.K.; RAO, S.R. Genetic diversity and phylogenetic analysis of Citrus (L) from north-east India as revealed by meiosis, and molecular analysis of internal transcribed spacer region of rDNA. Meta Gene, v. 2, n. 1, p. 237-251, dez. 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. Levantamento Sistemático Da Produção Agrícola (LSPA). p. 83, 2015.

IBPGR - International Board for Plant Genetic Resources. Descriptors for Citrus. Rome, 1988. 27 p.

JENA, S.N.; KUMAR, S.; NAIR, N.K. Molecular phylogeny in Indian Citrus L. (Rutaceae) inferred through PCR-RFLP and trnL-trnF sequence data of chloroplast DNA. Scientia Horticulturae, v. 119, n. 4, p. 403-416, fev. 2009.

JUNIOR, J. P.; BLUMER, S. Laranjeiras e seus porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do estado de São Paulo. Revista Laranja, v. 29, n. 1-2, p. 35-50, 2008.

KORPELAINEN, H. The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. Naturwissenschaften, v. 91, n. 11, p. 505-518, 28 nov. 2004.

LI, X. et al. The Origin of Cultivated Citrus as Inferred from Internal Transcribed Spacer and Chloroplast DNA Sequence and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprints. J. Amer. Soc. Hort. Sci., v. 135, n. 4, p. 341-350, 2010.

LIANG, G., XIONG, G., GUO, Q., HE, Q., LI, X. AFLP analysis and the taxonomy of Citrus. Acta Hort. (ISHS) 760, 137-142, 2007.

LURO, F.; GATTO, J.; COSTANTINO, G.; PAILLY, O. Analysis of genetic diversity in Citrus. Plant Genet. Resourc. 9(2):218-221, 2011.

MABBERLEY, D.A classification for edible Citrus (Rutaceae). Telopea, v. 7, n. 2, p. 167-172, 1997.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). Citros. Campinas: IAC; Fundag, cap. 9, p. 223-277, 2005.

MONACO, L.C. et al. Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. v. 1, p. 40, 2015.

MOORE, G.A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. Trends in Genetics, v. 17, n. 9, p. 536-540, set. 2001.

MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. Citricultura brasileira. Campinas: Fundação Cargill, p. 1-21, 1991.

MORTON, C. M.; GRANT, M.; BLACKMORE, S. Phylogenetic relationships of the Aurantioideae inferred from chloroplast DNA sequence data. American Journal of Botany, v. 90, n. 10, p. 1463-1469, 2003.

MÜLLER, G.W.; NEGRI, J.D.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MATTOS JUNIOR, D.; POMPEU JUNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; MACHADO, M.A.; GIROTTO, L.F. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. Laranja, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 371-386, 2002.

MULLER, G.W.; RODRIGUEZ, O.; COSTA, A.S. A tristeza vírus complex severe to sweet orange varieties. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4, Catania, 1966. Proceedings. Gainesville: International Organization of Citrus Virologists, p.64-71, 1968.

NICOLOSI, E. et al. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. TAG Theoretical and Applied Genetics, v. 100, n. 8, p. 1155-1166, 8 jun. 2000.

NICOLOSI, E. Origin and Taxonomy. In: KHAN, I. A. (Ed.). . Citrus genetics, breeding and biotechnology. I ed. [s.l.] CABI, p. 19-43, 2007.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D.G.; HERINGA, J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. Journal of Molecular Biology, v. 302, n. 1, p. 205-217, set. 2000.

OLIVEIRA, I.P.; OLIVEIRA, L.C.; MOURA, C.S.F.T. Frutas cítricas. Revista Faculdade Montes Belos, 5 (4), 2012.

OLIVEIRA, R.P. DE; RADMANN, E.B. Genetic similarity of citrus fresh fruit market cultivars. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 27, n. 2, p. 332-334, ago. 2005.

OLLITRAULT, P; JACQUEMOND, C; DUBOIS, C; LURO, F. Citrus. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann J (eds) Genetic diversity of cultivated tropical plants. Science Publishers and Cirad, Cirad, Paris, pp 193-217, 2003.

OLLITRAULT, F. et al. Development of SSR markers from Citrus clementina (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in Citrus. American Journal of Botany, v. 97, n. 11, p. e124-e129, 1 nov. 2010.

OLLITRAULT, P. et al. A reference genetic map of C. clementina hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. BMC genomics, v. 13, p. 593, 2012a.

OLLITRAULT, P. et al. SNP mining in C. clementina BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. BMC Genomics, v. 13, p. 13, 2012b.

PANG, X.; HU, C.; DENG, X. Phylogenetic relationships among citrus and its relatives as revealed by SSR markers. Acta Genetica Sinica, v. 30, n. FEBRUARY 2003, p. 81-87, 2003.

PENJOR, T. et al. Phylogenetic relationships of Citrus and its relatives based on rbcL gene sequences. Tree Genetics & Genomes, v. 6, n. 6, p. 931-939, 16 dez. 2010.

PESSINA, D. et al. DNA content, morphometric and molecular marker analyses of Citrus limonimedica, C. limon and C. medica for the determination of their variability and genetic relationships within the genus Citrus. Scientia Horticulturae, v. 129, n. 4, p. 663-673, 2011.

POMPEU JUNIOR, J. Porta - enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, P. Citros. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas; Fundag, p. 61-104, 2005.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos para citros. In: RODRIGUEZ, O. et al. (Ed.). Citricultura brasileira. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p. 265-280, 1991.

POMPEU JUNIOR, J.; SALIBE, A.A. Porta-enxertos de laranjas doces para laranja Hamlin nucelar ou com exocorte. Laranja, Cordeirópolis, v.23, n.2, p.427-438, 2002.

POMPEU JUNIOR, J.; SALVA, R. & BLUMER, S. Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. Laranja, Cordeirópolis, v.25, n.2, p.413-422, 2004.

POMPEU, J.; BLUMER, S. Notas Científicas Citrumelos como porta - enxertos para a laranjeira ' Valência ' Citrumelos as rootstocks for ' Valência ' sweet orange trees. n. 1, p. 105-107, 2011.

PRUDENTE, R.M.; SILVA, L.M.S. da. Porta-enxertos cítricos. In: MELO, M.B. de; SILVA, L.M.S. da. (Ed.). Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, c. 5, 2007.

QUAGGIO, J. A. et al. Sweet orange trees grafted on selected rootstocks fertilized with nitrogen, phosphorus and potassium. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 39, n. 1, p. 55-60, jan. 2004.

QUINLAN, A.R.; HALL, I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics, v. 26, n. 6, p. 841-842, 15 mar. 2010.

RAMADUGU, C. et al. A Six Nuclear Gene Phylogeny of Citrus (Rutaceae) Taking into Account Hybridization and Lineage Sorting. PLoS ONE, v. 8, n. 7, p. e68410, 16 jul. 2013.

RODRIGUEZ, O.; ROSSETTI, V.; MOREIRA, C.S. et al. Declínio de plantas cítricas em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5. Pelotas, 1979. Anais. Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p.927-932, 1979.

ROLFS, P.H.; ROLFS, C. A muda de citros. Secretaria da Agricultura o Estado de Minas Gerais, 126 p, 1931.

SALIBE, A.A.; MOREIRA, C.S. Performance of Rangpur lime as rootstock for citrus in Brazil. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1984. São Paulo. Proceedings. São Paulo: International Society of Citriculture. p. 29-33, 1984

SAMAAN, L.G. Studies on the origin of Clementine tangerine (Citrus reticulata Blanco). Euphytica, v. 31, n. 1, p. 167-173, mar. 1982.

SAUNT, J. Citrus varieties of the world: an illustrated guide. Norwich: Sinclair International Limited, 128p, 1990.

SCHAFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Porta-Enxertos Utilizados Na Citricultura. Ciencia Rural, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.

SCORA, R.W. Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated Citrus. In: Goren RK, Mendel K (eds) Proc 6th Int Citrus Cong, vol 1. Margraf, Weikersheim, pp 277-289, 1988.

SCORA, R.W. et al. Contribution to the Origin of the Grapefruit, Citrus paradisi (Rutaceae). Systematic Botany, v. 7, n. 2, p. 170, abr. 1982.

SCORA, R.W. On the History and Origin of Citrus. Bulletin of the Torrey Botanical Club, v. 102, n. 6, p. 369, nov. 1975.

SHAHSAVAR, A.R.; IZADPANAH, K.; TAFAZOLI, E.; TABATABAEI, B.E.S.; Characterization of Citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Sci. Hortic. 112, 310-314, 2007.

SIQUEIRA, D. L. DE et al. Germinação de sementes de porta-enxertos de citros após o armazenamento em ambiente refrigerado. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 24, n. 1981, p. 317-322, 2002.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: Janick. J. and Moore. J.N. (eds) Advance in Fruit Breeding. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, pp. 507-540, 1975.

SOUZA, P.V. et al. Indicações técnicas para a citricultura do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Fepagro, 126p, 2010.

STUCHI, E. S.; GIRARDI, E. A. Utilização de práticas culturais na citricultura frente ao Huanglongbing. Embrapa Mandioca e Fruticultura, v. 1, 2010.

STUCHI, E.S.; SEMPIONATO; O.R. SILVA, J.A.A. da. Influência dos porta-enxertos na qualidade dos frutos cítricos. Laranja, Corderópolis, v.17, n. 1, p. 159-178, 1996.

SWINGLE W.T.; REECE P.C. The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuther W., Webber H. J., Batchelor L. D. (eds.) The Citrus Industry. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, pp. 190-430, 1967.

SWINGLE, W.T. The botany of Citrus and its wild relatives of the orange subfamily (family Rutaceae, subf. Aurantioideae). In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). The citrus industry. Berkeley: University of California, v.1, p. 129-474, 1943.

TANAKA, T. Species problemin Citrus (Revisio aurantiacearum IX). Japanese Society for Promotion of Science, Tokyo, Japan, pp 1-157, 1954.

TANAKA, T. Fundamental discussion of Citrus classification. Stud Citrol 14:1-6, 1977.

TORRESS, A.M.; SOOST, R.K.; DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. Am J Bot, v. 65, n. 8, p. 869-881, 1978.

UCHOI, A.; MALIK, S.K.; CHOUDHARY, R.; KUMAR, S.; ROHINI, M.R.; PAL, D.; et al. Inferring Phylogenetic Relationships of Indian Citron (*Citrus Medica* L.) Based on rbcL and matK Sequences of Chloroplast DNA. *Biochemical Genetics*, 2016.

VELASCO, R.; LICCIARDELLO, C.A genealogy of the citrus family. Nature Biotechnology, v. 32, n. 7, p. 640-642, 8 jul. 2014.

VOORRIPS, R.E. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. Journal of Heredity, v. 93, n. 1, p. 77-78, 1 jan. 2002.

WEBBER, H.J. Cultivated varieties of Citrus, p. 475-668. In: H.J. Webber and L.D. Batchelor (eds.). The citrus industry, Vol. I. Univ. of California, Berkeley, 1943.

WU, G.A. et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. Nature biotechnology, v. 32, n. 7, p. 656-662, 2014.

XU, C.J. et al. Parentage analysis of huyou (Citrus changshanensis) based on internal transcribed spacer sequences. Plant Breeding, v. 125, n. 5, p. 519-522, out. 2006.

XU, Q. et al. The draft genome of sweet orange (Citrus sinensis). Nature Genetics, v. 45, n. 1, p. 59-66, 25 nov. 2013.

YAMAMOTO, M.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; YAMADA, Y.. Phylogenic relationships of citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. Jpn J Breed. 43:355-365, 1993.

YINGZHI, L. et al. Phylogenetic Analysis of Mandarin Landraces, Wild Mandarins, and Related Species in China Using Nuclear LEAFY Second Intron and Plastid trnL-trnF Sequence. J. Japan. Soc. Hort. Sci., v. 132, n. 6, p. 796-806, 2007.

ZHONG, G.Y.; YE, Y.M. A numerical study of Citrus and its close relatives (in Chinese with English Summary). Acta Phytotax. Sin. 31: 252-260, 1993.