

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR NA PROGÊNIE
HÍBRIDA F₁ DO CRUZAMENTO *Passiflora gardneri* MAST x
***Passiflora gibertii* N.E. BROW**

GONÇALO SANTOS DA SILVA

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Fevereiro de 2014

GONÇALO SANTOS DA SILVA

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR NA PROGÊNIE HÍBRIDA F₁ DO
CRUZAMENTO *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* N.E. BROW**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margarete Magalhães de Souza.

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Fevereiro de 2014

S586

Silva, Gonçalo Santos da.

Citogenética clássica e molecular na progênie híbrida F1 do cruzamento *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* N. E. Brow / Gonçalo Santos da Silva. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

vii, 76f. : il.

Orientadora: Margarete Magalhães de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. *Passiflora*. 2. Hibridação. 3. Cromossomos Vegetais. 4. Plantas – Melhoramento genético. I. Título.

CDD 583.626

GONÇALO SANTOS DA SILVA

CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR NA PROGÊNIE HÍBRIDA F₁ DO
CRUZAMENTO *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* N.E. BROW

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2014

Prof. Dra. Eliana Regina Forni Martins
(UNICAMP)

Prof. Dra. Janay Almeida dos Santos Serejo
(EMBRAPA)

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC)

Prof. Dra. Margarete Magalhães de Souza
(UESC - Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Raimundo e Teresinha, pelo apoio incondicional durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais Raimundo e Teresinha, por todo amor, apoio e incentivo durante a minha vida acadêmica.

À Professora Dra. Margarete Magalhães de Souza, pela orientação, dedicação, apoio no desenvolvimento deste trabalho e pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

Ao Cláudio, pela amizade, pelos conselhos e pela sua total disponibilidade em me auxiliar durante os procedimentos de laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas, Artur, Polliana, Vanessa e Viviane pela amizade e por toda a ajuda no laboratório.

Às minhas grandes amigas Daniela, Emanuelle e Lívia, pelo imenso carinho e pela amizade.

Às amigas Lara e Thayse, pela amizade, que vem desde a graduação.

Ao meu grande amigo Jonson, pela sua amizade, companheirismo, incentivo e pelas longas conversas no telefone durante os finais de semana longe da família.

Ao meu amigo Robson, que mesmo distante sempre se fez presente em minha vida.

Aos amigos do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia molecular, pela amizade que pude adquirir ao longo desses dois anos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia molecular, Fábricia, Kátia e Mara pela disponibilidade em resolver as questões burocráticas.

Ao técnico de campo Paulo, por toda ajuda na casa de vegetação.

A toda minha família, por sempre estarem ao meu lado.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, em especial ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular.

À Coordenadoria do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Muito Obrigado!

EXTRATO

SANTOS, Gonçalo Silva, M. S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2014. **Citogenética clássica e molecular na progênie híbrida F₁ do cruzamento *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* N.E. BROW.** Orientadora: Margarete Magalhães de Souza.

As passifloras destacam-se como plantas ornamentais devido à beleza e originalidade de suas flores. No mercado de plantas ornamentais, os híbridos de *Passiflora* L. merecem destaque devido à possibilidade da produção de novas plantas que possuam flores com novos formatos e novas cores. No Brasil, a produção de híbridos de *Passiflora* geralmente tem sido feita entre espécies silvestres e *P. edulis* Sims, com o interesse de transferir genes de resistência das espécies silvestres para a cultivada. No entanto, a produção de híbridos para fins ornamentais tem ganhado espaço no país. Este trabalho teve como objetivo caracterizar e confirmar a paternidade dos híbridos obtidos do cruzamento entre *P. gardneri* Mast x *P. gibertii* N. E. Brown utilizando a citogenética clássica e molecular. As células metafásicas foram obtidas de ápices de raízes pré-tratadas com 8 Hidroxiquinolina. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e mantidas a -20 °C até a aplicação das técnicas. A coloração convencional foi feita com Giemsa 2% para contagem do número cromossômico dos genitores e híbridos. O número cromossômico ($2n = 18$) não variou entre os genótipos analisados. O cariótipo dos híbridos apresentou características intermediárias aos genitores. No bandamento com os fluorocromos CMA₃/DAPI, verificou-se que todos os blocos CMA₃ foram localizados nas regiões de satélites. Para confirmação dos híbridos, foram aplicadas as técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e hibridização genômica *in situ* (GISH). Para a FISH, foram utilizadas simultaneamente as sondas DNAr 45S e 5S. A sonda 45S foi obtida a partir do clone de trigo pTa71 por amplificação via PCR e marcada com Biotina-16-dUTP via *Nick translation*. A sonda 5S foi obtida via PCR com o par de *primers* específico para *Passiflora* (5'-GTGCGATCATAACCAGRYTAATGCACCGG-3' e 5'-GAGGTGCAACACGAGGACTTCCCAGGAGG -3') e marcada com digoxigenina-11-dUTP via *Nick tranlation*. As hibridizações foram realizadas em metáfases de genitores e híbridos. Os cromossomos marcadores (portando um sítio de DNAr 5S ou 45S) foram selecionados com base em sua localização em cada genoma específico para análise dos híbridos F₁ obtidos do cruzamento *P. gardneri* x *P. gibertii*. Foram utilizados apenas os

cromossomos com sítios de DNAr com características específicas para cada genoma, os que possuíam características semelhantes não foram utilizados. A presença de cromossomos marcadores característicos para cada genitor nos híbridos confirmou o caráter híbrido dos genótipos. A GISH tem sido realizada com sucesso em inúmeras famílias de plantas para identificação de espécies aloploplóides, híbridos interespecíficos e intergenéricos e no melhoramento de plantas. Nesse estudo a GISH discriminou os cromossomos dos genitores nos híbridos interespecíficos. Para aplicação da técnica, o DNA genômico total do genitor paterno, *P. gibertii*, foi utilizado como sonda. A marcação foi realizada por *Nick translation* com Biotina-16-dUTP. O DNA genômico total do genitor materno, *P. gadneri*, foi utilizado como DNA de bloqueio. Todos os híbridos foram confirmados. Cada híbrido apresentou nove cromossomos de origem paterna, marcados com a sonda (FITC) e nove cromossomos de origem materna, contracorados com DAPI. Para a distinção dos genomas foi necessário utilizar o DNA de bloqueio 100 vezes mais concentrado que a sonda. A necessidade de uma alta concentração de DNA de bloqueio sugere que as duas espécies possuem muitas sequências repetitivas em comum, estando próximas filogeneticamente.

Palavras-chave: CMA₃/DAPI, confirmação de paternidade, FISH, GISH, híbrido interespecífico, passiflora ornamental.

ABSTRACT

SANTOS, Gonçalo Silva, M. S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2014. **Classical and molecular cytogenetics in F₁ hybrid progeny crossing *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* BROWNE**. Advisor: Margarete Magalhães de Souza.

The passifloras stand out as ornamental plants due to the beauty and originality of its flowers. In the ornamental plant market, hybrids of *Passiflora* L. noteworthy because of the possibility of producing new plants that have flowers with new shapes and new colors. In Brazil, the production of *Passiflora* hybrids has usually been made between wild species and *P. edulis* Sims, with interest to transfer resistance genes from wild species to cultivated. However, hybrid production for ornamental purposes has gained ground in the country. This study aimed to characterize and confirm the paternity of hybrids obtained from a cross between *P. gardneri* Mast x *P. gibertii* N. E. Brown using classical and molecular cytogenetics. The metaphase cells were obtained from the tips of roots pretreated with 8 Hydroxyquinoline. The slides were prepared by the technique of squashes and stored at -20 °C until application of the techniques. Conventional staining was done with 2% Giemsa for counting the chromosome numbers of the parents and hybrids. The chromosome number ($2n = 18$) did not vary between the analyzed genotypes. The karyotypes of the hybrids showed intermediate characteristics to parents. In CMA₃/DAPI banded it was noted that all CMA₃ blocks located at the same position of satellites. For confirmation of hybrids, the techniques of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and genomic *in situ* hybridization (GISH) were applied. For FISH, the probes 5S and 45S rDNA were simultaneously used. The 45S probe was obtained from wheat clone pTa71 by PCR amplification and labeled with biotin-16-dUTP by nick translation. The 5S probe was obtained by PCR with the primer pair specific for *Passiflora* (5'-GTGCGATCATAACCAGRYTAATGCACCGG-3' e 5'-GAGGTGCAACACGAGGACTTCC CAGGAGG -3') and labeled with digoxigenin-11-dUTP by Nick translation. The hybridizations were performed on metaphases of parents and hybrids. The marker chromosomes carrying a site of 5S or 45S rDNA were selected based on their location in each individual genome for analysis of F₁ hybrids produced by crossing *P. gardneri* x *P. gibertii*. Only chromosomes with rDNA sites with specific characteristics for each genome were used, those who possessed similar characteristics were not used. The presence of chromosomal markers characteristic for each parent in the hybrids confirmed the hybrid character of the genotypes. GISH has been successfully performed in several plant families to identify

allopolyploids species, intergeneric and interspecific hybrids and in plant breeding. In this study, GISH discriminated the chromosomes of parents in interspecific hybrids. For application of the technique, the total genomic DNA from the paternal parent, *P. gibertii*, was used as a probe. The staining was performed by Nick translation with biotin-16-dUTP. Total genomic DNA from the maternal parent, *P. gadneri*, was used as blocking DNA. All hybrids were confirmed. Each hybrid presented nine chromosomes of paternal origin, marked with the probe (FITC) and nine chromosomes of maternal origin, counterstained with DAPI. To distinguish the genomes it was necessary to use the blocking DNA 100 times more concentrated than the probe. The need for high concentrations of blocking DNA suggests that both species have in common many repetitive sequences and are phylogenetically close.

Key-words: CMA₃/DAPI, confirmation of paternity, FISH, GISH, interspecific hybrid, ornamental passion flower.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| EXTRATO | iii |
| ABSTRACT | v |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 1. Família Passifloraceae e gênero <i>Passiflora</i> | 4 |
| 2. Morfologia do gênero <i>Passiflora</i> | 6 |
| 3. Potencial ornamental de <i>Passiflora</i> | 7 |
| 4. As species <i>Passiflora gardneri</i> e <i>Passiflora gibertii</i> | 9 |
| 5. Hibridação em <i>Passiflora</i> | 10 |
| 6. Confirmação de hibridação em <i>Passiflora</i> | 13 |
| 7. Estudos citogenéticos em <i>Passiflora</i> | 15 |
| CAPÍTULO 1: Genomic <i>in situ</i> hybridization in plants | 18 |
| Abstract | 18 |
| 1. Introduction | 19 |
| 2. GISH technique | 20 |
| 3. Applications of GISH | 20 |
| 4. Interspecific hybrids | 22 |
| 5. Intergeneric hybrids | 23 |
| 6. Origin and evolution of allopolyploids | 24 |
| 7. Improvement of plants | 27 |
| 8. Acknowledgments | 28 |
| 9. References | 28 |
| CAPÍTULO 2: Determinação do caráter híbrido da progênie F ₁ do cruzamento <i>Passiflora gardneri</i> MAST. x <i>Passiflora gibertii</i> N.E. BROW com base em GISH e Cromossomos Marcadores | 31 |
| Resumo | 31 |
| Abstract | 32 |
| 1. Introdução | 33 |

| | |
|--|----|
| 2. Material e Métodos | 35 |
| 2.1 Material vegetal | 35 |
| 2.2 Coleta e preparação de lâminas | 35 |
| 2.3 Análise cariomorfológica | 36 |
| 2.4 Análise com fluorocromos CMA ₃ /DA /DAPI | 36 |
| 2.5 Extração do DNA genômico | 36 |
| 2.6 Tratamento de lâminas para hibridização <i>in situ</i> | 37 |
| 2.7 Preparo de sondas para hibridização <i>in situ</i> | 37 |
| 2.8 Aplicação e análise de GISH e FISH | 38 |
| 3.Resultados | 40 |
| 3.1 Análise cariomorfológica | 40 |
| 3.2 Bandamento CMA ₃ /DA/DAPI..... | 43 |
| 3.3 FISH com o uso de sondas DNAr 45S e 5S | 46 |
| 3.4 GISH | 52 |
| 4. Discussão | 55 |
| 5. Conclusões | 60 |
| 6. Agradecimentos | 60 |
| 7. Referências | 61 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 67 |
| REFERÊNCIAS | 68 |

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* L. possui uma grande variabilidade genética e é o mais rico dentro da família Passifloraceae Juss (BERNACCI et al., 2003; MELETTI et al., 2005a). O Brasil possui condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento das passifloras, sendo considerado um importante centro de diversidade do grupo, com 137 espécies descritas (BERNACCI et al., 2013a). No entanto, novas espécies continuam sendo descobertas (BERNACCI; SOUZA, 2012).

As passifloras são utilizadas principalmente para duas finalidades: para o mercado de frutas e para o mercado de plantas ornamentais, devido à beleza e originalidade de suas flores. O Brasil é considerado o maior produtor mundial de maracujá, em que se destacam as variedades *P. edulis* f. *edulis* Sims e *P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg., que no final da década de 90 correspondia a 95% da área plantada (MELETTI et al., 2005a). Os dados do ano de 2011 mostraram que a área plantada no país foi de 61.631 ha, com 923.035 t de produção e um rendimento de 14,98 t/ha (IBGE, 2011). Quanto à produção de plantas ornamentais, as passifloras já são bem estabelecidas para essa finalidade na Europa e Estados Unidos, sendo comum encontrar, em seções de jardinagem de supermercados europeus e norte-americanos, diversas variedades de passiflora ornamental, tanto espécies selecionadas quanto uma grande quantidade de híbridos (PEIXOTO, 2005). No Brasil o mercado de passifloras ornamentais ainda permanece quase inexplorado, mesmo o país tendo as condições favoráveis para tal. No entanto, as perspectivas para o uso ornamental no país têm aumentado e pouco a pouco vem sendo ampliado e divulgado (ABREU et al., 2009).

As passifloras são usadas como plantas ornamentais desde o século XVII na Europa. Os primeiros relatos apontam que apenas duas espécies eram usadas como plantas ornamentais, sendo elas *P. caerulea* L. e *P. incarnata* L.. Somente cerca de 200 anos mais tarde é que o inglês Thomas Milne produziu o primeiro híbrido artificial, cruzando as espécies *P. caerulea* e *P. racemosa* Brot. (PEIXOTO, 2005). Desde então uma quantidade imensa de híbridos tem sido produzidos para fins ornamentais (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

No Brasil a produção de híbridos tem sido voltada principalmente para produção de cultivares resistentes para o mercado de frutas. As hibridações são feitas com o intuito de transferir genes de resistência das espécies silvestres para *P. edulis* (MELETTI et al., 2005b). No entanto, a produção de híbridos ornamentais está começando a mudar no cenário

brasileiro. Na Universidade Estadual de Santa CRUZ (UESC), que desde 2004 possui um BAG com espécies silvestres de passifloras, tem feito cruzamentos interespecíficos para a obtenção de híbridos exclusivamente ornamentais (CONCEIÇÃO et al., 2011). Já foram produzidos alguns híbridos, os quais estão registrados na Sociedade Internacional de Passifloras, como *P.* ‘Bella’, *P.* ‘Gabriela’ (BELO, 2010), *P.* ‘Aninha’, *P.* ‘Alva’ e *P.* ‘Priscilla’ (SANTOS et al., 2012). Para a produção de híbridos com maior potencial ornamental e comercial, é necessário conhecer, explorar e manusear convenientemente a variabilidade genética disponível, o que requer a caracterização do germoplasma como parte de programas de melhoramento genético (MELETTI, 1998; MELETTI et al., 2000).

A confirmação de hibridação consiste em um passo essencial em um programa de melhoramento. Diversas metodologias podem ser utilizadas para confirmação de híbridos, desde a baseada em características morfológicas, que é uma metodologia simples e de baixo custo, sem a necessidade de grande infraestrutura para a sua realização (OLIVEIRA et al., 2005), até as que são realizadas em nível molecular e citogenético. Os marcadores moleculares são excelentes ferramentas para a confirmação de hibridação, em que a presença de apenas uma banda informativa já é o suficiente para sua confirmação (FALEIRO et al., 2003). Os marcadores moleculares RAPD foram utilizados para confirmar 15 hibridações feitas com várias espécies de passifloras, e todas as plantas foram confirmadas com a presença de uma única banda informativa (JUNQUEIRA et al., 2008). Os marcadores RAPD também foram utilizados com sucesso para confirmação de quatro híbridos de interesse ornamental (CONCEIÇÃO et al., 2011). Os marcadores RAPD e SSR foram eficientes na confirmação dos híbridos ornamentais *P.* ‘Bella’, *P.* ‘Gabriela’ (BELO, 2010), *P.* ‘Aninha’, *P.* ‘Alva’ e *P.* ‘Priscilla’ (SANTOS et al., 2012).

A confirmação em nível citogenético também pode ser muito útil em um programa de melhoramento. Os híbridos podem ser analisados desde a contagem do número cromossômico e caracterização cariotípica, até a análise do comportamento meiótico. A redução do pareamento meiótico durante a meiose, e consequente redução da fertilidade, tem sido utilizada para identificação de híbridos (GATT et al., 2000). As técnicas envolvendo citogenética molecular tem se mostrado excelentes ferramentas para essa finalidade. A utilização da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), utilizando sequências gênicas repetitivas (genes de DNAr), fornece excelentes cromossomos marcadores com sítios DNAr 45S e 5S para identificação de híbridos (MARASEK et al., 2004). Da mesma forma, o uso da hibridização genômica *in situ* (GISH) tem sido empregada para identificação de híbridos em inúmeras famílias de plantas (SILVA; SOUZA, 2013). A GISH utiliza o DNA genômico total

de um genitor como sonda e o DNA genômico total do outro genitor como DNA de bloqueio, e dessa maneira é possível identificar o genoma de cada espécie doadora no híbrido (STACE; BAILEY, 1999; SILVA; SOUZA, 2013).

O presente trabalho teve com objetivo principal utilizar técnicas de citogenética clássica e molecular para confirmar e caracterizar os híbridos F₁ resultantes do cruzamento entre *P. gardneri* e *P. gibertii*; como objetivos específicos: (i) caracterizar os cariótipos dos genitores e híbridos; (ii) identificar marcadores cromossômicos que permitam a distinção entre os cromossomos dos genitores; (iii) confirmar a paternidade dos híbridos; (iv) distinguir cromossomos oriundos de cada genoma (paterno e materno) nos híbridos interespecíficos.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Família Passifloraceae e gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae, pertencente à ordem Malpighiales (MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ et al., 2004), é composta por cerca de 650 espécies e representada por 17 gêneros (BERNACCI et al., 2013b). As espécies desta família são, em geral, lianas com gavinhas, que habitam os trópicos e subtropicais quentes das Américas e África, mas também podem se apresentar como arbustos e árvores (BERNACCI et al., 2013b). Dos 17 gêneros aceitos atualmente para a família Passifloraceae, quatro deles ocorrem no Brasil: *Ancistrothrysus* Harms, *Mitostemma* Mast., *Dilkea* Mast. e *Passiflora* L., com 149 espécies (BERNACCI et al., 2013a). No entanto, esse número continua aumentando com as novas descobertas feitas recentemente, tais como *Passiflora kikiana* Cervi & Linsingen (CERVI; LINSINGEN, 2010), *P. cristalina* Vanderpl. & Zappi (VANDERPLANK; ZAPPI, 2011) *P. cacao* Bernacci & M. M. Souza (BERNACCI; SOUZA, 2012) e *P. pottiae* Cervi & Imig (CERVI; IMIG, 2013).

Dentro da família Passifloraceae, as principais características são a presença de gavinhas axilares utilizadas para sustentação em outras árvores, glândulas nos pecíolos e na superfície foliar, flores que apresentam cores variadas, com pétalas e sépalas em número de cinco e presença de corona, androceu com cinco estames e gineceu composto de três estiletos; as folhas são alternas simples, e as sementes são ariladas (KILLIP, 1938). A maioria das espécies são auto-incompatíveis (AKAMINE; GIROLAMI, 1957) e dependem de animais polinizadores como as mamangavas (*Xylocopa* spp.), que são os agentes polinizadores mais eficientes para as passifloráceas (RUGGIERO, 1980), beija-flores (*Ensifera ensifera*) (LINDBERG; OLESEN, 2001), morcegos, vespas e abelhas (BERNACCI et al., 2013b). No entanto, a abelha *Apis mellifera* tem efeito prejudicial à polinização, sendo considerada uma praga em lavouras de maracujazeiros (*P. edulis* f. *edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*) (BRUCKNER et al., 2005).

O gênero *Passiflora* é o mais rico dentro da família Passifloraceae, com mais de 525 espécies descritas (CERVI; IMIG, 2013). No Brasil, que é considerado um importante centro de diversidade do grupo, são encontradas 137 espécies (BERNACCI et al., 2013a). Na Bahia, o gênero *Passiflora* é representado por cerca de 31 espécies, com uma ampla distribuição, ocorrendo praticamente em todos os biomas do Estado, no entanto, a floresta atlântica do Sul

do Estado e a Chapada Diamantina são consideradas os principais centros de diversidade (NUNES; QUEIROZ, 2006).

Quanto à classificação, Killip (1938) subdividiu o gênero *Passiflora* em 22 subgêneros. No entanto, recentemente uma nova classificação infragenérica foi proposta, reconhecendo apenas quatro subgêneros: *Astrophea* D. C., *Deidamiodes* Harms, *Decaloba* D. C. e *Passiflora* (MACDOUGAL; FEUILLET, 2004). A análise filogenética utilizando sequências *trnL/trnT* e com base na evolução do número cromossômico suportou a redução dos 22 subgêneros proposto por Killip para os quatro subgêneros (HANSEN et al., 2006).

Além de *Passiflora* ser considerado o gênero mais representativo da família Passifloraceae, há um grande interesse econômico por várias espécies desse gênero, principalmente para o mercado de frutas (*P. edulis* e *P. alata*), para fins medicinais (*P. caerulea* e *P. incarnata*), uma vez que algumas espécies possuem um composto denominado passiflorina, um calmante natural (ULMER; MACDOUGAL, 2004), para a produção de cosméticos (cremes, óleos e perfumes) (PENHA, 2012) e para o mercado de plantas ornamentais, devido à beleza exótica de suas folhas e flores (ABREU et al., 2009).

Dentre as principais espécies do gênero com características comerciais devido à sua utilização como planta frutífera, destaca-se o maracujazeiro-azedo, que se apresenta em duas formas, *Passiflora edulis* Sims e *P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg. O maracujazeiro-azedo ocupa mais de 95% da área plantada de maracujá no Brasil, que é destinada para o mercado de frutas e para a indústria de sucos. O Brasil é o primeiro produtor mundial de maracujá, e dados do ano de 2011 mostraram 61.631 ha de área colhida e 923.035 t de produção, com rendimento de 14,98 t/ha. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o estado da Bahia é o maior produtor de maracujá do Brasil, com 29.885 ha de área colhida, 410.078 t de produção, com rendimento de 13,72 t/ha em 2011 (IBGE, 2011).

Embora o gênero *Passiflora* seja notoriamente reconhecido devido a sua grande importância econômica, no último levantamento feito no Brasil, seis espécies (*P. hatschbachii* Cervi, *P. imbeana* Sacco, *P. ischnoclada* Harms, *P. margaritae* Sacco, *P. urubiciensis* Cervi e *P. setulosa* Killip) encontram-se em risco de extinção, principalmente devido ao desflorestamento para agricultura e pecuária, implementação de lavouras e exploração de madeira (BERNACCI et al., 2013b). O processo de urbanização e expansão da agricultura têm reduzido a diversidade genética e o tamanho populacional (FERREIRA, 2005). Conseqüentemente, a conservação do gemoplasma de espécies silvestres é necessária para manter a variabilidade genética e permitir o acesso futuro a esses materiais (ABREU et al., 2009).

2. Morfologia do gênero *Passiflora*

As passifloras são plantas que apresentam ciclo de vida perene ou semi perene (PEREIRA et al., 2005). Compreendem plantas trepadeiras de hábito lenhoso ou herbáceo, com a presença de gavinhas. Porém, algumas poucas espécies apresentam-se como arbustos ou até mesmo pequenas árvores com 15 m de altura e caule de 20 cm de diâmetro (subgênero *Astrophea*), como por exemplo, *P. arborea* Spreng. e *P. lindeniana* Triana & Planch. (MACDOUGAL; FEUILLET, 2004).

As folhas são geralmente alternadas, no entanto, há muita variação entre as espécies do gênero, havendo variação até mesmo dentro da mesma espécie, como exemplo podemos citar *P. setacea* D. C. (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Provavelmente essa grande variação no formato das folhas das passifloras ocorreu devido à pressão evolutiva entre as passifloras e borboletas do gênero *Heliconiinae* (VANDERPLANK, 2000). Para a maioria das espécies, as folhas são simples, elípticas ou orbiculares, inteiras ou lobadas, 2-9 lobos, 3-5 nervuras, a margem pode ser inteira, serreada, denteada ou pectinada, base cordada, truncada, arredondada ou cuneada, pecíolo com ou sem glândulas, glândulas peciolares sésseis, estipitadas ou pedunculadas, algumas vezes com glândulas nos lobos dos sinus. Poucas espécies apresentam folhas compostas, como *P. deidamioides* Harms (ULMER; MACDOUGAL, 2004; NUNES; QUEIROZ, 2006). As gavinhas desenvolvem-se nas axilas das folhas e são ausentes em espécies lenhosas (CUNHA et al., 2002). A presença de gavinha solitária é uma característica da família (NUNES; QUEIROZ, 2006).

A maioria das espécies floresce abundantemente durante vários meses no ano. Geralmente as flores permanecem abertas por até um dia, porém algumas espécies como *P. bahienses* e *P. eichleriana* ficam abertas por mais de um dia (ABREU et al., 2009) e *P. aurantia* G. Forst., *P. cinnabarina* Lindl. e *P. herbertiana* Ker Gawl. permanecem com suas flores abertas por até três dias consecutivos (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Apresentam flores com uma ampla gama de variação de cor, desde flores com um vermelho intenso (*P. coccinea* Aubl.) até flores brancas (*P. setacea*), havendo espécies com coloração laranja, roxo, amarelo e azul. O cálice é formado por cinco sépalas. As sépalas são carnosas, ovais, lanceoladas, até amplamente oval-deltoides. A corola é formada geralmente por cinco pétalas membranáceas, que se alternam com as sépalas. A corona (um grupo de filamentos que circunda toda a base do ovário) é uma característica marcante em *Passiflora*, sendo utilizado como um caráter para a taxonomia do grupo. O androginóforo, que é uma coluna que se inicia na base central do tubo do cálice, suporta as partes reprodutoras (estames e carpelos), que

situam na parte superior, sempre em número de cinco e unidos por sua base (CERVI, 1997; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Possuem ovário globoso, ovoide ou fusiforme, unilocular, 3-carpelar, muitos óvulos em placentação parietal. Estiletos em número de três, distintos ou unidos na base, cilíndricos ou clavados. Estigmas capitados, orbiculares ou reniformes (NUNES; QUEIROZ, 2006). As passifloras possuem flores hermafroditas, que podem se apresentar como flores individuais ou aos pares, e em algumas espécies como inflorescências.

Nectários extra-florais, sésseis ou penduculados, podem estar presentes, podendo ser utilizados como caráter taxonômico, pois a distribuição destes nectários pode ser utilizada para o reconhecimento das espécies. Eles podem ocorrer no pecíolo, na lâmina foliar (margem ou superfície), nas brácteas ou nas sépalas (NUNES; QUEIROZ, 2006).

O fruto pode ser uma baga indeiscente ou uma cápsula com deiscência longitudinal muito variável em forma, tamanho e cor, que pode ter coloração amarela, vermelha ou roxa. Em relação à forma, o fruto pode ser globoso, ovoide ou elipsoide. Os frutos raramente são deiscentes, como em *P. capsularis* L., onde o fruto é uma cápsula, que se abre longitudinalmente no ápice, liberando as sementes quando maduras (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004; NUNES; QUEIROZ, 2006). As sementes são sempre numerosas, comprimidas e com uma testa dura. Apresentam diferentes formatos, desde ovadas a obcordadas. A testa apresenta textura do tipo reticulada, estriada, foveolada a sulcada, com ápice liso, bidentado ou tridentado (*P. foetida* L.). As sementes são revestidas por um arilo, constituído de uma polpa ácida mucilaginosa ou aquosa (NUNES; QUEIROZ, 2006).

3. Potencial ornamental de *Passiflora*

Desde que a primeira espécie de maracujazeiro (*P. incarnata*) foi descoberta, as suas flores têm encantado pessoas em todo o mundo devido à beleza e originalidade. Talvez o maracujazeiro tenha sido a planta americana que mais encantou os europeus que se aventuravam no novo mundo. Além de sua beleza única, a flor de *Passiflora* também foi associada à crucificação de Cristo, em que, as folhas representam a lança que transpassou Jesus na cruz; as gavinhas, o açoite; a corona de filamentos, de coloração vermelha e azul, a coroa de espinhos; os três estiletos simulavam os três cravos e as cinco anteras representavam as chagas de Cristo (CERVI, 1997), sendo chamada de a flor-da-paixão (SOUSA; MELETTI, 1997).

Algumas características colocam as passifloras na lista de plantas ornamentais, como suas flores exóticas e a capacidade de florescimento durante todo o ano, além de sua folhagem exuberante (ABREU et al., 2009). As passifloras começaram a ser cultivadas como plantas ornamentais na Europa por volta de 1625 com as espécies *P. caerulea* e *P. incarnata*. Durante muitos anos o cultivo ficou restrito a essas duas espécies, até que em 1819 o inglês Thomas Milne conseguiu produzir o primeiro híbrido artificial, cruzando *P. racemosa* com *P. caerulea* obtendo assim *P. 'Violacea'*, que ainda hoje permanece em cultivo (PEIXOTO, 2005). Desde então, uma quantidade imensa de híbridos são produzidos para serem utilizados exclusivamente na ornamentação (<http://www.passiflorasociety.org>).

Na Europa e Estados Unidos o uso de passifloras já é consolidado como planta ornamental há mais de um século, sendo amplamente comercializadas, seja na forma de mudas ou sementes, para ornamentação de jardins, cercas, estufas e pérgolas (VANDERPLANK, 2000; RUSHING, 2003; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Apesar de ser considerado o centro de diversidade do grupo, o uso das passifloras como plantas ornamentais ainda permanece bastante incipiente no Brasil, embora sejam plantas essencialmente de clima tropical e assim não exigem nenhuma prática onerosa para o seu cultivo, como a construção de estufas, como é feito nos países de clima temperado (SOUZA et al., 2003). Os relatos do uso de *Passiflora* ornamental ainda são restritos e pontuais. Na região norte do país há relatos do uso para ornamentação de *P. coccinea* e no nordeste de *P. cincinnata* Mast. (PEIXOTO, 2005). A espécie *P. caerulea*, que é utilizada apenas para fins ornamentais, foi inserida na listagem por uma empresa do ramo paisagístico, visando à produção de mudas para formação de cercas-vivas (MELETTI et al., 2005b). No sudeste, *P. alata* Curtis e, mais raramente, *P. edulis* são usadas de forma mista, em pérgulas ou cercas para aproveitar os frutos e ter como bônus uma flor bela e perfumada. Porém, ultimamente *P. alata* tem sido a espécie mais utilizada para ornamentação, sendo assunto de reportagens pelas revistas de paisagismo e decoração, tanto para ambientes externos como para interiores (DURANTE, 2013; CARINI, 2014).

Algumas espécies e híbridos se adequam a diferentes ambientes para ornamentação: *P. malacophylla* Mast., *P. 'Cordelia'* (*P. coccinea* x *P. vitifolia* H. B. & K) e *P. 'Lady Margaret'* (*P. coccinea* x *P. incarnata*) podem ser usadas em encostas expostas ao sol que necessitem de uma grande massa foliar para cobertura. Já em encostas sombreadas *P. amethystina* Mikan é mais adequada; *P. seemannii* Griseb., *P. actinia* Hook, *P. sidaefolia* M. Roem, *P. serrulata* Jacq. e *P. triloba* Ruiz & Pav. podem ser usadas em pérgolas; *P. racemosa* pode ser usada em locais sombreados; *P. sanguinolenta* Mast & Linden, *P. tulae* Urb. e *P. auriculata* H.B. & K.

podem ser usadas como cercas vivas para separar diferentes ambientes; *P. racemosa* e *P. kermesina* Link & Otto. podem ser cultivadas em varandas ou locais com meia sombra; além disso, é possível cultivar qualquer espécie em vaso, desde que se tenha o suporte adequado e que seja feita podas para manter no tamanho desejado (PEIXOTO, 2005).

No Brasil, a EMBRAPA lançou as primeiras variedades híbridas de passiflora ornamental: BRS Estrela do Cerrado, BRS Roseflora e BRS Rubiflora. O híbrido BRS Estrela do Cerrado foi obtido a partir do cruzamento entre as espécies silvestres *P. coccinea* de flores vermelhas, e *P. setacea*, de flores brancas; as plantas BRS Roseflora e BRS Rubiflora foram obtidas a partir do retrocruzamento entre BRS Estrela do Cerrado e *P. setacea* e *P. coccinea*, respectivamente (FALEIRO et al., 2007a; 2007b; JUNQUEIRA et al., 2007).

Recentemente foi implantado na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) um programa de melhoramento de *Passiflora* voltado para produção de híbridos ornamentais. De maneira geral, os híbridos são bastante desejáveis como planta ornamental, pois as hibridações promovem variações em cores e formatos de estruturas florais (BERNACCI et al., 2005). Na UESC, já foram obtidos híbridos do cruzamento *P. subblanceolata* J. M. MacDougal x *P. foetida* (SANTOS et al., 2012). Os híbridos obtidos estão registrados na Sociedade Internacional de Passiflora (<http://www.passiflorasociety.org>) como *P.* ‘Alva’, *P.* ‘Aninha’, *P.* ‘Priscilla’. Dessa forma, uma nova realidade começa a surgir no País. A hibridação entre as espécies *P. gardneri* Mast. e *P. gibertii* N. E. Brown tem sido bem sucedida. Alguns híbridos já foram produzidos, os quais estão registrados como *Passiflora* ‘Gabriela’ e *P.* ‘Bella’ (BELO, 2010).

Em relação ao uso de passifloras como plantas ornamentais, parece que no Brasil o problema é mais cultural (ABREU et al., 2009). Apesar de o Brasil ser o maior produtor de maracujá do mundo, as pessoas não vêem o maracujazeiro como uma planta produtora de flor, embora as achem muito bonitas. A cultura do maracujazeiro como frutífera parece superar a beleza única de suas flores. Pode-se dizer que os produtores de maracujazeiro no Brasil ignoram a sua beleza. Embora essa questão cultural seja muito forte no país, isso pode ser mudado através de um trabalho sistemático de conscientização (PEIXOTO, 2005).

4. As espécies *Passiflora gardneri* e *Passiflora gibertii*

Essas duas espécies foram escolhidas devido às características de suas folhas e flores (BELO, 2010). *P. gardneri* possui belas flores e florecimento abundante que vai de março a

setembro (CERVI, 1997). Já *P. gibertii* pode produzir até 30 flores por dia, além de possuir crescimento e florescimento precoce (VANDERPLANK, 2000).

A espécie *Passiflora gardneri* está distribuída geograficamente nos estados de Mato Grosso e Goiás. Essa espécie é uma liana, com um crescimento que pode alcançar vários metros de comprimento. É uma planta que cresce normalmente em beira de estrada. É uma espécie heliófita, ou seja, não tolera sombreamento, necessitando de níveis de luz intensa para sobreviver. Suas folhas são trilobadas com flores roxas, que medem entre 6 e 7 cm, floresce e frutifica de setembro a março (PEIXOTO, 2013). Apresenta pétalas lanceoladas a oval-lanceoladas, obtusas no ápice e de coloração roxa. As sépalas são oblongo-lanceoladas, esverdeadas na face abaxial e roxas na face adaxial. A corona desta espécie encontra-se dividida em cinco séries de filamentos (CERVI, 1997).

Passiflora gibertii é uma espécie endêmica do estado de Mato Grosso. Essa espécie é uma liana, com um crescimento que pode alcançar vários metros de comprimento. Assim com *P. gardneri*, é uma espécie heliófita que cresce normalmente em beira de estrada. Possui folhas trilobadas e flores com pétalas e sépalas de coloração branca, que medem entre 7 e 8 cm de diâmetro (PEIXOTO, 2013). Floresce e frutifica de dezembro a março e seus frutos são bastante procurados pelos pássaros (CERVI, 1997).

Além do interesse ornamental, a espécie *P. gibertii* possui resistência à morte prematura e a outras doenças causadas por patógenos do solo (MELETTI; BRUCKNER, 2001; FISCHER, 2005), por isso possui potencial para ser utilizada como porta enxerto e também no melhoramento genético (JUNQUEIRA et al., 2005). *P. gibertii* é considerada um porta enxerto ideal para *P. edulis* f. *flavicarpa* (LIMA, 2005), pois apresenta resistência à bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (FISCHER et al., 2007), uma das pragas que mais acometem os pomares de maracujazeiros no Brasil.

5. Híbridação em *Passiflora*

O primeiro híbrido produzido envolvendo espécies do gênero *Passiflora* ocorreu em 1819, quando o inglês Thomas Milne, cruzou *P. caerulea* e *P. racemosa*, obtendo o híbrido de origem sexuada que denominou de *P. 'Violacea'*, segundo a fórmula de hibridação descrita por Jean-Louis-Auguste-Loiseleur-Destongchamps, em 1928 (VANDERPLANK, 2000). A finalidade da obtenção de híbrido ainda permanece desconhecida, mas acredita-se que foi para fins ornamentais (ABREU et al., 2009). Embora exista uma vasta definição para o termo, os híbridos artificiais são resultados de cruzamentos inter ou intraespecíficos utilizando-se

genitores com genótipos diferentes e originando espécies que comportam genes alelos de interesse (ALLARD, 1971; GRIFFITHS et al., 1998; VANDERPLANK, 2000). Até 2005, cerca de 400 híbridos de passifloras com finalidade ornamental já haviam sido reportados (PEIXOTO, 2005). Entre 2010 e 2011 foram registrados 21 novos híbridos (KING, 2011), e a maioria deles possui flores de grande exuberância.

A hibridação interespecífica é amplamente utilizada em programas de melhoramento, no entanto, o sucesso da hibridação depende da compatibilidade genética entre as duas espécies envolvidas no cruzamento. Para que se tenha sucesso na hibridação é necessário que as espécies envolvidas tenham homologia cromossômica, pois assim garante a viabilidade do híbrido (PEREIRA et al., 2005). Em *Passiflora* o processo de hibridação é relativamente fácil, pois as barreiras de incompatibilidade são frágeis em muitas espécies (MELETTI et al., 2005b).

Dentro do gênero *Passiflora* a produção de híbridos até então tem geralmente dois propósitos, ou para a produção de cultivares resistentes a doenças, geralmente para a produção de frutos, ou para a produção de híbridos ornamentais (SANTOS et al., 2012). No Brasil, a grande maioria dos híbridos produzidos envolve cruzamentos entre *P. edulis* f. *edulis* e outras espécies silvestres, geralmente com o intuito de obter cultivares do maracujá comercial resistentes a doenças (JUNQUEIRA et al., 2005). No entanto, a produção de híbridos com interesse ornamental tem ganhado espaço, no qual vários híbridos vêm sendo produzidos para essa finalidade (ABREU, 2008; BELO, 2010; CONCEIÇÃO et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

Um dos maiores polos de produção de híbridos ornamentais está situado na Alemanha, sendo o Dr. Roland Fischer considerado um dos expoentes, realizando melhoramento genético e induzindo plantas à tetraploidia, conseguindo assim flores maiores e mais vistosas adaptadas ao cultivo em vasos (PEIXOTO, 2005). Há também outros produtores renomados, entre eles podemos citar Maurizio Vecchia (Itália), Leopold Sevcík (República Checa), John Vanderplank (Grã Bretanha) e Patrick J. Worley (Estados Unidos) (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

As passifloras são alógamas por excelência. A autoincompatibilidade, ou seja, a incapacidade de uma planta ser fertilizada pelo seu próprio pólen favorece a hibridação cruzada, até mesmo entre espécies diferentes (BRUCKNER et al., 1995). Por isso, a autoincompatibilidade é útil na produção de híbridos em *Passiflora*.

Levando em consideração as características florais e o florescimento em *Passiflora*, o emprego das técnicas de hibridação é relativamente fácil, pois as espécies

possuem flores grandes e florescem o ano todo, além disso, a viabilidade do pólen e a receptividade do estigma ocorrem no mesmo dia (BRUCKNER; OTONI, 1999).

No Brasil, apesar de possuir uma condição privilegiada quanto aos recursos genéticos de *Passiflora*, a maioria dos híbridos interespecíficos obtidos apresenta problemas de desenvolvimento, esterilidade masculina, baixa viabilidade polínica ou dificuldade em florescer em alguns cruzamentos (MELETTI; BRUCKNER, 2001). Por isso, a hibridação interespecífica não tem sido explorada adequadamente em muitos programas de melhoramento (NAKASONE; PAULL, 1999). Há alguns problemas com híbridos interespecíficos, como suscetibilidade às doenças, falta de adaptação, baixo vigor, macho esterilidade, produção de pólen inviável, entre outros (OLIVEIRA; RUGGIERO, 1998). Por exemplo, o híbrido *P. edulis* x *P. gibertii* apresentou macho esterilidade, com reduzida produção de pólen viável (BARBOSA; VIEIRA, 1997a). No entanto, há muitos resultados positivos com híbridos de *Passiflora* (JUNQUEIRA et al., 2005, BELO, 2010; CONCEIÇÃO et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

A hibridação somática por meio da fusão de protoplastos é uma das técnicas biotecnológicas que tem sido utilizada, demonstrando ser eficiente para superar barreiras entre espécies incompatíveis (BARBOSA; VIEIRA, 1997a; BRUCKNER; OTONI, 1999). Ao contrário do processo sexuado, em que a herança citoplasmática é predominantemente materna, a hibridação somática, pela fusão de protoplastos, combina o genoma nuclear de ambas as espécies genitoras e possibilita a contribuição do genoma citoplasmático de ambas as espécies (GROSSER; GMITTER JR., 1990). Híbridos somáticos de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. incarnata* foram obtidos utilizando a técnica de eletrofusão de protoplastos de mesofilo (OTONI et al., 1995), e também foram obtidos a partir de protoplastos de *P. edulis* f. *flavicarpa* e protoplastos derivados de suspensões celulares das espécies *P. alata*, *P. amethystina* e *P. gibertii* (DORNELAS et al., 1995). As hibridações utilizando técnicas biotecnológicas possibilitam a transferência de genes entre espécies nas quais o cruzamento convencional não é possível ou é inviável.

Em *Passiflora*, devemos observar também a existência de híbridos naturais. Muitos autores com base em estudos evolutivos questionam a origem de algumas espécies. Acredita-se que nesse gênero novas espécies possam surgir por hibridação. Por exemplo, já foi proposto que *P. edulis* f. *flavicarpa* resultou do cruzamento entre *P. edulis* e *P. ligularis* Juss (POPE, 1935), no entanto, sua origem ainda permanece obscura, apontada por E. P. Killip como uma mutante ou híbrido selvagem (VANDERPLANK, 2000).

6. Confirmação de hibridação em *Passiflora*

Em *Passiflora*, até recentemente a confirmação de hibridação era feita apenas com base em características morfológicas. A confirmação de hibridação com base em caracteres morfológicos é simples e de baixo custo (SANTOS et al., 2012), uma vez que não é necessário a utilização de grandes estruturas para esse fim. Geralmente procura analisar se os híbridos possuem características intermediárias entre as espécies genitoras. Porém, com o advento da biologia molecular e com os refinamentos das técnicas em citogenética, novas ferramentas mais confiáveis estão surgindo. Atualmente os marcadores moleculares têm sido empregados para confirmação de hibridação em vários gêneros, tais como espécies do gênero *Theobroma* (FALEIRO et al., 2003), *Carica* (MAGDALITA et al., 1997) e *Passiflora* (JUNQUEIRA et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2011; SANTOS et al., 2012). O uso da citogenética molecular, hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e hibridização genômica *in situ* (GISH) fornece informações altamente confiáveis quanto à confirmação de híbridos, tanto com a utilização de cromossomos marcadores com o uso de FISH, utilizando DNAr 5S e 45S, por exemplo (MARASEK, et al., 2004), como com o uso de GISH, utilizando DNA genômico como sonda (SCHWARZACHER et al., 1989; MARASEK, et al., 2004; XIONG, et al., 2006; SILVA; SOUZA, 2013).

Em 2008, foi publicado o primeiro trabalho relatando o uso de marcadores moleculares para confirmação de paternidade em híbridos de *Passiflora* (JUNQUEIRA et al., 2008). O uso de um ou dois *primers* ou combinações de *primers* com, pelo menos, uma banda informativa já é suficiente para confirmar a ocorrência da fecundação cruzada (FALEIRO et al., 2003). A confirmação de híbridos utilizando marcadores moleculares consiste em uma ferramenta rápida e confiável, uma vez que, usa o DNA e pode ser feita nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta (FALEIRO et al., 2003), reduzindo o tempo e o custo de manutenção das plantas em casa de vegetação (CONCEIÇÃO et al., 2011).

Com a utilização de marcadores RAPD foi possível confirmar quinze hibridizações envolvendo diferentes espécies de *Passiflora*, tanto híbridos F₁ quanto indivíduos retrocruzados, os quais estão listados a seguir: *P. laurifolia* x *P. nitida*; *P. edulis* f. *flavicarpa* GA2 x RC1 (GA2 x *P. coccinea*); *P. caerulea* x *P. amethystina*; *P. glandulosa* x *P. galbana*; *P. coccinea* x *P. actinia*; *P. glandulosa* x *P. edulis* f. *flavicarpa* GA2; *P. sidaefolia* x *P. actinia*; *P. galbana* x *P. actinea*; F₁ (*P. coccinea* x *P. setacea*) x *P. coccinea*; F₁ (*P. coccinea* x *P. setacea*) x *P. mucronata*; *P. eichleriana* x *P. gibertii*; *P. galbana* x *P. edulis* f. *flavicarpa*

GA2; *P. glandulosa* x *P. edulis* f. *edulis*; *P. glandulosa* x *P. sidaefolia*; *P. coccinea* x *P. setacea* (JUNQUEIRA et al., 2008).

Os marcadores RAPD também foram utilizados para confirmar a paternidade de híbridos com potencial ornamental, obtidos a partir dos seguintes cruzamentos: *P. gardneri* x *P. alata*, *P. watsoniana* x *P. alata*, *P. watsoniana* x *P. gardneri*, *P. gardneri* x *P. gibertii*. Todos os cruzamentos foram confirmados com, pelo menos, quatro bandas informativas (CONCEIÇÃO et al., 2011).

Os híbridos *P. ‘Bella’* e *P. ‘Gabriela’* obtidos do cruzamento *P. gardneri* x *P. gibertii*, visando sua utilização como planta ornamental, foram confirmados via SSR e RAPD. Tanto com SSR quanto com RAPD apenas um par de *primers* já foram suficientes para a confirmação de paternidade (BELO, 2010). Também com o uso desse dois marcadores foi possível confirmar o caráter híbrido de *P. ‘Aninha’*, *P. ‘Alva’* e *P. ‘Priscilla’*, obtidos do cruzamento entre *P. subalanceolata* (ex *P. palmeri* var. *subalanceolata*) e *P. foetida* (SANTOS et al., 2012).

Recentemente o método TBP (*tubulin-based-polymorphism*) foi aplicado para confirmar os seguintes híbridos: *P. ‘Amethyst’* (*P. kermesina* x *P. caerulea*); *P. ‘Caprice’* (*P. kermesina* x *P. tucumanensis*); *P. ‘Clara Luna’* (*P. caerulea* ‘*Constance Elliott*’ x *P. eichleriana*); *P. ‘Fata Confetto’* (*P. ‘Guglielmo Betto’* x ?); *P. ‘Guglielmo Betto’* (*P. incarnata* x *P. tucumanensis*); *P. ‘La Lucchese’* (*P. ‘Fata Confetto’* x *P. kermesina*); *P. ‘La Venexiana’* (*P. edmundoi* x *P. caerulea* ‘*Pierre Pomié*’); *P. ‘Manta’* (*P. xiikzodz* x *P. coriacea*); *P. ‘Thuraia’* (*P. kermesina* x *P. miersii*); *P. ‘Vivacemente’* (*P. incarnata* f. *alba* x *P. cincinnata* ‘*Dark Pollen*’); *P. x allardii* (*P. quadrangularis* x *P. caerulea* ‘*Constance Elliott*’); *P. x belotii* (*P. alata* x *P. caerulea*); *P. x colvilii* (*P. incarnata* x *P. caerulea*); *P. x colvilii* ‘*Clara*’ (*P. incarnata* x *P. caerulea* ‘*Constance Elliott*’); híbrido n.1 CRA-FSO (*P. subalanceolata* x *P. foetida* var. *hastata*). Os genótipos oriundos de cada cruzamento possuem o perfil dos íntrons intermediários, com uma distribuição de tamanho que reflete fielmente os genótipos de ambos os genitores (BRAGLIA et al., 2014). O método TBP permite um reconhecimento fácil, rápido e preciso da contribuição de cada genitor.

7. Estudos citogenéticos em *Passiflora*

O gênero *Passiflora*, assim como os demais gêneros da família Passifloraceae, tem sido pouco estudado citogeneticamente. Até 2005 apenas uma pequena parte das espécies

tinham seus números cromossômicos conhecidos, cerca de 100 espécies (CUCO et al., 2005), com raras informações sobre análises cariotípicas e medidas cromossômicas (SOARES-SCOTT et al., 2005). Os trabalhos mais abrangentes, principalmente abordando o número cromossômico foram realizados por Bowden (1945), Storey (1950), Beal (1969a; 1969b; 1973a; 1973b), Raven (1975) Morawtz (1986), Snow e MacDougal (1993), Melo et al. (2001) e Melo e Guerra (2003). Das 137 espécies que ocorrem no Brasil, até 2008 menos da metade tiveram o número cromossômico conhecido (SOUZA et al., 2008). A escassez de dados cariotípicos para a maioria das espécies de *Passiflora* provavelmente se deve a dificuldades na coleta dessas espécies, na germinação de sementes e na manutenção das espécies em casas de vegetação ou outros ambientes *ex situ*, e também pelo pequeno tamanho cromossômico para a maioria das espécies (SOARES-SCOTT et al., 2005).

As espécies de *Passiflora* estudadas possuem diferentes números cromossômicos, podendo ser agrupadas de acordo com o número básico (x), existindo vários números básicos, $x = 6$, $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$ (MELO; GUERRA, 2003). O número básico $x = 6$ é considerado ancestral dentro do gênero e os demais são considerados secundários (MELO et al., 2001), porém, $x = 12$ também tem sido considerado como número básico ancestral (HANSEN et al., 2006). No entanto, mais informações são necessárias para entender a evolução do número cromossômico nesse gênero (HANSEN et al., 2006). Além dessa questão envolvendo o número básico, e devido à facilidade com que híbridos podem ser produzidos dentro desse grupo, existindo mais de 400 híbridos produzidos artificialmente (ULMER; MACDOUGAL, 2004; PASSIFLORA SOCIETY, 2014), alguns autores afirmam que muitas espécies de *Passiflora* podem ter origem híbrida (POPE, 1935; VANDERPLANK, 2000).

Considerando o número básico $x = 6$, a evolução por poliploidia é fortemente defendida para o grupo. As espécies com $2n = 18$ provavelmente seriam triploides (STOREY, 1950), as espécies $2n = 36$ seriam hexaploides (MELETTI et al., 1992), e as espécies $2n = 84$ seriam poliploides ($2n = 14x$) (STOREY, 1950). Porém, estudos com FISH utilizando sondas de DNAr mostram apenas um par de sítios 45S ou 5S em algumas espécies com $2n = 18$, derrubando a teoria de triploidia.

Para a maioria das espécies de *Passiflora* analisadas, geralmente se observa cromossomos pequenos, com o comprimento cromossômico médio variando entre 1,0 e 3,7 μm (SOARES-SCOTT et al., 2005), o maior comprimento já observado foi em *P. quadrangularis*, 4,51 μm (SOUZA et al., 2003). As passifloras em geral apresentam, em sua maioria, cariótipos simétricos, com cromossomos submetacêntricos e metacêntricos (SOARES-SCOTT et al., 2005).

Em *Passiflora*, a visualização de satélites não é sempre possível, dificultando a identificação de cromossomos satelitados em muitas espécies. Além disso, vários autores citam a localização de satélites em cromossomos diferentes de uma mesma espécie (CUCO et al., 2005; MAYEDA; VIEIRA, 1995; MELETTI et al., 2005a; VIANA; SOUZA, 2012). Em *P. edulis* vários trabalhos têm identificado satélites em diferentes pares cromossômicos. Satélites de *P. edulis* já foram observados no braço longo do cromossomo 8 e no braço curto do cromossomo 9 (CUCO et al., 2005), nos braços longos dos cromossomos 4 e 7 (MAYEDA; VIEIRA, 1995; MELETTI et al., 2005a), nos braços curtos dos cromossomos 1 e 4 (VIANA; SOUZA, 2012), além disso, três pares cromossômicos com satélites já foram observados (SOARES-SCOTT et al., 1999). Essas diferenças quanto a localização dos satélites provavelmente indicam a ocorrência de variação em populações diferentes de *P. edulis*, possivelmente devido a rearranjos cromossômicos (SOUZA et al., 2003), ou mesmo devido qualidade das preparações citológicas ou ainda devido ao grau de compactação dos cromossomos.

O uso de CMA e FISH fornece melhores evidências sobre o entendimento da diversificação cariotípica dentro do grupo (MELO et al., 2001), além de serem técnicas muito promissoras na identificação e caracterização de aloploidos e híbridos. Em *P. tricuspidata* Mast., por exemplo, foi observado apenas um par cromossômico com constrição secundária (MELO et al., 2001), no entanto, foram observados dois pares cromossômicos com blocos CMA⁺ e sítios de DNAr 45S (MELO; GUERRA, 2003).

Em *Passiflora* foram reportados indivíduos de algumas espécies com algum tipo de alteração estrutural. Em um único indivíduo de *P. racemosa* analisado foram observados cinco blocos CMA₃⁺, com quatro blocos menores e apenas um bloco maior (MELO et al., 2001). Em *P. suberosa* L. foi observado a presença de um sítio de DNAr 45S e um sítio de DNAr 5S no mesmo cromossomo (MELO; GUERRA, 2003). Em um indivíduo de *P. glandulosa* Cav., tanto na metáfase mitótica quanto no núcleo interfásico, foi observada a presença de um sítio de DNAr 5S apenas em um homólogo. Já em outro indivíduo da mesma espécie o par cromossômico com o sítio de DNAr 5S foi heteromórfico quanto ao tamanho (MELO; GUERRA, 2003).

O estudo do padrão de bandas C, que pode ser uma importante ferramenta para análises evolutivas em *Passiflora*, até recentemente não havia sido realizado dentro do grupo. Com o objetivo de observar o padrão de bandas C em *Passiflora*, duas metodologias diferentes foram adaptadas para obtenção de bandas C e um protocolo foi estabelecido para *Passiflora* (VIANA; SOUZA, 2010). Nesse estudo, os autores obtiveram o padrão de banda C

de *P. edulis* f. *edulis* e *P. cacao* (ex *P. cacaoensis*), uma espécie recém descoberta no Sul da Bahia (BERNACCI; SOUZA, 2012). O padrão de banda C forneceu excelentes resultados para a delimitação entre essas duas espécies. O bandamento C mostrou que apenas *P. cacao* possui o braço longo do cromossomo três heterocromático e o braço curto do cromossomo nove quase todo heterocromático, características que a diferencia de *P. edulis* f. *edulis* (VIANA; SOUZA, 2012).

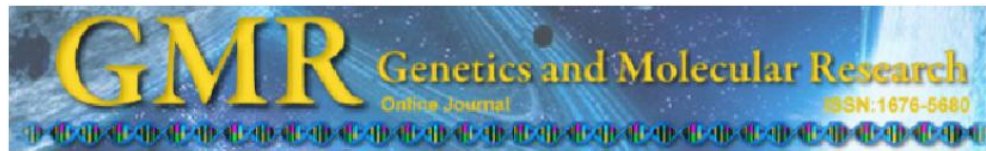
Em híbridos de *Passiflora*, os estudos cariotípicos envolvendo híbridos sexuados ou somáticos, ainda são muito pouco frequentes. A maioria dos híbridos produzidos são $2n = 18$, envolvendo espécies de interesse econômico (SOARES-SCOTT et al., 2005). O híbrido sexuado de *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. setacea* e o híbrido somático de *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. incarnata* apresentaram variáveis cariotípicas intermediárias entre os genitores (SOARES-SCOTT, 1998). Híbridos somáticos também foram obtidos entre *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. amethystina* (BARBOSA; VIEIRA, 1997a) e *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. cincinnata* (BARBOSA; VIEIRA, 1997b), para os quais foi analisado o comportamento meiótico. Híbridos sexuados já foram obtidos entre as espécies *P. sublanceolata* x *P. foetida* var. *foetida*, em que foi analisado o número cromossômico e o comportamento meiótico (SANTOS et al., 2012), sendo observados indivíduos aneuploides, com o número cromossômico diferente dos genitores.

A citogenética molecular em híbridos de *Passiflora* é praticamente inexistente, embora a localização de genes de DNAr possa fornecer excelentes marcadores para caracterização e confirmação de paternidade em híbridos (HASTEROK et al., 2004). O uso da FISH com sondas de DNAr 5S e 45S para mapeamento e caracterização foi reportada apenas no híbrido somático de *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. amethystina* (CUCO et al., 2005).

Aneuploidia tem sido reportada em híbridos artificiais de *Passiflora*. No híbrido somático *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. amethystina* foram observadas amostras com $2n = 35$, em vez de $2n = 36$, no entanto, a ausência de um cromossomo não afetou o desenvolvimento vegetativo e florescimento da planta (CUCO et al., 2005). Da mesma forma, no cruzamento entre *P. sublanceolata* x *P. foetida*, ambas $2n = 22$, foram observados híbridos com mesmo número cromossômico que os genitores, mas também híbridos aneuploides com $2n = 20$, no entanto, a perda um par cromossômico ($2n = 22 - 2$) não afetou negativamente o desenvolvimento dos híbridos (SANTOS et al., 2012).

Artigo publicado na revista Genetics and Molecular Research

CAPÍTULO 1:



Review

Genomic *in situ* hybridization in plants

G.S. Silva and M.M. Souza

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz,
Ilhéus, BA, Brasil

Corresponding author: M.M. Souza

E-mail: souzamagg@yahoo.com.br

Genet. Mol. Res. 12 (3): 2953-2965 (2013)

Received April 25, 2012

Accepted July 5, 2013

Published August 12, 2013

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013.August.12.11>

ABSTRACT. Genomic *in situ* hybridization (GISH), which is a modification of fluorescent *in situ* hybridization, has been widely used in the study of plants. It has become one of the most important techniques for molecular cytogenetics. GISH is a technique that allows distinguishing the genomes in a cell. With this technique, it is possible to differentiate the genomes in a hybrid; consequently, this tool has been applied to the study of hybrid lineages, genetic improvement programs, and studies of the evolution of polyploids. Moreover, GISH can be applied to the analysis of the meiotic behavior in hybrids and polyploids, providing information concerning the relationship between species. This review presents the wide application of this technique in plants.

Key words: GISH; Intergeneric hybrids; Interspecific hybrids; Allopolyploids; Plant improvement

INTRODUCTION

Until the beginning of the 1970s, the only way to analyze chromosomes was through classical cytogenetics, which was based mainly on the study of the morphology, such as the size of the arms, position of the centromeres and location of the secondary constrictions, number and alterations of chromosomes. It was possible to visualize stained chromosomes always in a uniform manner, or using banding techniques, which are not successful with some species and which do not always provide reliable results due to the difficulties in their interpretation. However, with the development of molecular cytogenetics at the end of the 1960s, which began with the research of Pardue and Gall (1969), a technique that allowed the localization of DNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations was developed. Thus, more efficient tools were developed, aimed at the study of chromosomes in a refined way. These tools allowed the identification of sequences and regions in the chromosome that could not be analyzed through conventional cytogenetics, thereby guaranteeing more reliable results, making them useful in different approaches. Molecular cytogenetics has led to great advances in our understanding of the evolution, genetics, and karyotypic alterations in plant species (Brammer et al., 2007). This technique makes it possible to identify DNA sequences in mitotic or meiotic chromosomes, in interphase nuclei, and in extended chromatin fibers (Brasileiro-Vidal and Guerra, 2002), thereby allowing inferences on the probable chromosomal alterations that occurred in a taxon during the evolutionary process. With this new approach, a large volume of data has been generated over the last years.

The initial molecular cytogenetic techniques used radioactively labeled probes. The isotope tritium [^3H] is largely used because of its low energy radiation, which guarantees better probe resolution. Other isotopes are also used, such as [^{125}I], [^{35}S], and [^{32}P]. In general, the radioactive isotope is chosen according to the resolution level desired. Currently, radioactive probes are rarely used, as they demand a long exposure time and also endanger the health of those who handle them (Guerra, 2004).

Nowadays, non-radioactive probes are used, where a label is bound to the DNA probe. The most used labeling molecules are digoxigenin and biotin, which are detected by means of fluorochromes (direct staining) or by an antibody-fluorochrome conjugate (indirect staining). With the introduction of fluorochromes, this technique became known as fluorescent *in situ* hybridization (FISH) (Guerra, 2004).

And a little more than the two decades ago, genomic *in situ* hybridization (GISH), a modification of FISH, emerged as one of the most important and versatile tools of molecular cytogenetics (Schwarzacher, 2003). While FISH uses specific DNA sequences as probes, such as the 45S and 5S ribosomal genes, single-copy genes, and telomeric DNA, GISH uses total genomic DNA of a species as probe. The great advance of this technique in relation to FISH is the labeling of entire genomes, making it advantageous in many studies, for example, in the identification of genomes and in meiotic analysis (Stace and Bailey, 1999). GISH has been intensely used in the identification of the genomes of genitors in natural or artificial hybrids (interspecific or intergeneric), in the origin and evolution of natural allopolyploids, and in plant improvement programs, such as the selection of genitors in genetic improvement. With this tool, direct (visual) results are obtained as regards the distinction of different genomes in a hybrid, with information being easy to analyze in a reliable manner (Wang et al., 2009).

The aim of this article is to report the use of GISH in the identification of plant genomes.

GISH technique

GISH is used for the purpose of distinguishing chromosomes from different genitors or from different genomes in interspecific/intergeneric hybrids or allopolyploids. In this case, total genomic DNA of a genitor involved in the formation of a hybrid is used at the same time as an unlabeled DNA from another genitor, at a higher concentration, which serves as a blocking DNA, hybridizing with the sequences in common with both genomes. In GISH, the probe is easier to obtain, and may be used directly, with no need for amplification, because the amount of DNA is limitless (Peñaloza and Pozzobon, 2007). Total genomic DNA must be broken into smaller fragments, which can be done by using restriction enzymes, autoclaving, or sonicating. Although autoclaving is more often used to break DNA due to the low cost of the equipment, sonication provides greater precision as regards the size of the DNA fragments. Probe labeling may be carried out with random primers, PCR, or nick translation; however, labeling using kits for nick translation is more widely used (Guerra, 2004).

The probe/blocking DNA ratio must be enough to prevent the labeling of chromosomes of both genomes at the same time (Brammer et al., 2009). The use of blocking DNA is usually necessary in hybrids derived from close species, due to the high degree of homology shared between the species that originated the hybrid, which may enable the probe to label the genomes of both genitors indistinctly. It was necessary to use 100X concentrated blocking DNA in hybrids of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* to distinguish the genomes (Parokony et al., 1997), whereas in hybrids of *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare*, both genomes were identified without the need of a blocking DNA (Tang et al., 2011), since species belonging to a different genus show greater genetic distance. By adjusting the blocking DNA concentration for each species, in accordance with the degree of genetic proximity, it is possible to assure that the probe stains only one of the genomes. The concentration of blocking DNA must be adjusted for each family under study. The use of unlabeled genomic DNA as blocking agent increases the specificity of the staining and prevents cross-hybridization (Anamthawat-Jónsson et al., 1990). Usually, genomes that share 80-85% homology can be differentiated using standard GISH conditions (Schwarzacher et al., 1989). On the other hand, with the increase in stringency conditions combined with excess of blocking DNA, it is possible to differentiate genomes that share up to 90-95% homology (Parokony et al., 1997).

Applications of GISH

This method has been used with great success in the study of plants, in different approaches. One of the great advantages of this technique is its use as a tool to analyze meiotic behavior, that is, how chromosomes behave during the meiotic process, how pairing occurs among chromosomes, or how meiosis occurs in natural and artificial hybrids, whether pairing occurs only between homologous chromosomes or if it occurs between homeologous chromosomes. With GISH, it is possible to determine the formation rate of univalents, bivalents, and multivalents in a hybrid by relating them to genitor genomes, and also the chiasma frequency (recombination) between homeologous chromosomes. The great advantage is that with this technique it is possible to visualize which factors lead to an irregular meiosis, and how it affects fertility.

The analysis of meiotic behavior was performed by means of GISH in interspecific

hybrids of cultivated species of bananas. The hybrids were obtained from the crossing between *Musa acuminata* ($2n = 2x = 22$, AA) and *M. balbisiana* ($2n = 2x = 22$, BB). The interspecific triploid hybrids 'Figure Pomme' ($2n = 3x = 33$, AAB) and 'Praha' ($2n = 3x = 33$, ABB) were observed as univalent, bivalent, and multivalent in both cultivars, with homeologous bivalents being observed in all cells analyzed; all multivalents (trivalent and tetravalents) involved homeologous chromosomes. In this study, it was possible to demonstrate the recombination between genomes A and B, which can be useful in the domestication and improvement of interspecific banana cultivars (Jeridi et al., 2011). In *Brassica*, GISH was used to verify the hybrids derived from the cross between the wild species *B. maurorum* ($2n = 2x = 16$, MM) and two cultivated species, *B. rapa* ($2n = 2x = 20$, AA) and *B. napus* ($2n = 4x = 38$, AACC). The cross between *B. maurorum* and *B. rapa* originated the hybrid ($2n = 18$, MA), and the cross between *B. maurorum* and *B. napus* originated the hybrid ($2n = 27$, MAC). In this study, the genomes M, A, and C were unequivocally distinguished, and by analyzing meiotic behavior it was possible to observe that the majority of the chromosomes in the hybrids did not pair, thereby remaining as univalents (Yao et al., 2010).

The meiotic pairing of the chromosomes in metaphase I of allotetraploid hybrids of the cross of *Lolium perenne* x *Festuca pratensis* ($2n = 4x = 28$; *FpFpLpLp*) was analyzed in species involving the *Lolium-Festuca* complex, which have been widely studied. The autotetraploid individuals of *L. perenne* ($2n = 4x = 28$; *LpLpLpLp*) and *F. pratensis* ($2n = 4x = 28$; *FpFpFpFp*) were obtained through the duplication of the genome of the diploid species. GISH showed that the formation of the bivalents was predominantly intragenomic (bivalents *Lp/Lp* and *Fp/Fp*), and the formation of the bivalents was intergenomic (*Lp/Fp*) at only 33%. These data are informative and provide accurate information about the degree of intergenomic pairing and the recombination potential that may exist between two genomes of interest (Zwierzynski et al., 2008).

In the improvement of plants, it is not always possible to obtain the plant desired at the end of a backcross, mainly due to problems that occur during meiosis, which can result in aneuploid gametes. GISH may be very useful to analyze problems that can appear during crosses in an improvement program and makes this process impracticable. GISH was used to follow the insertion of the characteristic 'pink color' of the petals of *Lilium rubellum* in *L. longiflorum*, and to verify the F_1 hybrid and its backcrossed progenies RC_1 and RC_2 ; it was observed that the F_1 hybrid was infertile. It was possible to determine if infertility was due to abnormal meiosis, because the majority of the chromosomes remained as univalents during meiosis and because the homeologous chromosomes that formed the bivalents had a frequency of only one chiasma; fertility cannot be reestablished by means of amphidiploidy, and, as these two species were relatively distant, there was no pairing between homeologous chromosomes, but only between homologous chromosomes. It was not possible to insert the characteristic of interest, since the homeologous chromosomes of the two species did not recombine (Lim et al., 2000).

The meiotic behavior in an introgressed line of cultivated tomato, *L. esculentum* 'VF-36' ($2n = 2x = 24$) (= *Solanum lycopersicum*), was analyzed by GISH; it was possible to observe the sizes of the chromosome segments of *S. lycopersicoides*, a species of wild tomato, introgressed in the cultivated species of the tomato *L. esculentum*, where larger chromosome segments produced a larger GISH signal (Ji and Chetelat, 2007).

Another application of this technique is its use as a tool for confirmation of hybrids derived from apomictic species, which can reproduce without fertilization. The occurrence of apomixis has already been reported in some species of the genus *Lilium*. Therefore, it is

necessary to determine if the hybrids obtained from the cross between these species are truly hybrids. The use of GISH is one of the unequivocal ways of accomplishing this. With this tool, it was possible to distinguish the genomes in hybrids from the cross between *L. henryi* ($2n = 2x = 24$) and two cultivars 'Marco Polo' ($2n = 2x = 24$) and 'Expression' ($2n = 2x = 24$) belonging to the genus *Lilium*. It was possible to identify the 12 chromosomes of a genitor in relation to the one of the other genitor in both crosses, *L. henryi* x 'Marco Polo' and *L. henryi* x 'Expression' (Marasek et al., 2004).

The phylogenetic distance between the genitor genomes reflects the blocking DNA rate necessary in the hybridization mixture in GISH. By adjusting the blocking DNA rate used in GISH, it was possible to infer the phylogenetic relationship between 7 orchid species belonging to the genus *Paphiopedilum*. A 10X blocking DNA rate was enough to differentiate the genitor genomes from the hybrids resulting from the crosses *P. delenatii* x *P. callosum* and *P. delenatii* x *P. glaucophyllum*, whereas a 30X blocking DNA rate was necessary to differentiate the DNA of the genitors in the hybrids resulting from the following crosses: *P. delenatii* x *P. rothschildianum*, *P. rothschildianum* x *P. micranthum*, *P. rothschildianum* x *P. bellatulum*, and *P. rothschildianum* x *P. moquetteanum*; and a 50X blocking DNA rate was necessary to differentiate the genitor genomes in the hybrid resulting from the cross *P. delenatii* x *P. bellatulum*, suggesting that these species are remotely distant. However, it was not possible to differentiate the genomes from the genitors in the hybrid resulting from the cross *P. delenatii* x *P. micranthum*, suggesting that these species are very close within the genus (Lee et al., 2011).

Interspecific hybrids

The production of interspecific hybrids is very frequent in plants, mainly when the aim is to develop new cultivars or to introduce a characteristic of interest in plants suitable for cultivation, which is always for improvement, such as resistance to pathogens, greater yield, and others. GISH has been widely used with the rice genus *Oryza*. Through the cytogenetic analysis of a hybrid belonging to the genus *Oryza*, it was possible to differentiate genome A from genome B using GISH. The genus *Oryza* has two cultivated species, *O. sativa* and *O. glaberrima*, and more than 20 wild species that may be used as a genetic material source. In the hybrid resulting from the cross between the cultivated species *O. sativa* ($2n = 2x = 24$, BB) and the wild species *O. meyeriana* ($2n = 2x = 24$, GG), the genomes of the two genitors were easily identified, showing a considerable divergence between the two species. The genome in the hybrid derived from *O. meyeriana* showed a significantly larger size, which was analyzed by classical cytogenetics. Its larger size was found to be due to the larger amount of heterochromatin (Xiong et al., 2006). Hybrids resulting from the cross between *O. sativa* ($2n = 2x = 24$, BB) and 3 wild species, *O. rufipogon* ($2n = 2x = 24$, AA), *O. officinalis* ($2n = 2x = 24$, CC) and *O. meyeriana* ($2n = 2x = 24$, GG), were also analyzed. It was not possible to differentiate the chromosomes of each donor genome using GISH in the hybrid resulting from the cross *O. sativa* x *O. rufipogon*. All chromosomes were stained when the genomic DNA of *O. rufipogon* was used without blocking DNA; however, with the increased concentration of blocking DNA the chromosomes were faintly stained. None of the chromosomes were stained when the blocking DNA was used at a probe/blocking DNA ratio of 1:40. It was not possible to differentiate the genomes of hybrids resulting from this cross, whereas it was possible to differentiate the genomes of each donor genitor in hybrids resulting from the crosses *O. sativa* x *O. officina-*

lis and *O. sativa* x *O. meyeriana*. In *Oryza*, the wild species have a larger genome due to the greater amount of heterochromatin, and *O. rufipogon* has a high degree of homology with *O. sativa*; therefore, it is believed that cultivated rice originated from *O. sativa* (Tan et al., 2006).

The first autotetraploid species within the genus *Setaria* was identified on the basis of GISH. The genomes of the diploid species *S. adhaerens* ($2n = 2x = 18$, BB) and *S. viridis* ($2n = 2x = 18$, AA) were used as probes in the investigation of the genetic constitution of the tetraploid species *S. queenslandica* ($2n = 4x = 36$). None of the chromosomes were stained when genome B of *S. adhaerens* was used as probe, whereas the 36 chromosomes were stained when genome A of *S. viridis* was used as probe. These results clearly suggest that *S. queenslandica* is an autotetraploid species with the genome constitution AAAA (Wang et al., 2009). *Clivia cyrtanthiflora* is an interspecific hybrid, produced by Charles Raes in the late 1980s, and refers to an ornamental cultivar, cultivated for more than 100 years in many parts of the world. Using GISH, it was possible to confirm that the individuals of *C. cyrtanthiflora* are in fact F_1 hybrids resulting from the cross between *C. miniata* and *C. nobilis* (Ran et al., 2001).

Intergeneric hybrids

GISH was first used by Schwarzacher et al. (1989) to identify the genomes of the intergeneric hybrid between *Hordeum chilense* ($2n = 2x = 14$) and *Secale africanum* ($2n = 2x = 14$), demonstrating that these genomes, 7 chromosomes of *H. chilense* and 7 chromosomes of *S. africanum*, could be recognized in the mitotic metaphase and during the cell cycle, occupying different domains in the interphase nucleus. This trend of the genomes of not mixing inside the nucleus, forming domains, can influence important functions in the cell, such as gene expression. Since the chromosomes may be stained during the cell cycle, this technique has the potential to supply information on the organization and space distribution of the genomes (Leitch et al., 1991).

In the production of somatic hybrids ($2n = 4x = 36$) resulting from the cross between *Citrus aurantium* ($2n = 2x = 18$) and *Poncirus trifoliata* ($2n = 2x = 18$), it was possible to distinguish the 18 chromosomes from each donor species by the GISH technique, also observing the presence of recombinant chromosomes between the two genomes in one plant (Fu et al., 2004).

GISH has been widely used in the study of hybrids of the family Brassicaceae. The use of GISH combined with classical cytogenetics to study the intergeneric somatic hybrid x *Brassicoraphanus* ($2n = 2x = 38$), derived from the cross between *Brassica campestris* ssp *pekinensis* ($2n = 2x = 20$) and *Raphanus sativus* ($2n = 2x = 18$), clearly identified that in the hybrid, 20 chromosomes were from *Brassica* and 18 chromosomes were from *Raphanus* (Lim et al., 2012). GISH analysis of the new cultivars from the cross between *Littonia modesta* ($2n = 2x = 22$), *Sandersonia aurantiaca* ($2n = 2x = 24$) and 3 cultivars belonging to the genus *Gloriosa*, *G. superba* 'Lutea' ($2n = 2x = 22$), *G. superba* 'Marrom Gold' ($2n = 4x = 44$), and *G. superba* 'Verschild' ($2n = 7x = 77$) demonstrated that in the 9 hybrids from intergeneric crosses involving the 3 genera, the genomes of the genitors were distinctly identified and there was no cross-hybridization, suggesting that the degree of homology between these 3 genera is relatively low, and that these genera diverged in the early evolutionary process (Nakazawa et al., 2011).

An intergeneric hybrid ($2n = 2x = 18$), which was later cytogenetically analyzed using GISH, was obtained from the intergeneric cross between *D. nankingense* ($2n = 2x = 18$) and

T. vulgare ($2n = 2x = 18$). Analysis with GISH successfully distinguished the chromosomes of *D. nankingense* from those of *T. vulgare* in the hybrid without blocking DNA. This ease of differentiating the chromosomes of these two species confirms that they are genetically distant, which makes the generation of intergeneric hybrids difficult (Tang et al., 2011). Also, as regards the report on the first intergeneric hybrid ($2n = 3x = 27$) involving the tetraploid species *D. indicata* ($2n = 4x = 36$) and the diploid species *Crossostephium chinense* ($2n = 2x = 18$), GISH allowed 18 chromosomes from the tetraploid species to be distinguished in relation to 9 chromosomes of the diploid species, without blocking DNA, which suggested a distant phylogenetic relationship between these two species (Tang et al., 2010).

In the analyzes of 8 hybrids resulting from the cross between tomatoes, *L. esculentum* x *S. lycopersicoides* as regards the composition of the chromosomes, using the GISH technique, it was possible to distinguish accurate groups of chromosomes derived from each genitor, namely 4 tetraploid hybrids ($2n = 4x = 48$) and 4 hexaploid hybrids ($2n = 6x = 72$). There was a set of tomato chromosomes (24 chromosomes) and a set of *S. lycopersicoides* chromosomes (24 chromosomes) in the tetraploid hybrids, whereas in hexaploid hybrids there were two sets of tomato chromosomes (48 chromosomes) and one set of *S. lycopersicoides* chromosomes (24 chromosomes). This difference in the chromosome sets of tetraploid and hexaploid hybrids may have influenced the apparent variation of the foliar morphology (Escalante et al., 1998).

Origin and evolution of allopolyploids

Polyploidy is considered the main evolutionary route in plants. It is estimated that more than 70% of angiosperms are polyploids (Wendel, 2000; Soltis and Soltis, 2000), resulting from both autopolyploidy and allopolyploidy, that is, polyploidy is considered the main force in the evolution of the genomes of plants. However, allopolyploid plants, where two or more different genomes are involved, are more frequent, as these plants have a higher degree of variability, favoring the best adaptation process throughout the evolutionary process (Soltis and Soltis, 2000).

The GISH technique can be used to better understand the origin and evolution of allopolyploids, and it can be applied when there is suspicion of an allopolyploid origin (Guerra, 2004). In the study of allopolyploids, the DNA of the probable donors is transformed into probes and used to hybridize with the allopolyploid plant; if a set of chromosomes (genome) is stained, then this plant was one of the probable donors for the formation of this allopolyploidy. An allopolyploid plant may have genomes of two or more donors that can be unequivocally differentiated by means of GISH, making this an important tool to understand the evolution of plants.

The efficiency of the GISH technique for the detection of allopolyploids was demonstrated in *Camellia reticulata*, globally known for its ornamental nature. In this species, where polyploids with $2x = 30$, $4x = 60$, and $6x = 90$ are found, with the basic chromosome number $x = 15$, previous studies indicated that polyploid individuals were allopolyploids. With the use of GISH it was possible to prove the allopolyploid origin of this species, demonstrating that *C. reticulata* ($4x$) resulted from the cross between *C. reticulata* ($2x$) and *C. pitardii* ($2x$), and that *C. reticulata* ($6x$) was the result of a subsequent cross between *C. reticulata* ($4x$) and *C. saluenensis* ($2x$) (Liu and Gu, 2011).

The genitors *Begonia longifolia* and *B. palmata* were identified by GISH in the natural allodiploid hybrid *Begonia x chungii* ($2n = 22$). However, when the DNA of any one of the genitors was used as probe, 16 chromosomes were stained in the natural hybrid, instead of 11 chromosomes, as expected (Kono et al., 2012). Simultaneously, 16 chromosomes, instead of 11, were stained in an artificial F_1 hybrid between *B. longifolia* and *B. palmata* (Kono et al., 2012). By means of meiotic studies, it was observed that these two species have a recent common ancestor, and that each one has 6 specific chromosomes and 5 shared chromosomes between the two species; therefore, 16 chromosomes were stained instead of 11.

The relationship between 6 commercially important species of *Brassica* - 3 diploids and 3 allopolyploids - was shown by means of classical cytogenetic studies. This relationship is usually referred to as the "U triangle", where the cross between *B. oleracea* ($2n = 2x = 18$, CC) and *B. rapa* ($2n = 2x = 20$, AA) originated the allotetraploid species *B. napus* ($2n = 4x = 38$, AACC); the cross between *B. nigra* ($2n = 2x = 16$, BB) and *B. oleracea* ($2n = 2x = 18$, CC) originated the allotetraploid species *B. carinata* ($2n = 4x = 34$, BBCC); and the cross between *B. rapa* ($2n = 2x = 20$, AA) and *B. nigra* ($2n = 2x = 16$, BB) originated the allotetraploid species *B. juncea* ($2n = 4x = 36$, AABB). The genomes of the allotetraploid species *B. juncea* and *B. carinata* were unequivocally distinguished in two studies using GISH, but the genomes of *B. napus* could not be distinguished (Snowdon et al., 1997; Hasterok et al., 2005). Later, a third study of the allotetraploid species *B. napus* using the GISH technique allowed genomes A and C of this species to be clearly distinguished (Howell et al., 2008).

In the GISH analysis of 3 natural allopolyploidy species of tobacco, *Nicotiana rustica* ($2n = 4x = 48$), *N. arentsii* ($2n = 4x = 48$) and *N. tabacum* ($2n = 4x = 48$), it was found that the donor species of *N. rustica* were ancestral species related to *N. paniculata* ($2n = 2x = 24$) and *N. undulata* ($2n = 2x = 24$). The donor species of *N. arentsii* were ancestors related to *N. undulata* ($2n = 2x = 24$) and *N. wigandioides* ($2n = 2x = 24$). The donor species of *N. tabacum* was closely related to *N. sylvestris* ($2n = 2x = 24$), donor of the maternal genome, and probably *N. tomentosiformis* ($2n = 2x = 24$), donor of the paternal genome (Lim et al., 2004).

In the genus *Eleusine*, the case of *E. coracana* was solved using GISH. Cytogenetic studies showed that *E. coracana* is an allotetraploid, and that the wild diploid species *E. indica*, *E. floccifolia*, *E. intermedia*, *E. tristachya*, and *E. verticillata* are their putative genitors. A study was carried out with the species *E. indica* ($2n = 2x = 18$), *E. tristachya* ($2n = 2x = 18$), *E. floccifolia* ($2n = 2x = 18$), *E. intermedia* ($2n = 2x = 18$), *E. multiflora* ($2n = 2x = 16$), and *E. jaegeri* ($2n = 2x = 20$) to try to find out which ones of these species donated their genome to *E. coracana* ($2n = 4x = 36$). The genomic DNA of *E. multiflora* and *E. jaegeri* used as probes did not stain any of the chromosomes of *E. coracana*; when the genomic DNA of *E. indica* and *E. floccifolia* were used, both stained 18 chromosomes of *E. coracana*, suggesting that these species are donors of the genomes of *E. coracana* (Bisht and Mukai, 2001).

The mango (*Mangifera indica* L.; $2n = 40$) is a commercially important fruit that belongs to the genus *Mangifera* (family Anacardiaceae). GISH was used to understand the relationship between *Mangifera indica* and 8 wild species belonging to the genus *Mangifera*. It was possible to distribute the 8 species into 4 groups according to the degree of hybridization (homology) with *Mangifera indica*. In group 1 (*M. sylvatica*, *M. flava*, and *M. caloneura*), all probes strongly stained not only the centromeric and telomeric regions but also several regions on the chromosomes. In group 2 (*M. cochinchinensis* and *M. foetida*), the number and intensity of stained areas were lower in relation to the first group. In group 3 (*M. gracilipes*),

the species displayed weak staining. There were no stained species in group 4 (*M. griffithii* and *M. macrocarpa*). Thus, the species belonging to group 1 are closely related, whereas species of group 4 are more distant from *M. indica* (Nishiyama et al., 2006).

The hybrid nature of the species *Emilia fosbergii* ($2n = 4x = 20$), considered as a natural allotetraploid, was analyzed with GISH. This species shows a bimodal karyotype, with 10 larger chromosomes and 10 smaller chromosomes; these subgroups of chromosomes are considered as coming from different ancestors. When the genomic DNA from *E. fosbergii* was used as probe, and the DNA from *E. sonchifolia* ($2n = 2x = 10$) was used as blocking DNA, only the subgroup with larger chromosomes was strongly stained, indicating that the subgroup of smaller chromosomes were derived from *E. sonchifolia* (Moraes and Guerra, 2010).

In an attempt to elucidate the amphidiploid nature of *Aster microcephalus* var. *ovatus* ($2n = 36$), the karyological analysis combined with the morphological characteristics, followed by artificial cross, suggested that *A. microcephalus* var. *ovatus* was a tetraploid amphidiploid species. Using the GISH technique and the genomic DNA of *A. inumae* ($2n = 18$) and *A. ageratoides* ($2n = 18$), without blocking DNA, it was possible to confirm that *A. microcephalus* var. *ovatus* was a tetraploid amphidiploid formed by the combination of the genomes of these two species (Matoba et al., 2007).

The peanut, *Arachis hypogaea* ($2n = 4x = 40$, AABB), is a species well established as an allotetraploid. Using the GISH technique, 7 diploid wild species were analyzed ($2n = 20$) to verify the probable donors of genomes A and B of the peanut. Among the species used, *A. duranensis* (genome A) and *A. ipaensis* (genome B), showed the most uniform and intense hybridization pattern. Therefore, they were considered the best candidates to be the donors of the genomes of *A. hypogaea* (Seijo et al., 2007).

Some factors keep the GISH technique from being 100% efficient in determining the interspecific and even intergeneric parental genomes, such as the strong genetic proximity between the analyzed species, or the high transposon rate. The history of the hybrid nature of maize has been studied for a long time, but recent molecular studies have confirmed the allotetraploid nature of maize (*Zea mays* ssp. *mays*, $2n = 4x = 20$) (Moore et al., 1995; Gaut and Doebley, 1997). However, the probable ancestral species of modern maize remains unknown. With the use of GISH, attempts were made to identify the probable maize diploid ancestors using the DNA of 10 wild species close to maize as probe. However, none of the probes stained a set of chromosomes, as expected, with only dispersed staining all over the genome. The probable explanations are: the species used are very close; none of the species used represent the maize ancestor; the genomes mixed very quickly after polyploidization due to the high transposon rate (Takahashi et al., 1999).

Previous studies indicate that *Miscanthus giganteus* ($2n = 3x = 57$) is formed by the combination of the genomes of *M. sinensis* ($2n = 2x = 38$) and *M. sacchariflorus* ($2n = 2x = 38$). To analyze the hybrid allopolyploid origin of this species, GISH and ITS sequences and AFLP analysis combined showed that although the ITS sequences and AFLP analysis clearly demonstrated that *M. giganteus* possessed the genomes of *M. sinensis* and *M. sacchariflorus*, it was not possible to distinguish the genomes using GISH. The use of *M. sinensis* and *M. sacchariflorus* as probes resulted in dispersed staining of all chromosomes (Hodkinson et al., 2002).

In the genus *Nothoscordum*, some of the variants of *N. gracile* are intermediates between *N. nudicaule* and *N. macrostemon*, which together with *N. gracile*, make part of the *Inodorum* complex. To elucidate the hybrid nature of *N. gracile*, the two species (*N. nudicaule*

and *N. macrostemon*) were used as probe for GISH, resulting in uniform staining of the chromosomes. Even at different blocking DNA concentrations (1X, 25X, 50X, and 75X), staining remained the same. The fact that this complex is very new may have been the reason that GISH was unable to distinguish the genomes belonging to the *Inodorum* complex, making it possible to produce viable hybrids between *N. nudicaule* and *N. macrostemon* (Souza et al., 2012).

Improvement of plants

The transfer of genes that confer resistance to diseases, extreme temperatures, and other adverse climatic factors, from wild species to cultivated species, is the central objective in the improvement of plants. The great utility of the GISH technique is that it makes possible to identify the chromosome where the DNA sequence of the wild species was inserted in the cultivated species, that is, the introgression of genes in cultivated species can be visualized and followed by means of GISH, as it is possible to locate the chromosome that has the introgressed sequence. A study was carried out with the F_1 hybrids and its backcrossed lines for analyzing the two species *Lolium multiflorum* and *Festuca arundinacea*, which make up part of the *Lolium/Festuca* complex. With the use of GISH, it was possible to demonstrate that the backcrossed plant *L. multiflorum* had the introgression of a chromosomal sequence of *F. arundinacea* located in the short arm of chromosome 2, which conferred greater drought resistance (Humphreys and Pasakinskiene, 1996).

The characterization of genomes with GISH can play an important role in the selection of hybrids with potentially useful characteristics during the initial cross stages, as well as characterizing new cultivars. In hybrids of *Festuca* x *Lolium*, the high frequency of intergeneric recombination and the ease by which interchromosomal transfers can be detected by GISH, make this tool attractive to verify introgression and to physically map the genes of interest (Kopecký et al., 2008).

The use of GISH using the genomic DNA of rye (*Secale cereale*) confirmed the presence of the translocation 1BL.1RS in the wheat line PF 839197. This translocation of the chromosome arm 1RS of rye in cultivars of wheat positively affects its performance and confers resistance against insects and the attack of pathogens (Brasileiro-Vidal et al., 2005). In the wheat line ZT, it was possible to determine the presence of two resistance genes deriving from *Thinopyrum intermedium*: one involving the translocation of chromosome 7D, called T7DS.7DL-7Ai#1L, carrying the *Bdv2* gene that confers resistance to BYDV-PAV, and the chromosome 2 pair, called 2Ai#z, which also carried the resistance gene to BYDV-PAV (Jahier et al., 2009). Using multicolor GISH, it was possible to characterize the resistant wheat lines, Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, and Z6, derived from the cross of wheat x *T. intermedium*, as to the presence of chromosomes of *T. intermedium* or from the translocations involving the two species (Han et al., 2003). Refer to Chen (2005) for a comprehensive review on the use of *Thinopyrum* as a source of genetic material for improvement of wheat.

The genomic composition of Darwin hybrid tulips from the cross between *Tulipa gesneriana* ($2n = 2x = 24$) and *T. fosteriana* ($2n = 2x = 24$) was determined by GISH. Twenty-three F_1 hybrids, 14 RC1, and 32 RC2 were used; all plants used were diploids ($2n = 2x = 24$), with the exception of plant BC2 (tetraploid, $2n = 4x = 48$) and plant BC2 (aneuploid, $2n = 2x + 1 = 25$). GISH could distinguish the genomes from both ancestors and the intergenomic recombinations (Marasek-Ciolakowska et al., 2012).

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) in the form of a scholarship for G.S. Silva.

REFERENCES

- Anamthawat-Jónsson K, Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, et al. (1990). Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. *Theor. Appl. Genet.* 79: 721-728.
- Bisht MS and Mukai Y (2001). Genomic *in situ* hybridization identifies genome donor of finger millet (*Eleusine coracana*). *Theor. Appl. Genet.* 102: 825-832.
- Brammer SP, Zanotto M and Caverzan A (2007). Citogenética Vegetal: da Era Clássica a Molecular. Embrapa Trigo, Passo Fundo. Available at [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm]. Accessed December 7, 2012.
- Brammer SP, Poersch LB, Oliveira AR, Vasconcelos S, et al. (2009). Híbridação Genômica *in situ* em Triticeae: Um Enfoque Metodológico. Embrapa Trigo, Passo Fundo. Available at [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co270.htm]. Accessed December 7, 2012.
- Brasileiro-Vidal AC and Guerra M (2002). Citogenética Molecular em Cereais. In: Atualização em Técnicas Celulares e Moleculares Aplicadas ao Melhoramento Genético Vegetal (Brammer SP and Iorczeski EJ, Org.). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 277-298.
- Brasileiro-Vidal AC, Cuadrado A, Brammer SP, Benko-Iseppon AM, et al. (2005). Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. *Genet. Mol. Biol.* 28: 308-313.
- Chen Q (2005). Detection of alien chromatin introgression from *Thinopyrum* into wheat using S genomic DNA as a probe - a landmark approach for *Thinopyrum* genome research. *Cytogenet. Genome Res.* 109: 350-359.
- Escalante A, Imanishi S, Hossain M, Ohmido N, et al. (1998). RFLP analysis and genomic *in situ* hybridization (GISH) in somatic hybrids and their progeny between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. *Theor. Appl. Genet.* 96: 719-726.
- Fu CH, Chen CL, Guo WW and Deng XX (2004). GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergeneric somatic hybrid combining Goutou sour orange and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell Rep.* 23: 391-396.
- Gaut BS and Doebley JF (1997). DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 6809-6814.
- Guerra M (2004). Hybridization *in situ*: Princípios Básicos. In: FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética (Guerra M, ed.). Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1-32.
- Han FP, Fedak G, Benabdelmouna A, Armstrong K, et al. (2003). Characterization of six wheat x *Thinopyrum intermedium* derivatives by GISH, RFLP, and multicolor GISH. *Genome* 46: 490-495.
- Hasterok R, Ksiazczyk T, Wolny E and Maluszynska J (2005). FISH and GISH analysis of *Brassica* genomes. *Acta Biol. Cracov.* 47: 185-192.
- Hodkinson TR, Chase MW, Takahashi C, Leitch IJ, et al. (2002). The use of dna sequencing (ITS and trnL-F), AFLP, and fluorescent *in situ* hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae). *Am. J. Bot.* 89: 279-286.
- Howell EC, Kearsley MJ, Jones GH, King GJ, et al. (2008). A and C genome distinction and chromosome identification in *Brassica napus* by sequential fluorescence *in situ* hybridization and genomic *in situ* hybridization. *Genetics* 180: 1849-1857.
- Humphreys MW and Pasakinskiene I (1996). Chromosome painting to locate genes for drought resistance transferred from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. *Heredity* 77: 530-534.
- Jahier J, Chain F, Barloy D, Tanguy AM, et al. (2009). Effect of combining two genes for partial resistance to Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) derived from *Thinopyrum intermedium* in wheat. *Plant Pathol.* 58: 807-814.
- Jeridi M, Bakry F, Escoute J, Fondi E, et al. (2011). Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic *in situ* hybridization. *Ann. Bot.* 108: 975-981.
- Ji Y and Chetelat RT (2007). GISH analysis of meiotic chromosome pairing in *Solanum lycopersicoides* introgression lines of cultivated tomato. *Genome* 50: 825-833.
- Kono Y, Chung MC and Peng CI (2012). Identification of genome constitutions in *Begonia* x *Chungii* and its putative parents, *B. longifolia* and *B. palmata*, by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Plant Sci.* 185: 156-160.
- Kopecký D, Lukaszewski AJ and Doležel J (2008). Cytogenetics of *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium* hybrids). *Cytogenet. Genome Res.* 120: 370-383.

- Lee YI, Chang FC and Chung MC (2011). Chromosome pairing affinities in interspecific hybrids reflect phylogenetic distances among lady's slipper orchids (*Paphiopedilum*). *Ann. Bot.* 108: 113-121.
- Leitch AR, Schwarzacher T, Mosgöller W, Bennett MD, et al. (1991). Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. *Chromosoma* 101: 206-213.
- Lim KY, Matyasek R, Kovarik A and Leitch AR (2004). Genome evolution in allotetraploid *Nicotiana*. *Biol. J. Linn. Soc.* 82: 599-606.
- Lim SJ, Lee SS and Bang JW (2012). Karyotype and genomic *in situ* hybridization pattern in x*Brassicoraphanus*, an intergeneric hybrid between *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and *Raphanus sativus*. *Plant Biotechnol. Rep.* 8: 107-112.
- Lim KB, Chung JD, van Kronenburg BC, Ramanna MS, et al. (2000). Introgression of *Lilium rubellum* Baker chromosomes into *L. longiflorum* Thunb.: a genome painting study of the F₁ hybrid, BC₁ and BC₂ progenies. *Chromosome Res.* 8: 119-125.
- Liu LQ and Gu ZJ (2011). Genomic *in situ* hybridization identifies genome donors of *Camellia reticulata* (Theaceae). *Plant Sci.* 180: 554-559.
- Marasek-Ciolakowska A, He H, Bijman P, Ramanna MS, et al. (2012). Assessment of intergenomic recombination through GISH analysis of F₁, BC₁ and BC₂ progenies of *Tulipa gesneriana* and *T. fosteriana*. *Plant Syst. Evol.* 298: 887-899.
- Marasek A, Hasterok R, Wiejacha K and Orlikowska T (2004). Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium*. *Hereditas* 140: 1-7.
- Matoba H, Soejima A and Hoshi Y (2007). Identification of parental genomes and genomic organization in *Aster microcephalus* var. *ovatus*. *J. Plant Res.* 120: 585-593.
- Moore G, Devos KM, Wang Z and Gale MD (1995). Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Curr. Biol.* 5: 737-739.
- Moraes AP and Guerra M (2010). Cytological differentiation between the two subgenomes of tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Syst. Evol.* 287: 113-118.
- Nakazawa D, Kishimoto T, Sato T, Saito T, et al. (2011). Genomic *in situ* hybridization (GISH) analysis of intergeneric hybrids in Colchicaceae. *Euphytica* 181: 197-202.
- Nishiyama K, Choi YA, Honsho C, Eiadthong W, et al. (2006). Application of genomic *in situ* hybridization for phylogenetic study between *Mangifera indica* L. and eight wild species of *Mangifera*. *Sci. Hort.* 110: 114-117.
- Pardue ML and Gall JG (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 64: 600-604.
- Parokony AS, Marshall JA, Bennett MD, Cocking EC, et al. (1997). Homoeologous pairing and recombination in backcross derivatives of tomato somatic hybrids [*Lycopersicon esculentum* (+) *L. peruvianum*]. *Theor. Appl. Genet.* 94: 713-723.
- Peñalosa APS and Pozzobon MT (2007). Caracterização Citogenética de Germoplasma Vegetal. In: Recursos Genéticos Vegetais (Nass LL, ed.). Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 308-342.
- Ran Y, Hammett KRW and Murray BG (2001). Hybrid identification in *Clivia* (Amaryllidaceae) using chromosome banding and genomic *in situ* hybridization. *Ann. Bot.* 87: 457-462.
- Schwarzacher T (2003). DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization. *Genome* 46: 953-962.
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD and Heslop-Harrison JS (1989). *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann. Bot.* 64: 315-324.
- Seijo G, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, et al. (2007). Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *Am. J. Bot.* 94: 1963-1971.
- Snowdon RJ, Köhler W, Friedt W and Köhler A (1997). Genomic *in situ* hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1320-1324.
- Soltis PS and Soltis DE (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 7051-7057.
- Souza LG, Crosa O, Speranza P and Guerra M (2012). Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Ann. Bot.* 109: 987-999.
- Stace CA and Bailey JP (1999). The Value of Genomic *in situ* Hybridization (GISH) in Plant Taxonomic and Evolutionary Studies. In: Molecular Systematics and Plant Evolution (Hollingsworth PM, Bateman RM and Gornall RJ, eds.). CRC Press, London, 199-210.
- Takahashi C, Marshall JA, Bennett MD and Leitch IJ (1999). Genomic relationships between maize and its wild relatives. *Genome* 42: 1201-1207.
- Tan GX, Xiong ZY, Jin HJ, Li G, et al. (2006). Characterization of interspecific hybrids between *Oryza sativa* L. and three wild rice species of China by genomic *in situ* hybridization. *Acta Bot. Sin.* 48: 1077-1083.
- Tang F, Chen F, Chen S, Wang XE, et al. (2010). Molecular cytogenetic identification and relationship of the artificial

- intergeneric hybrid between *Dendranthema indica* and *Crossostephium chinese* by GISH. *Plant Syst. Evol.* 289: 91-99.
- Tang F, Wang H, Chen S, Chen F, et al. (2011). Intergeneric hybridization between *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare*. *Sci. Hort.* 132: 1-6.
- Wang Y, Zhy H, Li W, Li H, et al. (2009). A novel genome of C and the first autotetraploid species in the *Setaria* genus identified by genomic *in situ* hybridization. *Genet. Res. Crop Evol.* 56: 843-850.
- Wendel JF (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* 42: 225-249.
- Xiong ZY, Tan GX, He GY, He GC, et al. (2006). Cytogenetic comparisons between A and G genomes in *Oryza* using genomic *in situ* hybridization. *Cell Res.* 16: 260-266.
- Yao XC, Ge XH, Chen JP and Li ZY (2010). Intra- and intergenomic relationships in interspecific hybrids between *Brassica* (*B. rapa*, *B. napus*) and a wild species *B. maurorum* as revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Euphytica* 173: 113-120.
- Zwierzykowski Z, Zwierzykowska E, Taciak M, Jones N, et al. (2008). Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* x *Lolium perenne* revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Chromosome Res.* 16: 575-585.

CAPÍTULO 2: Determinação do caráter híbrido da progênie F₁ do cruzamento *Passiflora gardneri* MAST. x *Passiflora gibertii* N.E. BROW com base em GISH e Cromossomos Marcadores

RESUMO

No gênero *Passiflora* há um grande interesse pela produção de híbridos com valor ornamental devido à beleza atribuída às características exóticas de suas flores. Em *Passiflora*, até então, a confirmação de paternidade de plantas híbridas tem sido feita com base em características morfológicas e, mais recentemente, com uso de marcadores moleculares RAPD e SSR. Nesse estudo, a citogenética clássica e molecular foi utilizada para verificar o caráter híbrido de plantas obtidas através do cruzamento *P. gardneri* x *P. gibertii*. Todos os genótipos analisados apresentaram o mesmo número cromossômico que as espécies genitoras, $2n = 18$. O bandamento CMA₃/DA/DAPI revelou que os blocos CMA₃⁺/DAPI foram restritos aos satélites. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda para sítios de DNAr 5S e 45S foi utilizada para confirmação de paternidade. Foram observados cromossomos marcadores com sítios 5S ou 45S, que foram selecionados com base em sua localização em cada genoma específico para análise dos híbridos F₁ obtidos do cruzamento *P. gardneri* x *P. gibertii*. A presença de cromossomos marcadores, que possuem sítios de DNAr característicos para cada genitor, foi a confirmação de que todas as plantas obtidas eram híbridos. A hibridização genômica *in situ* (GISH) também foi utilizada para a diferenciação dos genomas dos genitores nos genótipos híbridos. O DNA genômico do genitor paterno (*P. gibertii*) foi utilizado como sonda e o DNA genômico do genitor materno (*P. gardneri*) foi utilizado como DNA de bloqueio. Nas plantas híbridas com o uso de GISH foi possível diferenciar o genoma materno do genoma paterno com a utilização de DNA de bloqueio 100 vezes mais concentrado que a sonda.

Palavras-Chave: Bandamento CMA₃/DAPI, hibridização *in situ* fluorescente, hibridização genômica *in situ*, híbridos interespecíficos.

ABSTRACT

In the genus *Passiflora* there is great interest in producing hybrids with ornamental value due to the beauty ascribed exotic characteristics of their flowers. In *Passiflora*, confirming paternity of hybrid plants has been made based on morphological characteristics and, more recently, using molecular markers RAPD and SSR. In this study the classical and molecular cytogenetics was used to check the hybrid status of plants obtained by crossing *P. gardneri* x *P. gibertii*. All genotypes analyzed showed the same chromosome number that the progenitor species, $2n = 18$. The CMA₃/DA/DAPI banding revealed that CMA₃⁺/DAPI blocks were restricted to satellites. The fluorescent *in situ* hybridization (FISH) probe for sites of rDNA 5S and 45S was used to confirm paternity. Marker chromosomes with 5S and 45S sites, which were selected based on their location in each individual genome for analysis of F₁ hybrids produced by *P. gardneri* x *P. gibertii* were observed. The presence of marker chromosomes that have rDNA sites, characteristic for each parent, it was confirmed that all the plants obtained were hybrid. Genomic *in situ* hybridization (GISH) was also used to differentiate the genomes of parents in hybrid genotypes. Genomic DNA from the paternal parent (*P. gibertii*) was used as a probe and genomic DNA from the maternal parent (*P. gardneri*) was used as blocking DNA. In the hybrid plants using GISH was possible to distinguish the maternal genome of the parental genome using DNA block 100 times more concentrated than the probe.

Key-words: CMA₃/DAPI banding, fluorescente *in situ* hybridization, genomic *in situ* hybridization, interspecific hybrids.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* L. é o maior dentro da família Passifloraceae Juss, possuindo mais de 525 espécies (CERVI; IMIG, 2013), sendo o Brasil um importante centro de diversidade, com 137 espécies já reportadas (BERNACCI et al., 2013). No entanto, novas espécies continuam sendo descritas, como *Passiflora kikiana* Cervi & Linsingen (CERVI; LINSINGEN, 2010), *P. cristalina* Vanderpl. & Zappi (VANDERPLAN; ZAPPI, 2011), *P. cacao* Bernacci & M. M. Souza (BERNACCI; SOUZA, 2012) e *P. pottiae* Cervi & Imig (CERVI; IMIG, 2013). O gênero *Passiflora* destaca-se pelo interesse econômico encontrado em algumas espécies usadas para fins alimentícios, em que se destaca o maracujazeiro-azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.) (MELETTI et al., 2005), para fins medicinais (BARBOSA et al., 2008) e para o uso ornamental (VANDERPLANK, 2000; ABREU et al., 2009).

As passifloras são consideradas plantas ornamentais devido à beleza e características exóticas de suas flores (ABREU et al., 2009). No mercado de plantas ornamentais, além do uso de espécies, há um grande interesse pelos híbridos interespecíficos, devido à produção de plantas com características únicas. Muitas espécies de *Passiflora* podem ser hibridizadas sem dificuldades e o resultado do cruzamento entre duas espécies é uma progênie F₁ de fenótipo intermediário aos genitores (VANDERPLANK, 2000). O primeiro relato de híbridos de *Passiflora* surgiu em 1819, quando o inglês Thomas Milne, cruzou *P. caerulea* L. e *P. racemosa* Brot., obtendo o híbrido *P. 'Violacea'*, segundo a fórmula de hibridação descrita por Jean-Louis-Auguste-Loiseleur-Destongchamps, em 1928 (VANDERPLANK, 2000). A finalidade da obtenção desse híbrido ainda permanece obscura, no entanto, acredita-se que foi para ornamentação (ABREU et al., 2009). Desde então já foram produzidos mais de 400 híbridos, os quais estão registrados na Sociedade Internacional de *Passiflora* (<http://www.passiflorasociety.org>). Entre 2010 e 2011, foram registrados 21 novos híbridos (KING, 2011). A maioria dos híbridos obtidos possui flores exuberantes, fator essencial à ornamentação.

Espécies de *Passiflora* são bastante exploradas no mercado de plantas ornamentais na Europa, Estados Unidos e Japão (BERNACCI et al., 2013). No entanto, no Brasil o potencial da utilização de espécies de *Passiflora* como plantas ornamentais ainda permanece praticamente inexplorado, embora a localização do Brasil na zona tropical forneça as condições climáticas favoráveis para o seu cultivo (ABREU et al., 2009). Recentemente no Brasil, programas de melhoramento de *Passiflora* com propósito ornamental têm ganhado destaque, visando à produção de híbridos com características únicas, focando as condições

edafoclimáticas do país (FALEIRO et al., 2007a; 2007b; JUNQUEIRA et al., 2007; BELO, 2010; SANTOS et al., 2012;).

A identificação de híbridos pode ser realizada com base em diferentes técnicas, desde a que utiliza características morfológicas, a qual é simples e de baixo custo (OLIVEIRA et al., 2005), até as que utilizam marcadores moleculares, como RAPD, SSR, AFLP e ESTs (CZERNICKA et al., 2010). O uso de dados citogenéticos também tem oferecido excelentes resultados na análise de híbridos. O uso da citogenética convencional e molecular para esse propósito fornece uma ampla variedade de características cromossômicas (RAN et al., 2001). O uso de marcadores cromossômicos, em que cromossomos com padrões de bandas e marcações distintas são produzidas por Giemsa ou fluorocromos, consistem em boas ferramentas para a identificação de híbridos (MELO et al., 2001; MELO; GUERRA, 2003; ORTOLONI et al., 2007).

Técnicas citogenéticas moleculares são extremamente úteis para confirmação de paternidade de híbridos, tais como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), em que cromossomos específicos que possuem marcações podem ser úteis, a exemplo temos o uso de sondas de DNAr 5S e 45S. Os cromossomos que carregam sítios de DNAr podem ser usados como marcadores para identificação dos genomas das espécies genitoras em plantas híbridas. Outra técnica que tem sido amplamente usada para identificação de híbridos é a hibridização genômica *in situ* (GISH), que envolve o uso do DNA genômico total de uma espécie como sonda (STACE; BAILEY, 1999) e que permite a distinção de ambos os genomas das espécies genitoras em germoplasma híbrido (SILVA; SOUZA, 2013).

Até então, em *Passiflora*, a confirmação de hibridação tem sido realizada com base em características morfológicas e, mais recentemente, por marcadores moleculares, que consiste em uma metodologia mais confiável para confirmação de paternidade em plantas híbridas de maracujazeiro, como RAPD (JUNQUEIRA et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2011) e SSR (BELO, 2010; SANTOS et al., 2012). A utilização das técnicas de citogenética molecular FISH e GISH ainda não foram reportadas para a verificação de hibridações em *Passiflora*. Apenas a FISH tem sido empregada dentro do gênero, principalmente com o uso de sondas DNAr 5S e 45S para caracterizar algumas espécies (MELO; GUERRA, 2003) e híbridos somáticos (CUCO et al., 2005).

Este trabalho teve com objetivo utilizar técnicas de citogenética clássica e molecular para confirmar e caracterizar os híbridos F₁ resultantes do cruzamento entre *P. gardneri* e *P. gibertii*; como objetivos específicos: (i) caracterizar os cariotipos dos genitores e híbridos; (ii) identificar marcadores cromossômicos que permitam a distinção entre os cromossomos dos

genitores; (iii) confirmar a paternidade dos híbridos; (iv) distinguir cromossomos oriundos de cada genoma (paterno e materno) nos híbridos interespecíficos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As espécies *Passiflora gardneri* Mast. (acesso 247) e *Passiflora gibertii* N.E Brown (acesso 174), provenientes da Embrapa Cerrados, Brasília, e oito híbridos cuja progênie foi denominada HD15 (HD15-101, HD15-104, HD15-106, HD15-107, HD15-108, HD15-109, HD15-110, HD15-111) foram analisados. As espécies e os híbridos são mantidos no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Passifloras), localizado no Campus da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), no município de Ilhéus, Bahia (long 39 10"W, lat 14 39" – S, alt 78m).

2.2 Coleta e preparação das lâminas

Ápices de raízes com aproximadamente um centímetro foram coletados de estacas. As amostras foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina (8-HQ) a 0,002 M por 1 h em temperatura ambiente (TA) e mais 21 h a $\pm 8 -10$ °C. Após lavadas duas vezes em água destilada e fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético glacial [3:1], v/v; JOHANSEN, 1940) por 3 h em TA, as amostras foram mantidas a -20 °C por pelo menos 24 h ou até sua utilização. Para preparação das lâminas, os ápices de raízes foram lavados duas vezes em água destilada e incubados com 50 µl da solução enzimática celulase 2% e pectinase 20% (w/v) por 80 minutos a 37° C. A enzima foi retirada com o auxílio de micropipeta, e após lavadas em água destilada, foi adicionado 10 µl de ácido acético 45% sobre a raiz. Com o auxílio de agulhas e sob microscópio estereoscópico, as raízes foram maceradas, cobertas com uma lamínula e pressionadas firmemente entre papel de filtro, congeladas em nitrogênio líquido por cerca de 6 minutos para a retirada da lamínula, realizada com o auxílio de gilete, e secas ao ar. As lâminas com boas preparações metafásicas foram mantidas a -20 °C até a aplicação das técnicas citogenéticas.

2.3 Análise cariomorfológica

As lâminas foram coradas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), com modificações. As lâminas foram imersas em solução de Giemsa 2% (Merck[®]) por 20-30 min, lavadas rapidamente em água destilada e secas ao ar. Após a coloração, as lâminas foram montadas utilizando lamínulas 18 x 18 mm e meio Neomount[®] (Merck[®]). Cinco metáfases de cada genótipo foram analisadas para as seguintes características: número cromossômico, medidas do braço curto (BC), braço longo (BL) e satélites (SAT); tamanho cromossômico médio (χ), comprimento do lote diploide (CLD); índice de assimetria (TF%) (HUZIWARA, 1962) e heterogeneidade cariotípica (HC) (PASZKO, 2006). As metáfases foram fotografadas em microscópio de luz Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 e com *software* DP2-BSW. As mensurações foram realizadas utilizando o *software* Imagetool versão 3.0.

2.4 Análise com fluorocromos CMA₃/DA/DAPI

Para localização da heterocromatina rica em GC e AT foram usados os fluorocromos CMA₃ e DAPI, respectivamente, e distamicina (DA). As lâminas foram envelhecidas por três dias antes da coloração. A tripla coloração CMA₃/DA/DAPI seguiu o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), com modificação na concentração do CMA₃, que consistiu na aplicação de 15 μ l CMA₃ (0,25 mg/ml) sobre as lâminas por uma hora, depois lavadas com água destilada e secas. Posteriormente, foi aplicada 15 μ l de distamicina (0,1 mg/ml) por meia hora, lavadas com água destilada e secas e então foi aplicada em cada lâmina 15 μ l de DAPI (0,5 mg/ml) por meia hora. As lâminas foram lavadas com água destilada, secas, montadas com 15 μ l do meio de montagem glicerol/MacIlvaine (1:1 v/v) usando uma lamínula de 20 x 20 mm e envelhecidas por três dias antes da análise. As metáfases foram fotodocumentadas com a utilização do microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 com o *software* DP2-BSW. O CMA₃ foi detectado com o do filtro (excitação 360-390) e o DAPI foi detectado com filtro (excitação 430-470).

2.5 Extração do DNA genômico

Para os procedimentos de hibridização *in situ*, o DNA dos genitores foi extraído usando o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990), com modificações. Folhas jovens

foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido, condicionadas em tampão de extração CTAB 2% [NaCl a 1,5 M; EDTA a 20 mM; Tris-HCl a 100 mM; B-Mercaptoetanol a 0,2%]. O isolamento de ácidos nucleicos foi realizado com solução (24:1) clorofórmio: álcool isoamílico e a ressuspensão do DNA foi realizada com tampão TE [Tris a 10 mM; EDTA a 1 mM]. A inferência da concentração do DNA genômico extraído foi realizada através da comparação com 100 ng de DNA lambda em eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com SYBR safe (Invitrogen®).

2.6 Tratamento de lâminas para hibridização *in situ*

O tratamento das lâminas seguiu o protocolo para hibridização *in situ* fluorescente proposto por Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000) e Souza et al. (2010), com modificações. Lâminas contendo as preparações citológicas foram secas em estufa a 37 °C pelo tempo mínimo de 1 h. Após aplicação de 50 µl de RNase (Sigma) a 1 µg/mL em tampão 2xSSC (cloreto de sódio a 0,3 M, Sigma; citrato de sódio a 0,03 M, Sigma), as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37°C. As lâminas foram imersas em 2xSSC em TA duas vezes por 5 min cada; 50 µL de HCl a 10 mM foi adicionado sobre as metáfases por 5 min, e após retirada do HCl, foi adicionado 50 µL de pepsina (Sigma) [pepsina a 10 mg/mL; HCl a 10 mM (1:100 v/v)] e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 min a 37°C. As etapas de lavagens citadas a seguir foram realizadas em plataforma agitadora a 120 rpm (Biomixer, Mos-1). As lâminas foram lavadas em 2xSSC em TA duas vezes por 5 min cada, imersas em paraformaldeído a 4% em TA por 10 min, e novamente lavadas em 2xSSC duas vezes por 5 min cada. As preparações citológicas foram desidratadas em etanol 70% e etanol 96% por 5 min cada, para imediata aplicação das técnicas de hibridização *in situ*.

2.7 Preparo de sondas para hibridização *in situ*

Para hibridização genômica *in situ* (GISH), o DNA genômico total do genitor paterno, *P. gibertii*, foi usado como sonda e o DNA genômico total do genitor materno, *P. gardneri*, foi usado como DNA de bloqueio. Para a preparação do DNA de bloqueio e sua posterior utilização na aplicação da GISH, o DNA genômico do genitor masculino, *P. gibertii*, foi clivado com a utilização de três metodologias distintas, visando à obtenção de bandas preferencialmente entre 100 a 800 pb. A utilização do sonicador para a clivagem do DNA genômico resultou em melhor perfil de clivagem após a eletroforese em gel de agarose 2%. A

sonicação resultou na clivagem de fragmentos acima de 200 pb, mas com predominância de fragmentos entre a 200 a 1000 pb. A utilização de autoclave para a elaboração do DNA de bloqueio clivou o DNA genômico apenas em fragmentos menores que 200 pb, em contraste com a aplicação de choque térmico para a clivagem, o qual gerou grandes concentrações de fragmentos maiores que 1200 pb. Portanto para a preparação do DNA de bloqueio foi utilizado o método de clivagem do DNA genômico através de sonicação. Para a quebra do DNA de bloqueio, cerca de 20 µg de DNA genômico em um volume final de 200 µL foi clivado com o uso do sonicador (Qsonica, Q125) com a programação para a amplitude 40%, 2 segundos ligado e 2 segundos deligado, com o tempo total de 5 minutos (JAUHAR; PETERSON, 2006). A verificação do tamanho dos fragmentos clivados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% (Pronadisa) utilizando como parâmetro o marcador ladder 100 pb (NEB, new england biolabs). Após a clivagem do DNA genômico, foi realizada a purificação do DNA clivado pela precipitação com 2% do volume final de acetato de sódio a 3 M mais 200% do volume final de etanol P.A. A mistura foi estocada a -20 °C overnight e, após este período, centrifugado por 20 min a 14.000 rpm a 20°C para a eliminação do sobrenadante e posterior secagem em TA por no mínimo 1 hora. O pellet foi ressuscitado com Tris a 10 mM pH 8.0 com o volume necessário para concentração final de 1,1 µg/µL de DNA clivado. A marcação da sonda foi realizada por *Nick translation* com Biotina-16-dUTP (Roche Diagnostics®), concentração final de 1 µg de DNA clivado, seguindo o protocolo proposto pelo fabricante.

Para a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), clones pTa71 foram utilizados para a obtenção de sondas para sítios de DNAr 45S, as quais foram marcadas com biotina-16-dUTP (Roche Diagnostics®). As sondas para sítios de DNAr 5S foram obtidas a partir do produto da reação cadeia da polimerase (PCR) com o par de *primer* específico para *Passiflora* (5'-GTGCGATCATAACCAGRYTAATGCACCGG-3' e 5'-GAGGTGCAACACGAGGACTTCCCAGGAGG -3') (MELO; GUERRA, 2003) e marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche Diagnostics®). As sondas foram marcadas via *Nick translation*, com concentração final de 1 µg de DNA clivado, seguindo o protocolo proposto pelo fabricante.

2.8 Aplicação e análise de GISH e FISH

Após a secagem das lâminas em TA por 30 min, foi adicionada a mistura de hibridização com o volume final de 15µl, sendo formamida 50% (Sigma), dextran sulfato 10% (Sigma), 2xSSC, SDS 0,13% (*Sodium dodecyl sulfate*) (Bioagency) e a sonda. No

procedimento de GISH, foram utilizados 33 ng de sonda em quatro concentrações diferentes do DNA de bloqueio em relação à concentração da sonda genômica (33 ng): (a) 20x (660 ng); (b) 40x (1,36 µg); (c) 60x (1,98 µg); (d) 100x (3,3 µg) para realização dos testes. Nos quatro testes para adequação da sonda/DNA de bloqueio, a aplicação da técnica de GISH foi realizada no híbrido interespecífico F₁ HD15-101 (2n = 18). No procedimento de FISH, foram utilizados 50 ng da sonda 45S e 50 ng da sonda 5S. A mistura de hibridização foi aquecida a 75 °C por 10 min em termociclador (Eppendorf, Mastercycler) e transferida imediatamente para gelo pelo tempo mínimo de 5 min. As preparações citológicas contendo a mistura de hibridização foram desnaturadas em termociclador contendo um adaptador para lâminas (Techne, TC-412) a 75 °C por 10 min e incubadas overnight a 37 °C em câmara úmida. Após a hibridização, as lâminas foram imersas em 2xSSC em TA por 5 min para a remoção das lamínulas. Os banhos pós-hibridização a seguir foram realizados em banho Dubnoff (Quimis, 9226ML), a 42 °C, consistindo em duas imersões em 2xSSC por 5 min cada, duas em 0,1xSSC por 5 min cada, e mais duas imersões em 2xSSC por 5 min cada. As lâminas foram imersas em solução com 4xSSC/Tween 20 a 0,2% (Sigma) em TA por 5 min e tratadas com 50 µl de BSA (Sigma) a 5%. As sondas marcadas com biotina foram detectadas com 0,7 µl de avidina-FITC (Vector) mais 19,3 µL BSA 5% por lâmina. As sondas marcadas com rodamina foram detectadas com 0,7 µL anti-digoxigenina-rodamina (Roche) mais 19,3 µL de BSA 5% por lâmina. As lâminas contendo os anticorpos para a detecção foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37 °C. Para a remoção do excesso de anticorpo, foram realizados três banhos por 5 min cada com 4xSSC/Tween 20 a 0,2% em TA. As lâminas foram brevemente imersas em 2xSSC e as preparações citológicas foram simultaneamente montadas e contracoradas com meio DAPI/Vectashield[®] (H-1200). As lâminas foram estocadas a ± 8 - 10 °C até análise.

As metáfases foram fotodocumentadas com a utilização do microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 com o *software* DP2-BSW. As hibridizações detectadas com avidina-FITC foram visualizadas com o uso do filtro U-MWB (excitação 450-480 nm) e as hibridizações detectadas com anti-digoxigenina-rodamina foram visualizadas com o uso do filtro U-MWG (excitação 510-550 nm). As confecções de pranchas, kariogramas e sobreposições FITC/DAPI e FITC/RODAMINA/DAPI foram realizadas com o uso do *software* photoshop SC5.

3. RESULTADOS

3.1 Análise cariomorfológica

As espécies genitoras, *P. gardneri* e *P. gibertii*, e os oito híbridos interespecíficos HD15 analisados apresentaram $2n = 18$, não havendo alteração no número cromossômico (Tabela 1; Figura 1). Por coloração convencional, não foi possível realizar o pareamento dos cromossomos homeólogos, uma vez que os comprimentos de muitos cromossomos são similares, não havendo variação cariotípica suficiente entre os genitores ou dentro de genótipo para a identificação acurada, como presença de satélites ou posição de centrômeros diferenciada entre pares. Dessa forma, a identificação dos pares cromossômicos foi dificultada, e por isso o lote haploide não foi considerado para medições. A visualização de satélites também foi dificultada utilizando a coloração convencional (Giemsa 2%). Apenas poucos satélites puderam ser visualizados nos genitores e nos híbridos, mas não em todas as metáfases de cada genótipo analisado.

Os valores para comprimento cromossômico médio (χ), comprimento do lote diploide (CLD) e índice de assimetria (TF%) são apresentados na Tabela 1. Foi verificada diferença no CLD entre as espécies genitoras de apenas 11,91 %. Os híbridos analisados apresentaram os valores para χ e CLD intermediários aos genitores. O híbrido HD15-107 apresentou os valores para χ e CLD mais próximos do genitor paterno, *P. gibertii*, enquanto o híbrido HD15-109 apresentou valores mais próximos do genitor materno, *P. gardneri* (Tabela 1).

O índice de assimetria (TF%) proposto por Huziwara (1962) demonstrou que todos os cariótipos, tanto dos genitores quanto dos híbridos, foram simétricos. Dentre os híbridos, os genótipos HD15-101 e HD15-104 apresentaram os menores índices de assimetria cariotípica (Tabela 1), indicando que esses dois genótipos são mais derivados.

Tabela 1. Características cariotípicas dos genitores *Passiflora gardneri* Mast. e *P. gibertii* N. E. Brown e híbridos interespecíficos F₁ da progênie HD15

| Genótipos | 2n | χ (μm) | CLD | TF% |
|----------------------------|----|--------------------------|-------|-------|
| <i>Passiflora gadneri</i> | 18 | 3,31 | 58,40 | 43,48 |
| <i>Passiflora gibertii</i> | 18 | 2,86 | 51,40 | 43,39 |
| HD15-101 | 18 | 3,10 | 55,85 | 42,60 |
| HD15-104 | 18 | 2,97 | 53,51 | 42,66 |
| HD15-106 | 18 | 3,10 | 55,82 | 44,12 |
| HD15-107 | 18 | 2,89 | 52,02 | 43,49 |
| HD15-108 | 18 | 3,09 | 55,61 | 44,10 |
| HD15-109 | 18 | 3,21 | 57,70 | 43,73 |
| HD15-110 | 18 | 3,15 | 56,73 | 43,95 |
| HD15-111 | 18 | 3,01 | 54,26 | 44,35 |

χ = tamanho cromossômico médio; CLD = comprimento do lote diploide; TF% = índice de assimetria (Huziwara, 1962).

A análise da heterogeneidade cariotípica (HC) realizada utilizando a dispersão dos parâmetros que avaliam as variações inter cromossômicas quanto ao comprimento cromossômico (CV_{CL}) e à posição do centrômero (CV_{CI}) agruparam todos os híbridos próximos do genitor materno (Figura 2).

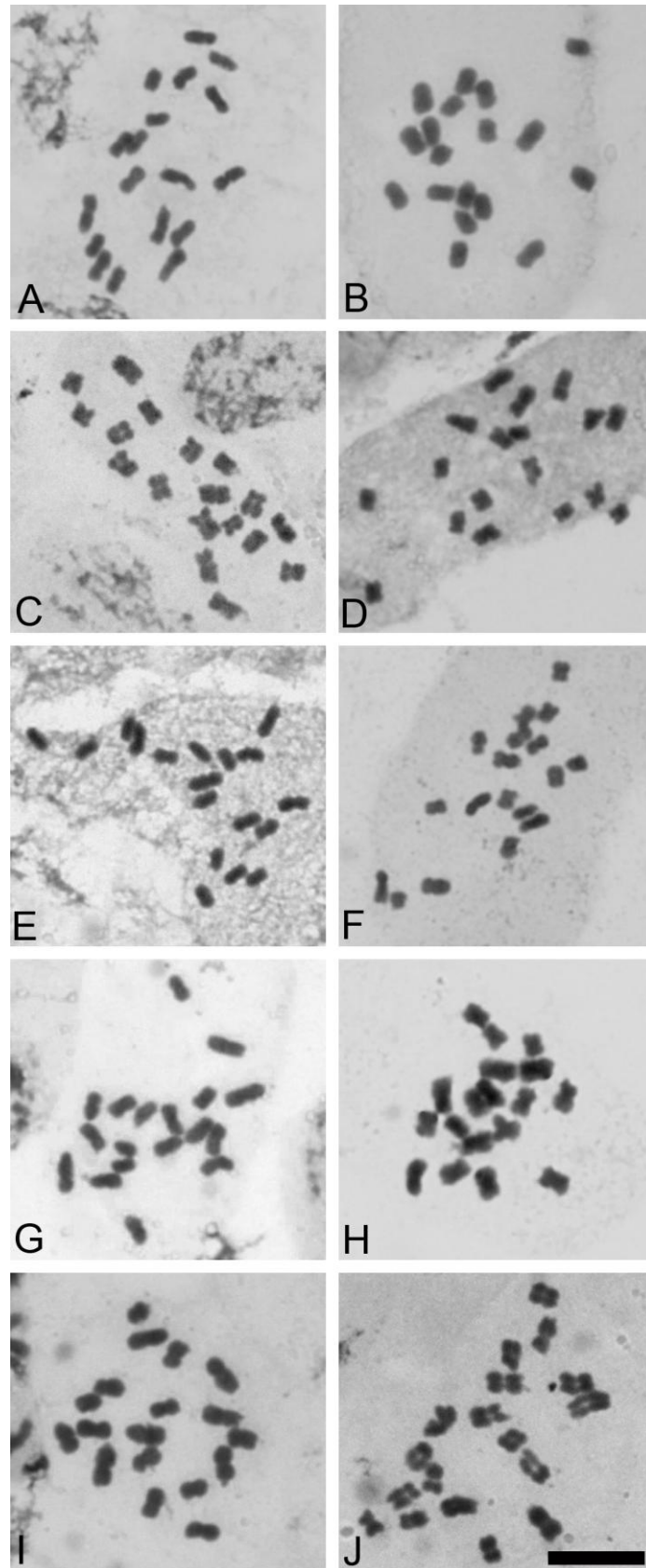


Figura 1. Metáfases mitóticas em genitores e híbridos interespecíficos F_1 de *Passiflora* corados com Giemsa ($2n = 18$). (A) *P. gardneri* Mast., (B) *P. giberti* N. E. Brown, (C) HD15-101, (D) HD15-104, (E) HD15-106, (F) HD15-107, (G) HD15-108, (H) HD15-109, (I) HD15-110, (J) HD15-111. Barra = 10 μm .

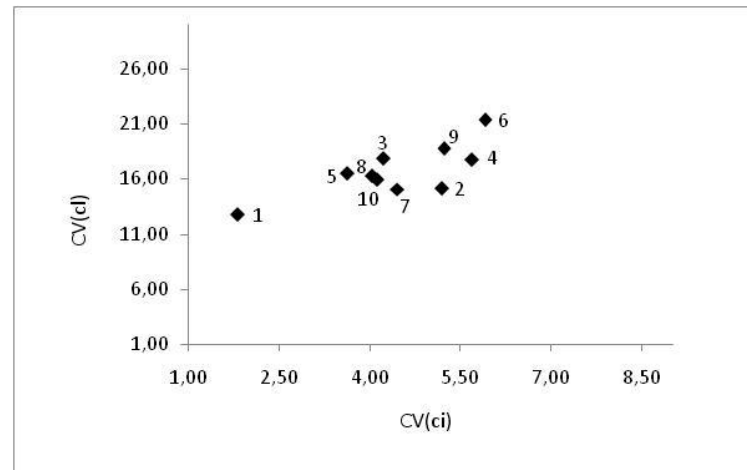


Figura 2. Análise da heterogeneidade cariotípica usando (CV_{cl}) e CV_{ci} em espécies genitoras e híbridos interespecíficos F_1 de *Passiflora*. 1 = *P. gibertii* Mast.; 2 = *P. gardneri* N. E. Brown; 3 = HD15-101; 4 = HD15-104; 5 = HD15-106; 6 = HD15-107; 7 = HD15-108; 8 = HD15-109; 9 = HD15-110; 10 = HD15-111.

3.2 Bandamento CMA₃/DA/DAPI

O bandamento CMA₃/DAPI permitiu a observação de satélites não visualizados pela coloração convencional (Giemsa 2%). Não foram observados blocos DAPI⁺, sendo apenas visualizados blocos CMA₃⁺/DAPI relacionados aos satélites (Figuras 3 e 4). A relação entre os blocos CMA₃⁺/DAPI terminais e satélites possibilitaram à confirmação do número de satélites em ambas as espécies genitoras. No genitor paterno, *P. gibertii*, foram observados cinco blocos CMA₃⁺/DAPI e no genitor materno, *P. gardneri*, foram observados seis blocos (Tabela 2). Nos oito híbridos analisados também foi possível observar os blocos CMA₃⁺, confirmando o número de satélites (Tabela 2).

Tabela 2. Dados cariotípicos com base em bandamento CMA₃ e FISH (DNAr 45S e 5S) dos genitores ($2n = 18$) *Passiflora gardneri* Mast. e *P. gibertii* N. E. Brown e híbridos interespecíficos F_1 da progênie HD15 ($2n = 18$)

| Genótipos | CMA ₃ ⁺ | DNAr 45S | DNAr 5S |
|--------------------|-------------------------------|------------|------------|
| <i>P. gardneri</i> | 6 | 6 | 4 |
| <i>P. gibertii</i> | 5 | 5 | 2 |
| HD15-101 | 5 | 5 (3M; 2P) | 3 (2M; 1P) |
| HD15-104 | 5 | 5 (3M; 2P) | 3 (2M; 1P) |
| HD15-106 | 6 | 6 (3M; 3P) | 3 (2M; 1P) |
| HD15-107 | 5 | 5 (3M; 2P) | 3 (2M; 1P) |
| HD15-108 | 5 | 5 (3M; 2P) | 3 (2M; 1P) |
| HD15-109 | 6 | 6 (3M; 3P) | 3 (2M; 1P) |
| HD15-110 | 5 | 5 (3M; 2P) | 3 (2M; 1P) |
| HD15-111 | 5 | 5 (3M; 2P) | 3 (2M; 1P) |

(CMA₃⁺) número de blocos CMA₃; (DNAr 45S) número de sítios 45S; (DNAr 5S) número de sítios 5S; (M) sítio de origem materna; (P) sítio de origem paterna.

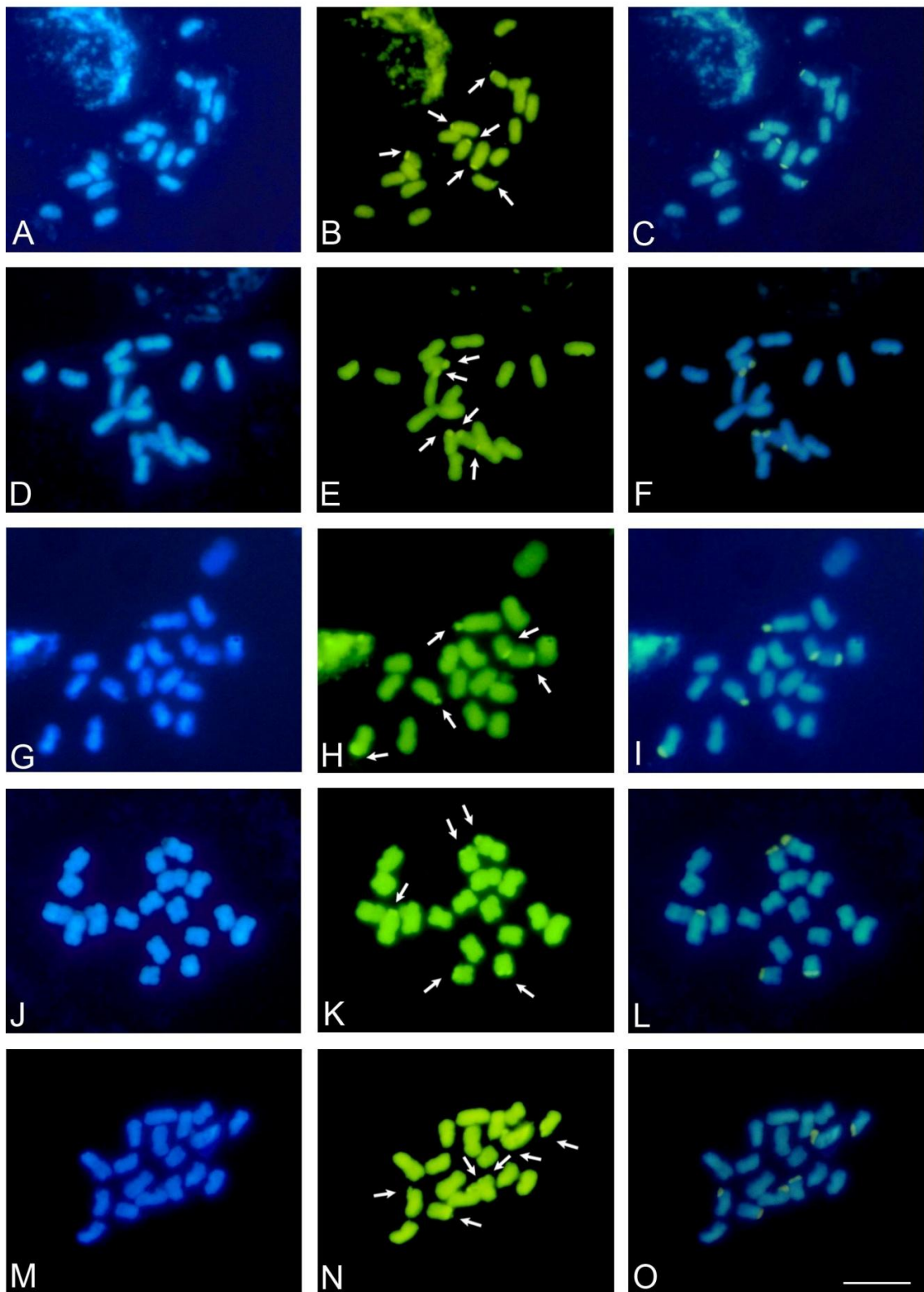


Figura 3. Bandamento CMA₃/DA/DAPI em metáfases mitóticas de espécies genitoras e híbridos interespecíficos F₁ de *Passiflora* corados com DAPI (A, D, G, J, M), CMA₃ (B, E, H, K, N) e sobreposição CMA₃/DAPI (C, F, I, L, O). A-C *P. gardneri* Mast., D-F *P. gibertii* N. E. Brown, G-I HD115-101, J-L HD15-104, M-O HD15-106. As setas indicam os blocos CMA₃⁺. Barra = 10 μm.

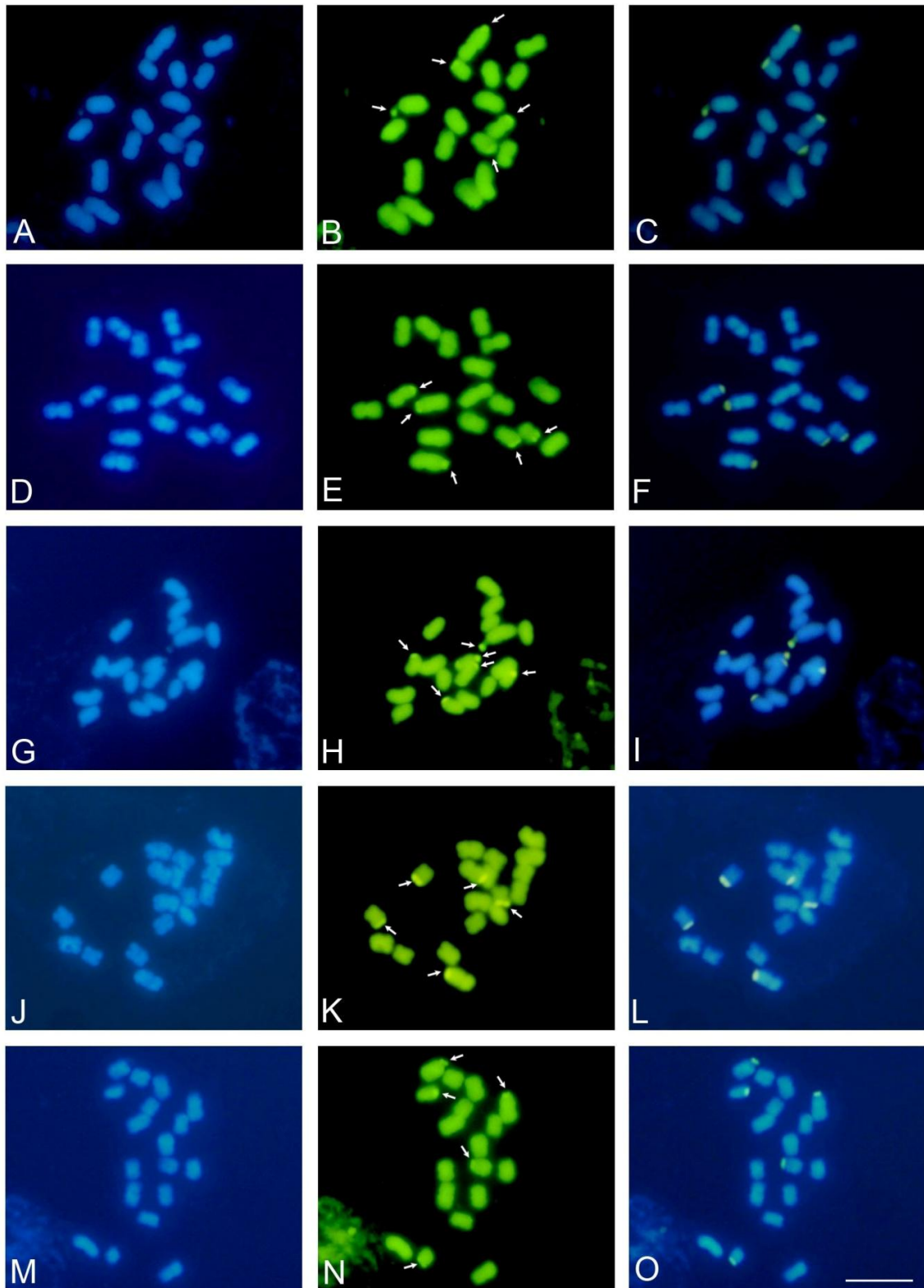


Figura 4. Bandamento CMA₃/DA/DAPI em metáfases mitóticas de híbridos interespecíficos F₁ de *Passiflora* (*P. gardneri* x *P. gibertii*) corados com DAPI (A, D, G, J, M), CMA₃ (B, E, H, K, N) e sobreposição CMA₃/DAPI (C, F, I, L, O). A-C HD15-107, D-F HD15-108, G-I HD115-109, J-L HD15-110, M-O HD15-111. As setas indicam os blocos CMA₃⁺. Barra = 10 μm.

3.3 FISH com uso de sondas DNAr 45S e 5S

As espécies genitoras, *P. gardneri* e *P. gibertii*, e oito híbridos interespecíficos F₁ foram mapeados para os sítios de DNAr 45S e 5S (Figuras 5 a 7). O número de sítios de DNAr 45S e 5S e sua origem (genitor paterno ou materno) são apresentados na Tabela 2.

A identificação dos cromossomos no cariótipo dos genitores foi realizada com o uso de letras e números. Os pares foram ordenados pelo tamanho em ordem decrescente, onde para o genitor *P. gardneri* os cromossomos foram denominados de 1A a 9I para os pares cromossômicos de 1 a 9. Já para o genitor *P. gibertii* a denominação cariotípica foi realizada seguindo a adoção na nomenclatura 1a a 9i, sequencialmente para os pares cromossômicos de 1 a 9. A denominação cariotípica nos genótipos híbridos foi realizada através da identificação dos cromossomos marcadores dos genitores, dotados de sítios de hibridização de DNAr 45S e 5S, os quais segregaram nos híbridos HD15. Neste sentido, os pares cromossômicos 1A, 4D e 7G do genitor *P. gardneri* apresentaram os sítios de DNAr 45S, enquanto que os pares cromossômicos 5E e 9I apresentaram os sítios de DNAr 5S. Já em *P. gibertii* os pares cromossômicos 2b, 7g e 9i apresentaram sítios de DNAr 45S e o par 5e apresentou sítios de DNAr 5S (Figura 6).

A interpretação dos cariótipos dos genótipos híbridos não foi realizada apenas como base no tamanho cromossômico, uma vez que o genitor *P. gardneri* apresenta cromossomos maiores que o genitor *P. gibertii*, dificultando a identificação dos cromossomos, de ambos os genomas. Neste caso, os cariogramas dos híbridos HD15 foram elaborados seguindo o agrupamento de cromossomos homeólogos para 45S e 5S. Desta forma, a disposição dos cromossomos não obedece à ordem decrescente. Para os demais cromossomos o posicionamento seguiu a ordem de tamanho decrescente.

Em *P. gardneri* foram observados três pares cromossômicos com sítios de DNAr 45S e dois pares com sítios de DNAr 5S (Figuras 5A e 6A). Um sítio DNAr 45S foi localizado na constrição secundária do braço longo do maior cromossomo (1A), próximo da região terminal. Um segundo sítio foi observado na constrição secundária do braço longo do cromossomo 4D e um terceiro sítio foi observado na constrição secundária do braço curto do cromossomo 7G, ambos na região terminal. Quanto aos sítios de DNAr 5S, um sítio foi observado na região pericentromérica do cromossomo 5E e um outro sítio foi localizado na região terminal do braço curto do menor par cromossômico (9I).

Em *P. gibertii* (Figuras 5B e 6B) três pares cromossômicos com sítios de DNAr 45S e um par cromossômico com sítio de DNAr 5S foram observados. No par cromossômico 2b foi

observado a presença de um sítio de DNAr 45S na constrição secundária do braço curto, perto da região terminal, sendo esse par heteromórfico, com apenas um homólogo portando o sítio de DNAr 45S. Os demais sítios foram observados na constrição secundária do braço curto dos cromossomos 7f e 9i. O único sítio de DNAr 5S foi observado próximo da região terminal do braço longo do cromossomo 5e.

A FISH realizada simultaneamente com as sondas DNAr 5S e DNAr 45 forneceu cromossomos marcadores para identificação do caráter híbrido dos indivíduos analisados. No entanto, uma quantidade maior desses marcadores foi encontrada para identificar o genoma materno (*P. gardneri*) em relação ao genoma paterno (*P. gibertii*), em que um número relativamente baixo de cromossomos marcadores carregando sítios de DNAr foi encontrado. Apenas os cromossomos portando os sítios DNAr 5S (par 5e) se apresentou como marcador confiável para identificação do genoma paterno. No entanto, o cromossomo 9i pode ser usado como um marcador secundário.

Nos cariogramas dos oito híbridos analisados foram numerados e nomeados apenas os cromossomos marcadores, portando os sítios de DNAr 5S e 45S para facilitar a identificação (figuras 6C-J). Desses, alguns foram escolhidos como marcadores para verificação do caráter híbrido das plantas analisadas. Para o genoma paterno, *P. gardneri*, o cromossomo 1A, que possui um sítio de DNAr 45S no braço longo, foi escolhido como o marcador primário para identificação desse genoma nos híbridos, pois em *P. gibertii* não foi encontrado nenhum sinal de hibridização nesse cromossomo. Além disso, apenas *P. gardneri* possui sítio de DNAr 45S no braço longo de seus cromossomos. Arelado a isso, o fato do cromossomo 1A ser maior lhe confere características únicas, o que impede que esse cromossomo seja confundido com os demais. O par cromossômico 4D também pode ser usado como marcador, pois possui um sítio de DNAr 45S no braço longo, característica exclusiva de *P. gardneri*. Dessa mesma forma, o par cromossômico 5E, que é o único par que possui um sítio de DNAr 5S na região pericentromérica consiste em um ótimo marcador, pois possui essa característica única e excludente. O par cromossômico 9I, que também possui um sítio de DNAr 5S no braço curto, pode igualmente ser usado como marcador, pois o único par cromossômico que possui sítio de DNAr 5S no genitor paterno, *P. gibertii*, está localizado no braço longo.

Para o genitor paterno, *P. gibertii*, o par cromossômico 5e foi utilizado como marcador primário, possuindo um sítio de DNAr 5S na região terminal no braço longo, o que confere características únicas para esse par cromossômico e com isso consiste em marcador eficiente e seguro para identificação do genoma paterno nas plantas híbridas. O par cromossômico 9i que apresenta um sítio de DNAr 45S na região terminal do braço curto pode ser usado como um

marcador secundário, consistindo no menor cromossomo nos híbridos. Os demais cromossomos que possuem sítios de DNAr não podem ser usados de maneira segura como marcadores, pois possuem sinais de marcações e tamanhos muito similares, o que dificulta o seu uso para o propósito de identificação genômica.

Os oitos indivíduos híbridos analisados apresentaram cromossomos com sítios de DNAr 45S e 5S em posições características para cada genoma doador, o que confirma que todas as plantas testadas são híbridas. Nos híbridos HD15-101, HD15-104, HD15-107, HD15-108, HD15-110 e HD15-111 foram observados claramente cinco sítios de DNAr 45S e três sítios de DNAr 5S; nos híbridos HD15-106 e HD15-109 foram observados seis sítios de DNAr 45S e três sítios de DNAr 5S (Tabela 2). Em todos os casos, o caráter híbrido das plantas testadas foi confirmado com a presença de cromossomos marcadores.

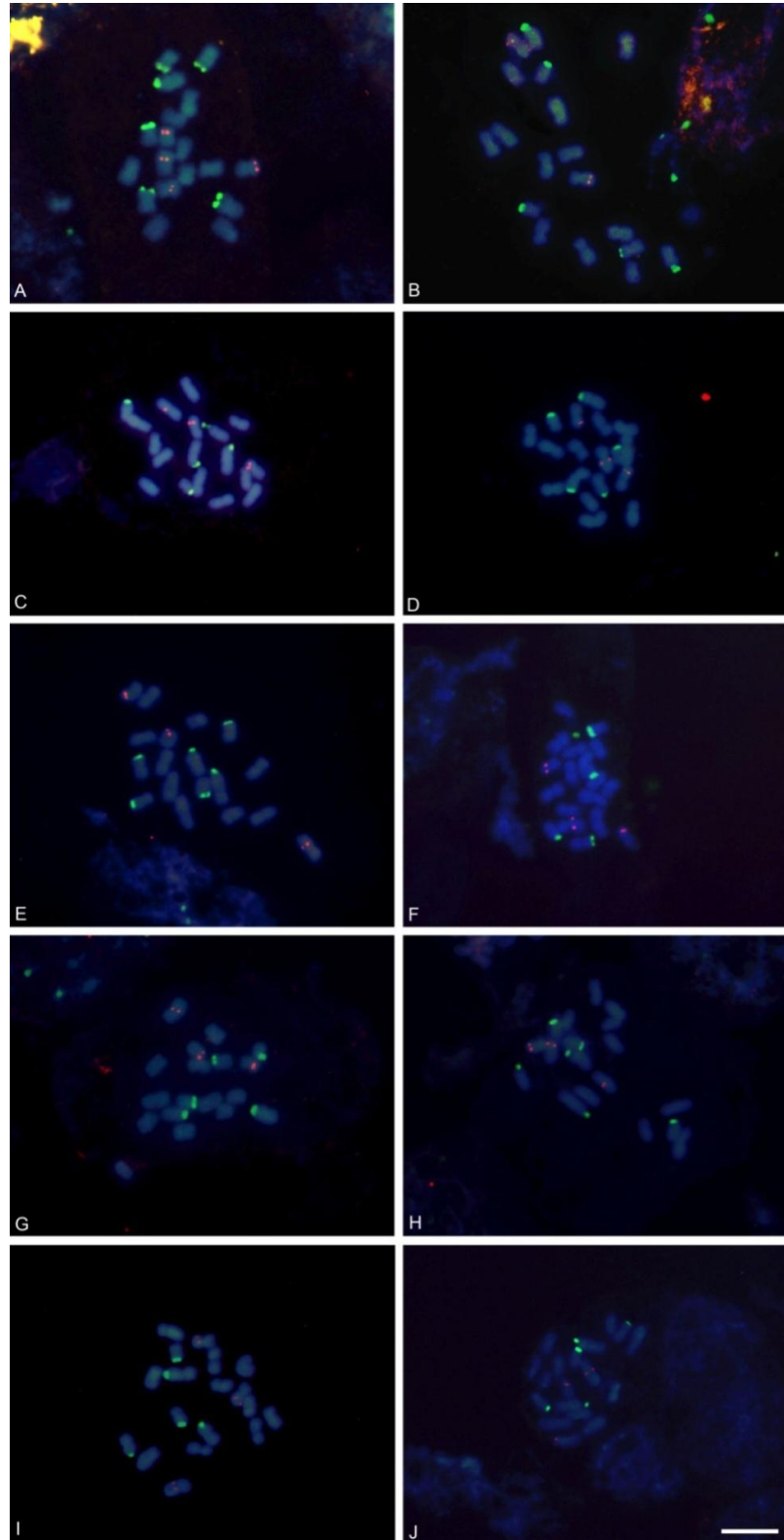


Figura 5. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 5S e 45S em metáfases mitóticas de genitores e híbridos interespecíficos F₁ de *Passiflora*. (A) *P. gardneri* Mast., (B) *P. gibertii* N. E. Brown, (C) HD15-101, (D) HD15-104, (E) HD15-106, (F) HD15-107, (G) HD15-108, (H) HD15-109, (I) HD15-110, (J) HD15-111. Os híbridos HD15-101, HD15-104, HD15-107, HD15-108, HD15-110, HD15-111 possuem cinco sítios de DNAr 45S e três sítios de DNAr 5S; os híbridos HD15-106 e HD15-109 possuem seis sítios de DNAr 45S e três sítios de DNAr 5S. Barra = 10 µm.

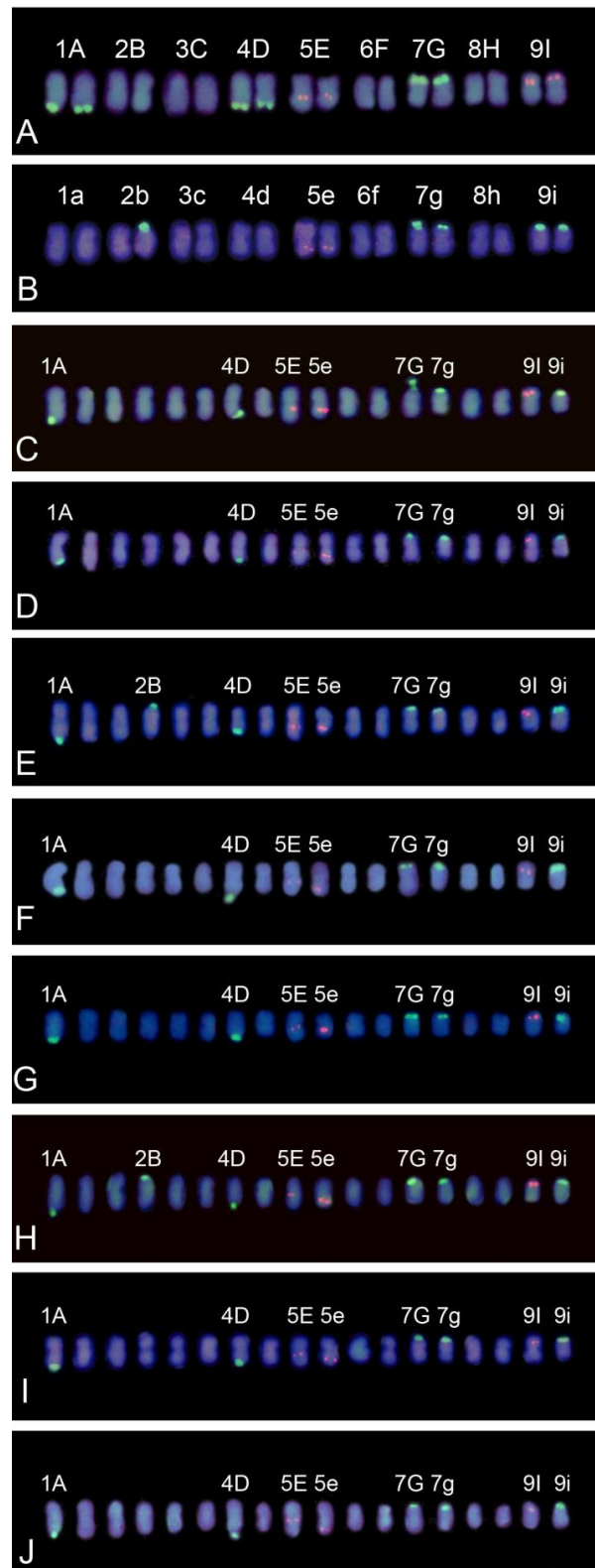


Figura 6. Cariogramas das metáfases mitóticas com sondas de DNAr 5S e 45S em genitores e híbridos interespecíficos F_1 de *Passiflora*. (A) *P. gardneri* Mast., (B) *P. gibertii* N. E. Brown, (C) HD15-101, (D) HD15-104, (E) HD15-106, (F) HD15-107, (G) HD15-108, (H) HD15-109, (I) HD15-110, (J) HD15-111. As letras e números nos genitores indicam os pares cromossômicos. As letras e números nos híbridos indicam os cromossomos com os sítios de DNAr 45S e 5S. Barra 10 μ m.



Figura 7. Ideogramas indicando as bandas CMA₃ e sítios de DNAr 5S e 45S (FISH) em metáfases mitóticas de genitores e híbridos interespecíficos F₁ de *Passiflora*: (A) *P. gardneri* Mast., (B) *P. gibertii* N. E. Brown, (C) HD15-101, (D) HD15-104, (E) HD15-106, (F) HD15-107, (G) HD15-108, (H) HD15-109, (I) HD15-110, (J) HD15-111. Barra = 5 μm.

3.4 GISH

Esse é o primeiro trabalho relatando a aplicação de GISH no gênero *Passiflora*, por isso foi necessário aperfeiçoar a técnica, adequando a concentração do DNA de bloqueio em relação à sonda para a distinção dos genomas (Tabela 3).

Tabela 3. Condições experimentais de GISH para adequação da sonda/DNA de bloqueio no híbrido interespecífico F₁ HD15-101 de *Passiflora*

| Experimento | Concentração da sonda | DNA de bloqueio | Marcação obtida |
|-------------|-----------------------|------------------|------------------------|
| 1 | 33 ng/μl | (660 ng/μl) 20x | Sem diferenciação |
| 2 | 33 ng/μl | (1,36 μg/μl) 40x | Sem diferenciação |
| 3 | 33 ng/μl | (1,98 μg/μl) 60x | Diferenciação parcial |
| 4 | 33 ng/μl | (3,3 μg/μl) 100x | Diferenciação completa |

Nos quatro testes para adequação da sonda/DNA de bloqueio (Tabela 3), a aplicação da técnica de GISH foi realizada no híbrido interespecífico F₁ HD15-101 ($2n = 18$). A utilização do DNA de bloqueio 20 vezes mais concentrado que a sonda genômica do genitor paterno, não permitiu a diferenciação dos genomas devido à forte ocorrência de hibridização cruzada, em que a sonda hibridizou tanto no genoma de interesse quanto no genoma do outro genitor, impossibilitando a distinção do genoma alvo (Figura 8A). A utilização do DNA de bloqueio 40 vezes mais concentrado possibilitou a visualização de cromossomos hibridizados, conferindo ao genoma alvo o brilho característico da fluorescência FITC, entretanto a forte ocorrência de hibridização cruzada no genoma não alvo indicou a necessidade da utilização de DNA de bloqueio em maiores concentrações (Figura 8B).

A aplicação da GISH com utilização do DNA de bloqueio 60 vezes mais concentrado já permitiu a visualização de cromossomos de *P. gibertii*, genoma alvo, fortemente hibridizado com a sonda, no entanto, a hibridização cruzada no genoma não alvo ainda não permitia distinção segura do genoma paterno (Figura 8C). A utilização do DNA de bloqueio 100 vezes mais concentrado que a sonda demonstrou no híbrido HD15-101 a presença de nove cromossomos fortemente hibridizados, representando o genoma de *P. gibertii* na constituição genômica do híbrido. Os nove cromossomos do genitor materno, *P. gardneri*, (contracolorados com DAPI), cujo DNA foi utilizado como DNA de bloqueio (Figura 8D), apresentou ausência de sinais de hibridização, ou um baixo nível de hibridização cruzada, demonstrando que a utilização do DNA de bloqueio na concentração de 100X possibilitou a diferenciação segura dos genomas dos genitores no genótipo HD15-101.

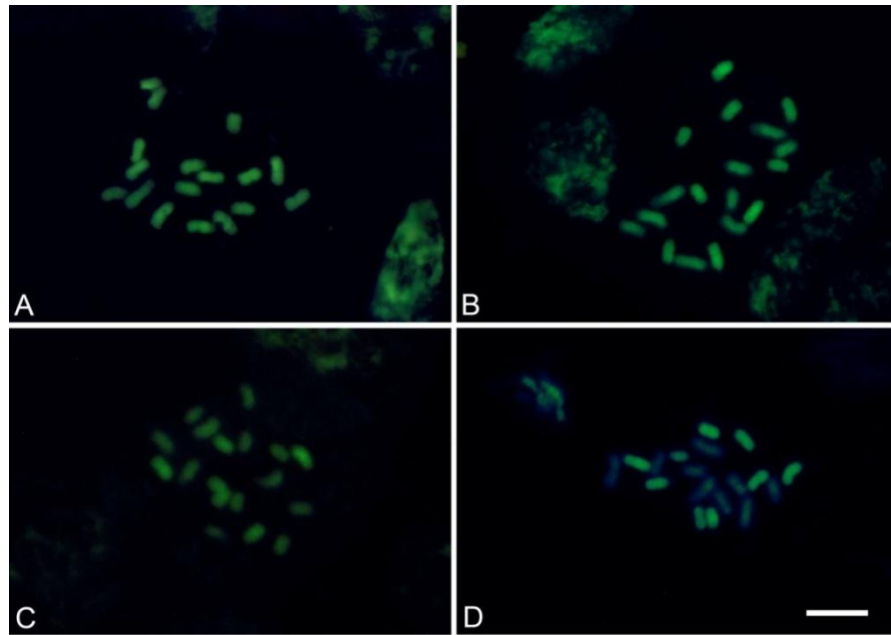


Figura 8. Hibridização genômica *in situ* (GISH) em metáfases mitóticas do híbrido interespecífico F₁ HD15-101 de *Passiflora* (*P. gardneri* x *P. gibertii*) utilizando diferentes concentrações de DNA de bloqueio: (A) 20X, (B) 40X, (C) 60X e (D) 100X. Barra = 10 μ m.

A GISH permitiu distinguir o conjunto cromossômico de cada genitor nos híbridos analisados. Em cada híbrido, nove cromossomos do genitor paterno marcaram uniformemente de verde (FITC) ao longo de todo o cromossomo, permanecendo os nove cromossomos de origem materna sem marcação ou com um nível muito baixo de hibridização cruzada com a sonda (contracorados com DAPI). As plantas híbridas assim como os genitores, provaram serem indivíduos diploides com $2n = 18$ cromossomos. A GISH permitiu a comprovação do caráter híbrido em todas as plantas F₁ analisadas (Figuras 9 e 10).

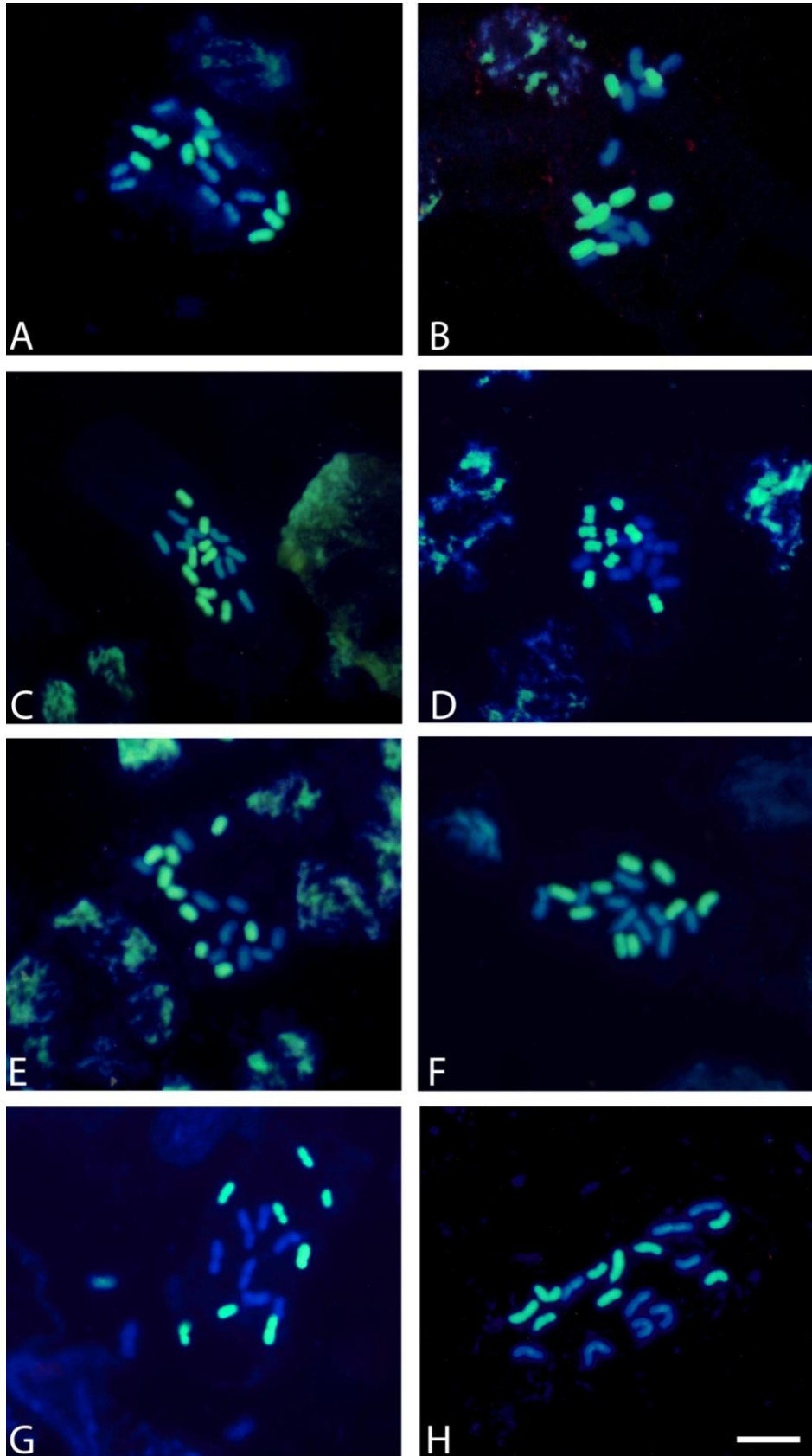


Figura 9. Hibridização genômica *in situ* (GISH) em metáfases mitóticas de híbridos interespecíficos F₁ de *Passiflora* (*P. gardneri* x *P. gibertii*): (A) HD15-101, (B) HD15-104, (C) HD15-106, (D) HD15-107, (E) HD15-108, (F) HD15-109, (G) HD15-110 e (H) HD15-111. Barra = 10 μ m.

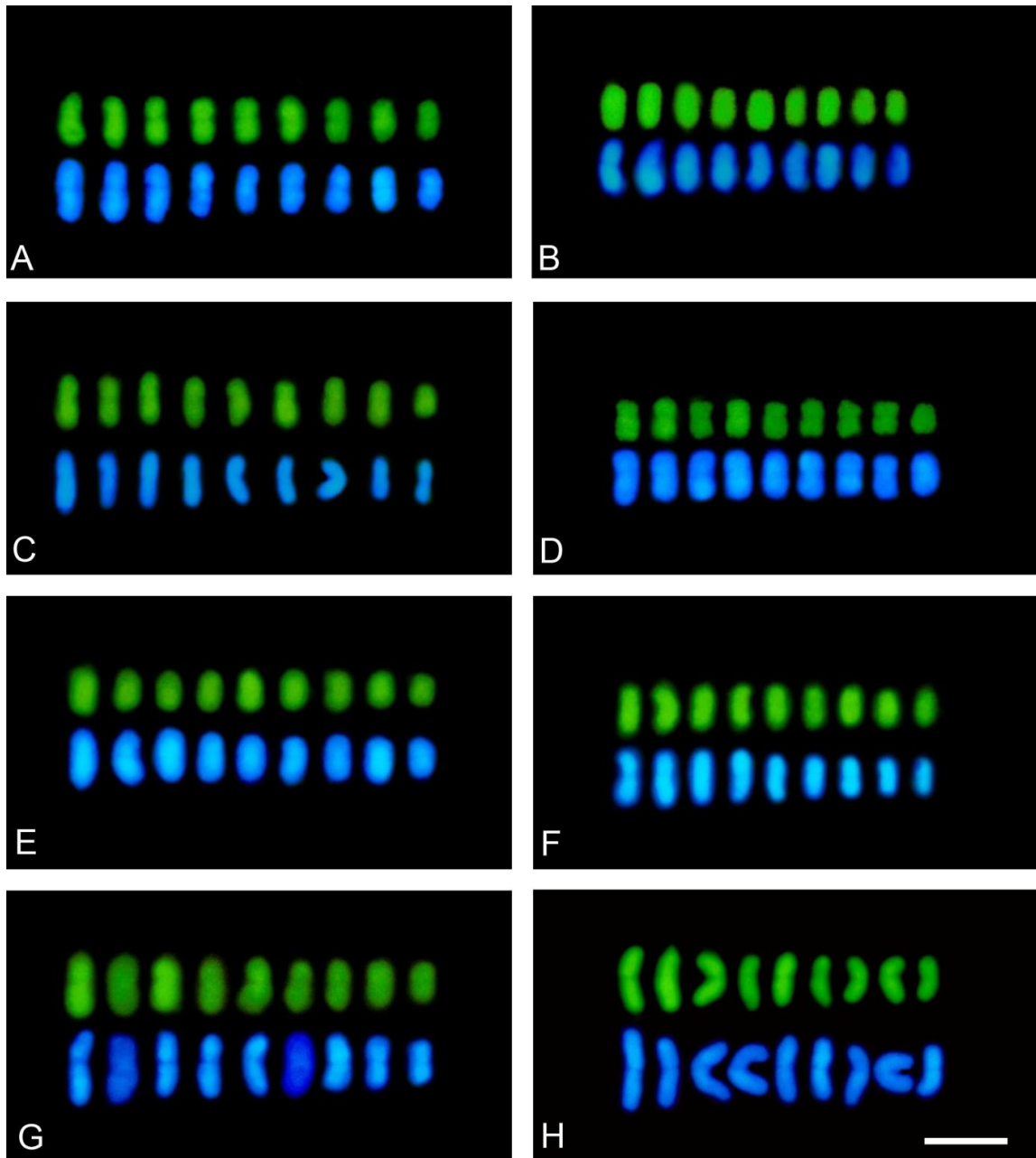


Figura 10. Cariogramas de metáfases mitóticas com hibridização genômica *in situ* (GISH) em híbridos interespecíficos F_1 ($2n = 18$) de *Passiflora* (*P. gardneri* x *P. gibertii*), mostrando nove cromossomos de origem paterna (verde; cromossomos menores) e nove de origem materna (azul; cromossomos maiores): (A) HD15-101, (B) HD15-104, (C) HD15-106, (D) HD15-107, (E) HD15-108, (F) HD15-109, (G) HD15-110 e (H) HD15-111. Barra = 10 μ m.

4. DISCUSSÃO

A progênie de híbridos F_1 obtidos do cruzamento *P. gardneri* x *P. gibertii* apresentaram o mesmo número cromossômico ($2n = 18$) que as espécies genitoras. Em *Passiflora*, os vários híbridos interespecíficos produzidos artificialmente tendem a apresentar o mesmo número cromossômico que as espécies genitoras, no entanto, híbridos com

alterações cromossômicas numéricas já foram reportados dentro do gênero (SANTOS et al., 2012). Em um levantamento feito em 2005, foi verificado que, para a maioria das espécies de *Passiflora*, a caracterização cariotípica se restringe basicamente à contagem do número cromossômico (SOARES-SCOTT et al., 2005). Provavelmente a falta de dados cariomorfológicos para a grande quantidade de espécies e híbridos produzidos no gênero ocorre devido à similaridade cariotípica, uma vez que os cariótipos dentro do gênero *Passiflora* tendem a ser similares (SOUZA et al., 2008).

Nesse estudo, tanto as espécies genitoras quanto os híbridos apresentaram cariótipos similares, com o conjunto de cromossomos apresentando comprimento decrescente gradual, discreto, como ocorre para a maioria das espécies de *Passiflora* já analisadas (MELO et al., 2001; SOUZA et al., 2003; VIEIRA et al., 2004). Os híbridos apresentaram características caritótípicas intermediárias às espécies genitoras. Híbridos obtidos do cruzamento entre *P. edulis* Sims e *P. setacea* D. C. também apresentaram variáveis cariotípicas intermediárias aos genitores (SOARES-SCOTT, 1998). O cálculo do índice de assimetria cromossômica revelou que as espécies e os híbridos apresentaram cariótipos simétricos, o que sugere um caráter primitivo (STEBBINS, 1971). Geralmente as espécies com $n = 9$ pertencentes ao gênero *Passiflora* tendem a apresentar cariótipo simétrico (MELO et al., 2001; MELO; GUERRA, 2003).

O diagrama de dispersão agrupou os híbridos mais próximos do genitor materno (*P. gardneri*). No entanto, a maioria dos híbridos foi agrupada em posição intermediária em relação aos genitores. O agrupamento dos híbridos mais próximos de *P. gardneri* sugere que os seus cromossomos são mais semelhantes a esse genitor, indicando que pode ter havido pequenas alterações estruturais nos genomas dos híbridos. Uma nova constituição genômica produzida pelo processo de hibridação pode gerar conflitos intergenômicos, que levam a rearranjos genéticos (RIDDLE; BIRCHLER, 2003). O método baseado em $CV_{(ci)}$ e $CV_{(cl)}$ é bastante sensível a qualquer tipo de variação (PASZKO, 2006), sendo útil na análise de alterações cromossômicas dos genomas dos híbridos.

Nos genitores e híbridos de *Passiflora* analisados, o uso da coloração convencional (Giemsa 2%) não consistiu na melhor ferramenta para identificação dos genótipos, pois a morfologia e tamanho dos cromossomos foi semelhante e a visualização de satélites não foi possível para todos os genótipos. Com base nessa técnica, apenas foram visualizados satélites em poucas células e em algumas células de maneira não muito clara, o que pode levar a um resultado impreciso.

Como os satélites nem sempre são visíveis em *Passiflora*, a utilização de bandamento CMA₃ e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com DNAr podem fornecer melhores resultados para análise cariotípica (MELO et al., 2001). De fato, no presente estudo, pode-se verificar que o uso da FISH com sonda para DNAr 45S e da coloração com fluorocromos forneceram cromossomos marcadores para identificação e confirmação dos híbridos.

Em *P. gardneri*, *P. gibertii* e nos híbridos, todos os blocos CMA₃ foram restritos a regiões de satélites, confirmando o que tem sido descrito na literatura para o gênero *Passiflora* (MELO; GUERRA, 2003). O padrão de bandamento CMA₃⁺ observado nos híbridos da progênie HD15 apresentou-se de duas formas, observando-se híbridos com cinco bandas CMA₃⁺ e com seis bandas. Essa variação já era esperada, pois o genitor paterno (*P. gibertii*) possui um par heteromórfico (observados com bandas CMA₃⁺ e sítios 45S). Em *Passiflora*, cromossomos homólogos com heteromorfismo já foram observados em um único indivíduo de *P. amethystina* Mikan, que apresentou cinco blocos CMA₃⁺, com quatro blocos menores e um único bloco maior (MELO et al., 2001). Heteromorfismo cromossômico também foi observado para sítios de DNAr. Em um indivíduo de *P. glandulosa* Cav. foi observado a presença de apenas um sítio de DNAr 5S em um homólogo e a ausência no outro homólogo, já em *P. suberosa* L. foi observada a presença de sítios de DNAr 5S e 45S no mesmo cromossomo (MELO; GUERRA, 2003).

A localização e o número de sequências ribossomais (genes DNAr) e satélites são muito importantes e úteis para a diferenciação cromossômica e, conseqüentemente, para a utilização desses cromossomos como marcadores. Nos híbridos, houve variação na quantidade de sítios DNAr 45S. Isso se deve ao fato da espécie genitora paterna apresentar o par cromossômico 2b heteromórfico, em que apenas um homólogo possui um sítio de DNAr 45S, ou seja, durante a meiose essa espécie pode formar gametas contendo dois ou três cromossomos carregando sítios DNAr 45S. Nos híbridos contendo cinco sítios DNAr 45S houve a fusão de um gameta paterno carregando dois sítios DNAr 45S com o gameta materno carregando três sítios DNAr 45S, enquanto que nos híbridos contendo seis sítios DNAr 45S, houve a fusão de um gameta paterno carregando três sítios DNAr 45S com um gameta materno carregando três sítios DNAr 45S.

Em espécies do gênero *Passiflora*, já foi observado à presença de multivalentes durante a meiose (MELO et al., 2001). Na espécie *P. edmundoi* Sacco foi observada a presença de irregularidades meióticas, como a formação de multivalentes, que podem refletir mudanças estruturais no genoma, tais como inversões, translocações, deleções e duplicações (SOUZA et al., 2003). Provavelmente a presença de um par cromossômico homólogo

heteromórfico em *P. gibertii* ocorreu devido à deleção ou redução de um dos sítios de DNAr 45S, o qual não pode ser detectado por FISH em cromossomos metafásicos, ou essa espécie possui diferentes citótipos, com indivíduos portando quatro sítios 45S e outros indivíduos portando seis sítios 45S. O cruzamento entre esses diferentes citótipos pode formar indivíduos com cinco sítios DNAr 45S. Porém outros acessos de *P. gibertii* precisam ser analisados com base em detecção de bandas CMA e sítios de DNAr 45S para testar essas hipóteses.

Em *Passiflora* tem sido reportada a existência de indivíduos com diferentes cariótipos quanto à localização de satélites. Em *P. edulis*, por exemplo, já foram observados satélites nos cromossomos 8 e 9 (CUCO et al., 2005), nos cromossomos 4 e 7 (MAYEDA; VIEIRA, 1995; MELETTI et al., 2005) e nos cromossomos 1 e 4 (VIANA; SOUZA, 2012). Essa grande variação quanto à posição dos satélites em populações distintas pode indicar a ocorrência de rearranjos estruturais (SOUZA et al., 2003).

O uso da FISH com as sondas para DNAr 5S e 45S demonstrou ser essa técnica uma excelente ferramenta para identificação de híbridos em *Passiflora*. As sondas DNAr 5S e 45S permitiram a localização dos genes de DNAr, os quais foram utilizados como marcas para confirmação de paternidade. Em híbridos obtidos de espécies do gênero *Lilium* L., o uso de apenas uma sonda de DNAr já foi o suficiente para confirmar a hibridização cruzada (MARASEK et al., 2004). Cada cromossomo com um sítio de DNAr pode funcionar como marcador. A utilização desses marcadores fornece informações (marcas) que podem ser facilmente reconhecidas em uma célula, e assim, permitem uma confirmação rápida e confiável dos híbridos analisados, uma vez que o uso dessa técnica pode ser feita em qualquer estágio do ciclo de vida da planta, sendo relevante para programas de melhoramento de plantas que envolvem hibridações interespecíficas.

A FISH usando duas ou mais sequências de DNA repetitivo como sondas tem sido amplamente utilizada para a identificação cromossômica e, conseqüentemente, para a utilização como cromossomo marcador em algumas espécies de plantas (MARASEK et al., 2004). O uso de sondas DNAr 5S e 45S determinou o caráter híbrido em *Lilium* L., em que o uso simultâneo das duas sondas forneceu cromossomos marcadores, os quais foram usados para identificação de cada genoma doador nos híbridos (MARESAK et al., 2004). No gênero *Oryza* L., com a aplicação da sonda de DNAr 45S em híbridos (*O. meyrana* x *O. sativa*), foi possível verificar que dois sítios de DNAr 45S pertenciam à *O. meyrana* e um sítio pertencia à *O. sativa* (XIONG et al., 2006).

A técnica de GISH tem se mostrado uma importante e eficiente ferramenta para identificação rápida e confiável de genomas das espécies genitoras em híbridos

(interespecíficos e intergenéricos) e espécies aloploidos (SCHWARZACHER, 2003). Essa técnica também tem se mostrado promissora para verificar a introgressão cromossômica em cultivares melhoradas (HUMPHREYS; PASAKINSKIENE, 1996). Entretanto, a GISH tem sido mais informativa em espécies que possuem cromossomos maiores, pois em espécies com cromossomos pequenos há tendência de marcação apenas nas regiões pericentroméricas (YAO et al., 2010).

A habilidade para distinguir os genomas das espécies genitoras em híbridos com base em GISH depende do grau de homologia entre as espécies e das condições de estringência. Além disso, a quantidade de DNA de bloqueio necessária para distinguir os genomas das espécies genitoras representa o grau de homologia compartilhada por elas (TANG et al., 2010). Para a identificação dos híbridos interespecíficos resultantes do cruzamento entre *P. gardneri* x *P. gibertii*, utilizou-se o DNA genômico paterno como sonda e o DNA genômico materno com DNA de bloqueio. Foi necessário o uso do DNA de bloqueio 100x mais concentrado que a sonda, sendo que os testes com concentrações menores de DNA de bloqueio não permitia a diferenciação dos genomas. Dessa forma podemos inferir que as duas espécies genitoras possuem muitas sequências repetitivas em comum, estando próximas geneticamente. Por isso, o uso de baixas concentrações de DNA de bloqueio permitiu que a sonda marcasse ambos os genomas genitores nos híbridos, enquanto que o aumento do DNA de bloqueio contribuiu para o aumento da especificidade da marcação e preveniu a hibridização cruzada (ANAMTHAWAT-JÓNSSON et al., 1990). Para identificação dos híbridos resultantes do cruzamento entre *Lycopersicon esculentum* L. e *L. peruvianum* L. foi necessário o uso de DNA de bloqueio 100x mais concentrado que a sonda (PAROKONNY et al., 1997), enquanto que em híbridos de *Dendranthema nankingense* X.D.Cui e *Tanacetum vulgare* L., ambos os genomas foram diferenciados sem a necessidade de DNA de bloqueio (TANG et al., 2011).

Geralmente, genomas que compartilham 80-85% ou menos de homologia podem ser diferenciados sem a necessidade de uma alta concentração de DNA de bloqueio (SCHWARZACHER et al., 1989). Por outro lado, com o aumento das condições de estringência combinada com uma quantidade alta de DNA de bloqueio, se pode obter a distinção de genomas que compartilham até 90 a 95% de homologia (PAROKONNY et al., 1997). No gênero *Allium* foram testadas diferentes concentrações de DNA de bloqueio, sendo que para algumas espécies genitoras uma taxa de 1:100 sonda/DNA de bloqueio foi suficiente, enquanto que para outras uma concentração de DNA de bloqueio extremamente

alta 1:1000 foi necessária (FRIENSEN; KLAAS, 1998), indicando que essas espécies são muito próximas.

5. CONCLUSÕES

A coloração convencional não permitiu a visualização de todos os satélites, não sendo a melhor ferramenta para identificação dos híbridos.

O bandamento CMA₃ permitiu verificar que as regiões ricas em GC nas espécies genitoras e nos híbridos foram restritas aos satélites.

Com o uso de FISH e GISH foi possível determinar a paternidade das plantas híbridas de *Passiflora*, demonstrando que ambas as técnicas podem ser utilizadas para identificação de híbridos em programas de melhoramento do maracujazeiro. Com a FISH foi possível selecionar cromossomos marcadores para identificação de ambos os genomas e com a GISH foi possível diferenciar os genomas.

Para a identificação do genoma paterno, *P. gardneri*, vários cromossomos puderam ser usados como marcadores com o uso simultâneo das duas sondas de DNAr 5S e 45S, além disso, foi possível verificar que apenas o uso da sonda DNAr 5S já seria suficiente para identificação de ambos os genomas das espécies genitoras nos híbridos.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Msc. Cláudio Antônio Ferreira de Melo pelo auxílio nas atividades de laboratório, à Prof^a Dra. Eliana Forni-Martins pela doação dos clones para obtenção da sonda de DNAr 45S, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa (CAPES) pela concessão de bolsa, à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB) e à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pelo apoio financeiro à pesquisa.

7. REFERÊNCIAS

- ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. A. F. Passionflower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 166, n. 3, p. 307-315, 2009.
- ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; SCHWARZACHER, T.; LEITCH, A. R.; BENNETT, M. D.; HESLOP-HARRISON, J. S. Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79, p. 721-728, 1990.
- BARBOSA, P. R.; VALVASSORI, S. S.; BORDIGNON, C. L.; KAPPEL, V. D.; MARTINS M. R.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F. H. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 282–288, 2008.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* Schumack x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 26-35, 2003.
- BELO, G. O. **Análise morfológica e genética em progênie híbrida F1 do cruzamento *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* N.E. BROW**. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.
- BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; GIOVANNI, R.; BORGES, R. A. X.; HERING, R. L. O.; SERRANO, T.; SANTOS FILHO, L. A. F. Passifloraceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 830-834, 2013.
- BERNACCI, L. C.; SOUZA, M. M. *Passiflora cacao* (Passifloraceae), a New Species from Southern Bahia, Brazil. **Novon**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2012.
- CERVI, A. C.; IMIG, D. C. A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Phytotaxa**, v. 103, n. 1, p. 46-50, 2013.
- CERVI, A. C.; LINSINGEN, L. *Passiflora Kikiana*, a new species of Passifloraceae from the Brazilian Amazon. **Acta botânica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1062-1064, 2010.
- CONCEICÃO, L. D. H. C. S.; BELO, G. O.; SOUZA, M. M.; SANTOS, S. F.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CORREA, R. X. Confirmation of cross-fertilization using

molecular markers in ornamental passion flower hybrids. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 47-52, 2011.

CUCO, S. M.; VIEIRA, M. L. C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, v. 58, p. 220-228. 2005

CZERNICKA, M.; MSCIOHOWASKA, A.; KLEIN, M. MURAS, P.; GRZEBELUS. Paternity determination of interspecific rhododendron hybrids by genomic in situ hybridization (GISH). **Genome**, v. 53, p. 277-284, 2010.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** v. 12, p. 13-15, 1990.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; SOARES-SCOTT, M. D.; SOUZA, L. S.; CASTIGLIONI, G. L. BRS Rubiflora: Híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 337, 2007a.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; BORGES, R. S.; PEIXOTO, J. R.; ANDRADE, G. A.; SANTOS, E. C.; SILVA, D. G. P. BRS Estrela do Cerrado: Híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 334, 2007b.

FRIENSEN, N.; KLASS, M. Origen of some minor propagated *Allium* crops studied with RAPD and GISH. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 45, n. 6, p. 511-523, 1998.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo:Funpec, 2002, 131 p.

HUMPHREYS, M. W.; PASAKINSKIENE, I. Chromosome painting to locate genes for drought resistance transferred from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. **Heredity**, v. 77, p. 530-534, 1996.

HUZIWARA, Y. Karyotype analyses in some genera of Compositae. VII. Further studies on the chromosome of Aster. **American Journal of Botany**, v. 49, p. 116-119, 1962.

JAUHAR, P. P.; PETERSON, T. S. Cytological analyses of hybrids and derivatives of hybrids between durum wheat and *Thinopyrum bessarabicum*, using multicolor fluorescent GISH. **Plant Breeding**, v. 125, p. 19-29, 2006.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 1940, 523 p.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 191-196, 2008.

JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F.G.; BRAGA, M. F.; LIMA, C. A.; VAZ, C. F.; VILLANOVA, A. C. BRS Roseflora: híbrido de *Passiflora* para uso em paisagismo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 340. 2007.

KING, L. A. Newly-Registered Cultivars to: Winter 2011. **Passiflora**, v. 22, n. 1. p. 16-23, 2011.

MARASEK, A.; HASTEROK, R.; WIRJACHA, K.; ORLIKOWSKA. Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium*. **Hereditas**, v. 140, p. 1-7, 2004.

MAYEDA, L. Y.; VIEIRA, M. L. C. Estudo cariotípico de três espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 18, p. 426, 1995. Suplemento.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C. Caracterização fenotípica de três seleções de maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* Sims). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 268–272, 2005a.

MELO, C. A. F.; SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Establishment of genomic *in situ* hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, 2013. In press.

MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, p. 69-84, 2001.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and rDNA sites in *Passiflora* L. with species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v. 92, p. 309–316, 2003.

OLIVEIRA, R. P.; NOVELLI, V. M.; MACHADO, M. A. Frequência de híbridos em cruzamento entre tangerina ‘cravo’ e laranja ‘pêra’. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1895-1903, 2005.

ORTOLONI, F. P.; MATAQUEIRO, M. F.; MORO, J. R. Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncate* (Haworth) Moran e *Schlumbergera x buckley* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 361-367, 2007.

PAROKONNY, A. S.; MARSHALL, J. A.; BENNETT, M. D.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R.; BRIAN POWER, J. Homoeologous pairing and recombination in backcross derivatives of tomato somatic hybrids [*Lycopersicon esculentum* (+) *L. peruvianum*]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 713-723, 1997.

PASZKO, B. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. **Plant Systematic and Evolution**, v. 258, p. 39-48, 2006.

RAN, Y.; HAMMETT, K. R. W.; MURRAY, B. G. Hybrid identification in *Clivia* (Amaryllidaceae) using chromosome banding and genomic in situ hybridization. **Annals of Botany**, v. 87 p. 457-462, 2001.

RIDDLE, N. C.; BIRCHLER. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends in Genetics*, v. 19, p. 597-600, 2003.

SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; CONCEIÇÃO LDHCS, et al. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, v. 184, p. 389-399, 2012.

SCHWARZACHER, T. DNA, chromosomes, and in situ hybridization. **Genome**, v. 46, p. 953-962, 2003.

SCHWARZACHER, T.; HASLOP-HARRISON, P. **Practical in situ Hybridization**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2000, 250 p.

SCHWARZACHER, T.; LEITCH, A. R.; BENNETT, M. D.; HESLOP-HARRISON, J. S. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. **Annals of Botany**, v. 64, p. 315-324, 1989.

SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Genomic *in situ* hybridization in plants. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 2953-2965, 2013.

SOARES-SCOTT, M. D. **Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de Passiflora**. 1998. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SOARES-SCOTT M. D.; MELETTI, L. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 213–240, 2005.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; SILVA, L. C.; REIS, D. S. S.; SUDRÉ, C. P. Karyotype of six *Passiflora* species in the State of Rio de Janeiro. **Cytologia**, v. 68, p. 165–171, 2003a.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; BERNACCI, L. C.; SUDRÉ, C. P.; SILVA, L. C. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). **Caryologia**, v. 56, p. 157-165. 2003b.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasising Brazilian species. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 247-258, 2008.]

SOUZA, M. M.; URDAMPILLETA, J. D.; FORNI-MARTINS, E. R. Improvements in cytological preparations for fluorescent *in situ* hybridization in *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 2148-2155, 2010.

STACE, C. A.; BAILEY, J. P. The Value of Genomic *in situ* Hybridization (GISH) in Plant Taxonomic and Evolutionary Studies. In: Hollingsworth, P. M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (eds.). **Molecular Systematics and Plant Evolution**. London: CRC Press, 1999. p. 199-210.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Edward Arnold, 1971. 216 p.

TANG, F.; CHEN, F.; CHEN, S.; WANG, X.; ZHAO, H. Molecular cytogenetic identification and relationship of the artificial intergeneric hybrid between *Dendranthema indica* and *Crossostephium chinense* by GISH. **Plant Systematics and Evolution**, v. 289, p. 91-99, 2010.

TANG, F.; WANG, H.; CHEN, S.; CHEN F.; LIU, Z.; FANG, W. Intergeneric hybridization between *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare*. **Scientia Hortuculturae** v. 132, p. 1-6, 2011.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3^a ed. Cambridge: The MIT Press, 2000. 224 p.

VANDERPLANK, J.; ZAPPI, D. *Passiflora cristalina*, a striking new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. **Kew Bulletin**, v. 66, p. 149-153, 2011.

VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. **Plant Biology**, v. 14, p. 820-827, 2012.

VIEIRA, M. L. C.; BARBOSA, L. V.; MAYEDA, L. Y. Citogenética dos Maracujazeiros. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Eds.). **Maracujá: Produção e Qualidade na Passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 47-65, 2004.

XIONG, Z. Y.; TAN, G. X.; HE, G. Y.; HE, G. C.; SONG, Y. C. Cytogenetic comparisons between A and G genomes in *Oryza* using genomic *in situ* hybridization. **Cell Research**, v. 16, p. 260-266, 2006.

YAO, X. C.; GE, X. H.; CHEN, J. P.; LI, Z. Y. Intra- and intergenomic relationships in interspecific hybrids between *Brassica* (*B. rapa*, *B. napus*) and a wild species *B. maurorum* as revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). **Euphytica**, v. 173, p. 113-120, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1 - A hibridização genômica *in situ* (GISH) tem sido aplicada com sucesso em inúmeras famílias de plantas, permitindo a indentificação de híbridos interespecíficos e intergenéricos, verificação da origem e evolução de aloploplóides e no melhoramento de plantas para verificar introgressão cromossômica em genótipos de interesse agrônômico.
- 2 - Não houve alteração cromossômica numérica nos híbridos.
- 3 - Com o bandamento CMA₃ verificou-se que as regiões ricas em GC nos híbridos e nas espécies *P. gardneri* e *P. gibertii* foram restritas aos satélites.
- 4 - A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com o uso das sondas de DNAr 45S e 5S permitiu a identificação de cromossomos marcadores para cada genoma e assim foi possível confirmar a hibridação cruzada das plantas obtidas do cruzamento *P. gardneri* x *P. gibertii*.
- 5 - A GISH, com uso do DNA genômico de *P. gibertii* como sonda e o DNA genômico de *P. gardneri* como DNA de bloqueio, permitiu distinguir os genomas de ambas as espécies nos híbridos e inferir que as duas espécies são próximas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. A. F. Passionflower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 166, n. 3, p. 307-315, 2009.
- AKAMINE, K. E.; GIROLAMI, G. Problems in fruit set in yellow passion fruit. **Hawaii Farm Science**, v. 4, n. 5, p. 3-5, 1957.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento de plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p.
- BRAGLIA, L.; GAVAZZI, F.; GIOVANNINI, A.; NICOLETTI, F.; DE BENEDETTI, L.; BREVIARIO, D. TBP-assisted species and hybrid identification in the genus *Passiflora*. **Molecular Breeding**, v. 33, n. 1, p. 209-219, 2014.
- BARBOSA, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger + *P. amethystine*. **Euphytica**, v. 98, p. 121-127, 1997a.
- BARBOSA, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Análise do comportamento meiótico de híbridos somáticos *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. cincinnata* Mast. **Revista Brasileira Genética**, v. 20 p. 88. 1997b. Suplemento.
- BEAL, P. R. Chromosome numbers of exotic *Passiflora* species in Australia. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 73- 81, 1969a.
- BEAL, P. R. Cytology of the native Australian *Passiflora* species. 1. Chromosome number and horticultural value. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, v. 26, n. 3, p. 407-421, 1969b.
- BEAL, P. R. Cytology of the native Australian and several exotic *Passiflora* species. 2. Chromosome morphology. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, v. 30, n. 1, p. 17-18, 1973a.
- BEAL, P. R. Cytology of the native Australian and several exotic *Passiflora* species. 3. Morphology of satellited chromosomes. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, v. 30, n. 1, p. 19-24, 1973b.

BELO, G. O. **Análise morfológica e genética em progênie híbrida F1 do cruzamento *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* N.E. BROW**. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; GIOVANNI, R.; BORGES, R. A. X.; HERING, R. L. O.; SERRANO, T.; SANTOS FILHO, L. A. F. Passifloraceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013b. p. 830-834.

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. Passifloraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 29 Jan. 2014.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. R. S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Org.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 559-586.

BERNACCI, L. C.; SOUZA, M. M. *Passiflora cacao* (Passifloraceae), a New Species from Southern Bahia, Brazil. **Novon**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2012.

BERNACCI, L. C.; VITTA, F. A.; BAKKER, Y. V. Passifloraceae. In: WANDERLEY M. G. L., SHEPPERD G. J., MELHEM T. S., GIULIETTI A. M., KIRIZAWA, M. (Eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa/FAPESP, 2003. p. 247-274.

BOWDEN, M. W. A list of chromosome numbers in higher plants. II *Menispermaceae* to *Verbenaceae*. **American Journal of Botany**, v. 32, p. 191-201, 1945.

BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZZI, A. J.; SILVA, E. A. M. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**, v. 370, 1995, n. 1, p. 45-52.

BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Hibridação em maracujá. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 379-399.

BRUCKNER, C. H.; SUASSUNA, T. M. F.; RÊGO, M. M.; NUNES, E. S. Auto-incompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 457-464.

CARINI, M. Dentro do apê, cresce um jardim. **Casa Cláudia**, n. 629, p. 122-126, 2014.

CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, Madrid, v. 45, p. 1-92, 1997.

CERVI, A. C.; IMIG, D. C. A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Phytotaxa**, v. 103, n. 1, p. 46-50, 2013.

CERVI, A. C.; LINSINGEN, L. *Passiflora Kikiana*, a new species of Passifloraceae from the Brazilian Amazon. **Acta botânica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1062-1064, 2010.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; BELO, G. O.; SOUZA, M. M.; SANTOS, S. F.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CORRÊA, R. X. Confirmation of cross-fertilization using molecular markers in ornamental passion flower hybrids. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 47-52, 2011.

CUCO, S. M.; VIEIRA, M. L. C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, v. 58, p. 220-228. 2005

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Aspectos botânicos. In: LIMA, A. A. (Ed.). **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Embrapa mandioca e Fruticultura Cruz das Almas. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2002. p. 15-24.

DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVEIRA, J.C. VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, v.15, p.106-110, 1995.

DURANTE, S. Flores em escalada. **Casa e Jardim**, n. 706, p. 160-168, 2013.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; SOARES-SCOTT, M. D.; SOUZA, L. S.; CASTIGLIONI, G. L. BRS Rubiflora: Híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 337, 2007a.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; BORGES, R. S.; PEIXOTO, J. R.; ANDRADE, G. A.; SANTOS, E. C.; SILVA, D. G. P. BRS Estrela do Cerrado: Híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 334, 2007b.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de Marcadores Moleculares RAPD e Microssatélites Visando a Confirmação da Fecundação Cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotrópica**, v. 15, n.1, p. 41-46, 2003.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de *Passiflora* no Brasil. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 41-78.

FISCHER, I. H.; ARRUDA, M. C.; ALMEIDA, A. M.; GARCIA, M. J. M.; JERONIMO, E. M.; PINOTTI, R. N.; BERTANI, R. M. A. Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro oeste paulista. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 254-259, 2007.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; MARTINS, M. C.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causada por *Nectria haematococca*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 250-258, 2005.

GATT, M.; HAMMETT, K. R. W.; MURRAY, B. G. Interspecific hybridization and the analysis of meiotic chromosome pairing in *Dahlia* (Asteraceae-Helianthae) species with $x = 16$. **Plant Systematics and Evolution**, v. 221, p. 25-33, 2000.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856p.

GROSSER, J.W.; GMITTER, J.F.G. Somatic hybridization of Citrus with wild relatives for germoplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, v. 25, n. 2, p. 147-151, 1990.

HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; CERVI, A. C.; JANSEN, R. K. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**, v. 31, n. 1, p. 138–150, 2006.

IBGE - **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2011/default_pdf.shtm>. Acesso em: 4 fev. 2013.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 191-196, 2008.

JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F.G.; BRAGA, M. F.; LIMA, C. A.; VAZ, C. F.; VILLANOVA, A. C. BRS Roseflora: híbrido de *Passiflora* para uso em paisagismo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 340. 2007.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO F. G., JUNQUEIRA N. T. V., BRAGA M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-108

KILLIP, E.P. The american species of Passifloraceae. **Field Museum of Natural History**, n.19, p.613-656, 1938.

KING, L. A. Newly-Registered Cultivars to: Winter 2011. **Passiflora**, v. 22, n. 1. p. 16-23, 2011.

LIMA, A. A. Aspectos fitotécnicos: desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 643-677.

LINDBERG, A. B.; OLESEN, M. O. The fragility of extreme specialization: *Passiflora mixta* and its pollinating hummingbird *Ensifera ensifera*. **Journal of Tropical Ecology**, v. 17, p. 323-329, 2001.

MACDOUGAL, J. M.; FEUILLET, C. Systematics. In: ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. (Org.). **Passiflora - Passionflowers of the world**. Portland: Timber Press, 2004. p. 27-31.

MAGDALITA, P. M.; DREW, R. A.; ADKINS, S. A.; GODWIN, I. D. Morphological, molecular and cytological analyses of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 224-229, 1997.

MAYEDA, L. Y.; VIEIRA, M. L. C. Estudo cariotípico de três espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 18, p. 426, 1995. Suplemento.

MARASEK, A.; HASTEROK, R.; WIRJACHA, K.; ORLIKOWSKA. Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium*. **Hereditas**, v. 140, p. 1-7, 2004.

MELETTI, L. M. M. **Caracterização agronômica de progênies de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. F. *flavicarpa* O. Deg.)**. 1998. 92 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MELETTI, L. M. M.; BRÜCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRÜCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Eds.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-385.

MELETTI, L. M. M.; SANTOS, R. R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro amarelo: Obtenção do 'Composto IAC-27'. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 3, p. 491-498, 2000.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C. Caracterização fenotípica de três seleções de maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* Sims). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 268-272, 2005b.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005a. 55-78 p.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PINTO-MAGLIO, C. A. F.; MARTINS, F. P. Caracterização de Germoplasma de Maracujazeiro (*Passiflora* spp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 14, n. 2, p. 157-162, 1992.

MELO, C. A. F.; SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Establishment of genomic *in situ* hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, 2013. In press.

MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, p. 69-84, 2001.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and rDNA sites in *Passiflora* L. with species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v. 92, p. 309-316, 2003.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BAUMGRATZ, J. F. A. *Passiflora* L. subgênero Decaloba (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na região sudeste do Brasil. **Rodriguésia**, v. 55, n. 85, p. 17-54, 2004.

MORAWETZ, W. Remarks on kariological differentiation patterns in tropical Woody plants. **Plant Systematics and Evolution**, v. 152, p. 49-100, 1986.

NAKASONE, H. Y.; PAULL, R. E. **Tropical fruits**. New York: CAB international, 1999, 445p.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus**, v.6, n. 3, p. 194-226, 2006.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5. 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 291-310.

OLIVEIRA, R. P.; NOVELLI, V. M.; MACHADO, M. A. Frequência de híbridos em cruzamento entre tangerina ‘cravo’ e laranja ‘pêra’. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1895-1903, 2005.

OTONI, W. C.; BLACKHALL, N. W.; D’UTRA VAZ, F. B.; CASALI, V. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener, and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, v.46, p. 777-785, 1995.

PASSIFLORA SOCIETY. Disponível em: <<http://www.passiflorasociety.org>> Acesso em: 28 jan. 2014

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 457-464.

PEIXOTO, M. Plantas Brasileiras. Disponível em: <<http://www.brazilplants.com/>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

PENHA, A. H. **Construção de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* inserida em BACs (Bacterial Artificial Chromosome) e mapeamento usando hibridação *in situ* fluorescente**. 2012. 127 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P. Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Org.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 277-292.

PEREIRA, T. N. A.; NICOLI, R. G.; MADUREIRA, H. C.; JÚNIOR, P. C. D.; GABURRO, N. O. P.; COUTINHO, K. Caracterização morfológica e reprodutiva de espécies silvestres do gênero *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. (Eds.). **IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, p.29-34.

POPE, W. T. The edible passion fruit in Hawaii. **Hawaii Agricultural Experiment Station Circular**, v. 88, p. 1-18, 1935.

RAVEN, P. H. The bases of angiosperm phylogeny: cytology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 62, p. 724-764, 1975.

RUGGIERO, C. Alguns fatores que podem influir na frutificação do maracujazeiro. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Jaboticabal: FCAV, 1980. p. 55-63.

RUSHING, F. **Tough plants for southern gardens: low care, no care, tried and true winners**. Nashville: Cool Springs Press, 2003, 240p.

SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, v. 184, p. 389-399, 2012.

SCHWARZACHER, T.; LEITCH, A. R.; BENNETT, M. D.; HESLOP-HARRISON, J. S. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. **Annals of Botany**, v. 64, p. 315-324, 1989.

SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Genomic *in situ* hybridization in plants. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 2953-2965, 2013.

SNOW, N.; MACDOUGAL, J. M. New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany**, v. 18, p. 261-272, 1993.

SOARES-SCOTT, M. D. **Caracterização Citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora***. 1998. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SOARES-SCOTT, M. D.; MAGOLIN, C. A.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Análise citogenética e padronização de métodos de isolamento de DNA genômico de espécies e híbridos de *Passiflora* L. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 381, 1999. Suplemento.

SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá – Espécies, Variedades e Cultivo**. Piracicaba, FEALQ, 1997, 179 p.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T.

V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 213-240.

SOUZA, M. M., PEREIRA, T. N. S., SILVA, L. C., REIS, D. S. S., SUDRÉ, C. P. Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. **Cytologia**, v. 68, p. 165-171, 2003.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasising Brazilian species. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 247-258, 2008.

STACE, C. A.; BAILEY, J. P. The Value of Genomic in situ Hybridization (GISH) in Plant Taxonomic and Evolutionary Studies. In: Hollingsworth, P. M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (eds.). **Molecular Systematics and Plant Evolution**. London: CRC Press, 1999. p. 199-210.

STOREY, W. B. Chromosomes numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. **Pacific Science**, v. 4, p. 37-42, 1950.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora: Passionflowers of the world**. Portland: Timber Press, 2004. 430 p.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3^a ed. Cambridge: The MIT Press, 2000. 224 p.

VANDERPLANK, J.; ZAPPI, D. *Passiflora cristalina*, a striking new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. **Kew Bulletin**, v. 66, p. 149-153, 2011.

VIANA, A. J. C; SOUZA, M. M. Identification of the pattern of heterochromatin distribution in *Passiflora* species with C-banding. **Genetics and Molecular Research**. v. 9, n. 3, p. 1908-1913, 2010.

VIANA, A. J. C; SOUZA, M. M. Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. **Plant Biology**, v. 14, p. 820-827, 2012.

XIONG, Z. Y.; TAN, G. X.; HE, G. Y.; HE, G. C.; SONG, Y. C. Cytogenetic comparisons between A and G genomes in *Oryza* using genomic *in situ* hybridization. **Cell Research**, v. 16, p. 260-266, 2006.