

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



ANÁLISES MEIÓTICAS EM GENITORES E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS F₁
(PROGÊNIE HD15) DE *Passiflora* L.

MANUELLA PALMEIRA LAVINSCKY

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL
Fevereiro de 2016

MANUELLA PALMEIRA LAVINSCKY

**ANÁLISES MEIÓTICAS EM GENITORES E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS F₁
(PROGÊNIE HD15) DE *Passiflora* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para 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 2016

L412

Lavinsky, Manuella Palmeira.

Análises meióticas em genitores e híbridos interespecíficos F1 (progênie HD15) de *Passiflora* L. / Manuella Palmeira Lavinsky. – Ilhéus, BA: UESC, 2016.

vii, 78f. : 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. Hibridação vegetal. 2. Meiose. 3. *Passiflora*.
4. Plantas – Melhoramento genético. I. Título.

CDD 621.523

MANUELLA PALMEIRA LAVINSCKY

**ANÁLISES MEIÓTICAS EM GENTORES E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS F₁
(PROGÊNIE HD15) DE *Passiflora* L.**

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

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2016

Dra. Polliana Rodrigues
(UEFS)

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

Prof. Dr. Cláudio A. Ferreira de Melo
(UESC)

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Huassile e Marisvaldo pelo carinho, confiança e apoio, dando-me força e coragem para vencer mais essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser essencial em minha vida, guia que iluminou os meus caminhos durante esta caminhada.

Aos meus pais Huassile e Marisvaldo por serem meus exemplos de vida. Mãe, seu cuidado e dedicação me deram a esperança de seguir em frente. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que nunca estive sozinha nessa jornada. Amo vocês!

À minha família, em especial ao meu irmão Matheus, por acreditarem em mim.

À Zildo, pessoa que amo. Obrigada pelo carinho, paciência e compreensão pela correria de cada semestre.

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

Aos amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas Matusalem, Rita, Ritão, Vanessa, Pedro, Clausio, Josie, Ohana e Analu pelas experiências vividas, períodos de descontração e por dividir muitos momentos bons e ruins, em especial a Gonçalo e Viviane pelo apoio emocional e por toda ajuda no laboratório e fora dele. Obrigada por me suportarem esses dois anos e pela amizade. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro da produção foram mais divertidas e menos cansativas. Sentirei saudades!

Aos amigos do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia molecular, em especial a Yara Barros, pelas alegrias, tristezas e emoções compartilhadas. Sei que ganhei uma grande amiga.

Ao meu amigo Joedson, pela amizade, pelos momentos de descontração e pela ajuda nas análises estatísticas e nas tabelas. Você e Vivi foram grandes presentes nesse mestrado.

Ao técnico de campo Paulo pela ajuda na casa de vegetação.

Às minhas amigas de longas datas que estão sempre comigo em todos os momentos me apoiando, incentivando, torcendo e crescendo juntas. Amo vocês!

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que me apoiaram e participaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

Muito obrigada!

ÍNDICE

EXTRATO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 A família Passifloraceae e o gênero <i>Passiflora</i> L.	10
2.2 Potencial ornamental das passifloras.....	12
2.3 Híbridações em passifloras.....	14
2.4 As espécies <i>Passiflora gibertii</i> N.E. Brown e <i>P. gardneri</i> Mast.	16
2.5 Comportamento meiótico.....	17
2.6 Estudo da meiose associado ao melhoramento de plantas.....	20
2.7 Estudo do comportamento meiótico em híbridos.....	23
2.8 Pós – meiose.....	26
2.9 Irregularidade meiótica x fertilidade em plantas.....	27
2.10 O uso da GISH para análises meióticas em híbridos.....	33
2.11 Citogenética molecular e estudos na meiose em plantas.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Material vegetal.....	37
3.2 Condições de cultivo.....	37
3.3 Comportamento meiótico e pós meiótico.....	38
3.4 Viabilidade polínica	39
3.5 Extração de DNA genômico.....	39
3.6 Tratamento de lâminas para hibridação <i>in situ</i>	40
3.7 Preparo de sondas e DNA de bloqueio para hibridação genômica <i>in situ</i> . GISH (<i>Genomic in situ hybridization</i>)	40
3.8 GISH.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Meiose e pós-meiose.....	42
4.2 Viabilidade polínica.....	48
4.3 Citogenética molecular.....	51
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÃO.....	61
7 REFERÊNCIAS	62

EXTRATO

LAVINSCKY, Manuella Palmeira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2016. **Análises meióticas em genitores e híbridos interespecíficos F₁ (progênie HD15) de *Passiflora* L.** Orientadora: Dra. Margarete Magalhães de Souza.

O gênero *Passiflora* L. contém mais de 550 espécies e pertence à família Passifloraceae A.L. de Jussieu ex Kunth. O Brasil possui cerca de 137 espécies catalogadas, sendo considerado um importante centro de diversidade do gênero; novas espécies tem sido descritas. Na UESC, o banco ativo de germoplasma (BAG-Passifloras) mantém uma coleção de passifloras silvestres para utilização como planta ornamental e para obtenção de híbridos. O presente trabalho tem como objetivo realizar análises meióticas nos genitores *P. gardneri* Mast. vs. *P. gibertii* N.E. Brown e quatro híbridos interespecíficos F₁ da progênie HD15, visando inferir sobre a compatibilidade genética entre genitores e implicações da hibridação no genoma dos híbridos. Botões florais foram coletados em diferentes estágios de desenvolvimento e mantidos no fixador Carnoy I. Para os estudos de citogenética clássica uma antera de cada botão floral foi analisada, imersa em ácido acético 60% e em seguida corada com carmin acético 2%. Para viabilidade polínica, flores foram coletadas abertas e uma antera de cada flor foi utilizada em cada teste, utilizando (i) solução de Alexander e (ii) diacetato de fluoresceína. Os grãos de pólen (GP) foram contados, classificados em viáveis e inviáveis e mensurados com o *software* DP2-BSW. Para citogenética molecular foi utilizada a técnica de hibridação genômica *in situ* (GISH) na prófase I da meiose. A análise do comportamento meiótico mostrou haver pareamento cromossômico nos híbridos e formação de quiasmas. Também foram observadas algumas irregularidades tanto em meiose I quanto em meiose II, com formação de cromossomos retardatários, ponte cromossômica, assincronia, irregularidade de fuso e formação de três núcleos. Nos produtos pós-meióticos foram observadas tétrades, tríades, díades, mônades e políades. Os GP observados com solução de Alexander foram classificados em viáveis e inviáveis, sendo esses últimos do tipo vazio, contraído e pulverizado. Com a solução de diacetato de fluoresceína os GP foram classificados em viáveis e inviáveis. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância, mostrando diferença significativa para todas as análises, exceto para formação de mônades. A GISH, utilizando *P. gibertii* como sonda e *P. gardneri* como DNA de bloqueio permitiu observar o pareamento entre cromossomos homeólogos nos híbridos. Também foi observada a falta de pareamento entre alguns cromossomos, o que levou à formação de cromossomos univalentes e, conseqüentemente, a irregularidades durante as fases da meiose e diminuição da fertilidade

desses híbridos. Os resultados obtidos nesse estudo estabelecem o grau de homologia entre as espécies genitoras através de análise do pareamento cromossômico e da formação de quiasmas, confirmado na GISH, e pela estimativa das anormalidades encontradas nos híbridos HD15. As irregularidades encontradas na meiose podem ter influenciado a viabilidade gamética. As duas espécies genitoras tem potencial para utilização como genitor masculino em programas de melhoramento e os híbridos HD15 podem ser considerados citologicamente estáveis e são fontes de variabilidade genética sendo muito úteis em programas de melhoramento de *Passiflora* que têm como finalidade a produção de híbridos.

Palavras-chave: Hibridação interespecífica. Meiose. GISH. *Passiflora* ornamental.

Viabilidade polínica.

ABSTRACT

LAVINSCKY, Manuella Palmeira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2016. **Meiotic analysis in parentes and interspecific hybrids F₁ (progeny HD15) of *Passiflora* L.** Advisor: Dra. Margarete Magalhães de Souza.

The genus *Passiflora* L. contains more than 550 species and belongs to the family Passifloraceae AL de Jussieu ex Kunth. Brazil has about 137 species cataloged, and is considered an important center of genus diversity; new species have yet been described. In UESC, the active germplasm bank (BAG-Passifloras) maintains a collection of wild passifloras for use as an ornamental plant and to obtain hybrids. This study aims to conduct meiotic analysis of parents *P. gardneri* Mast. vs. *P. gibertii* N. E. Brown and four interspecific hybrids F₁ progeny HD15, aiming to infer the genetic compatibility between parents and implications of hybridization in the genome of the hybrids. Flower buds were collected at different stages of development and maintained in Carnoy I. For classical cytogenetic studies one anther of each bud was analyzed, immersed in acetic acid 60% and then stained with carmine 2% acetic acid. For pollen viability, open flowers were collected and an anther of each flower was used in each test, using (i) Alexander solution, and (ii) fluorescein diacetate. The pollen grains (PG) were counted, identified in viable and non-viable and measured with the DP2-BSW software. For molecular cytogenetic was used GISH technique in prophase I of meiosis. The analysis of meiotic behavior showed there chromosome pairing in hybrids and formation of chiasma. They also observed some irregularities in both meiosis I and meiosis II, forming laggard chromosomes, chromosome bridge, asynchrony, spindle of irregularities and formation of three nucleus. In the post-meiotic products were observed tetrads, triads, dyads, monads and polyads. GP observed with Alexander solution were classified into viable and non-viable, the latter being the empty, shrunken and powdered types. With fluorescein diacetate solution of the GP were classified into viable and non-viable. All results were submitted to analysis of variance, showing significant difference for all analyzes except for monads formation. Genomic in situ hybridization (GISH), using *P. gibertii* as a probe and *P. gardneri* as blocking DNA allowed to observe pairing between homeologous chromosomes in hybrids. It was also observed a lack of pairing between some chromosomes, resulting in the formation of univalent chromosome and consequently, irregularities during the stages of meiosis and decreased fertility these hybrids. The results of this study establishes the degree of homology between species genitors through observations of chromosome pairing and chiasma formation, confirmed in GISH, and

the estimate of the abnormalities found in HD15 hybrids. The irregularities found in meiosis may have influenced the gametic viability. The two genitors species has potential for use as male parent in breeding programs and HD15 hybrids can be considered cytologically stable and are sources of genetic variability are very useful in *Passiflora* breeding programs that are aimed at the production of hybrids.

Key-words: Interspecific Hybridization. Meiosis. GISH. Ornamental *Passiflora*. Pollen viability.

1 INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae A.L. de Jussieu ex Kunth compreende 17 gêneros e cerca de 650 espécies (BERNACCI et al., 2013) que se encontram distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do novo mundo, e na região neotropical (América) está a maior diversidade, com uma média de 500 espécies (ULMER; MACDOUGAL, 2004). O Brasil possui cerca de 137 espécies já citadas e é considerado um importante centro de diversidade do gênero *Passiflora* (BERNACCI et al., 2013). No entanto, novas espécies continuam sendo descobertas a cada ano e o número de espécies incluídas na família Passifloraceae vem aumentando gradativamente (BERNACCI; SOUZA, 2012).

Dentro dessa família, o gênero *Passiflora* L. possui uma grande variabilidade genética e é considerado o mais rico (BERNACCI et al., 2003), sendo também o mais importante por possuir espécies com alto valor econômico. Suas espécies apresentam diversidade em características morfológicas, das quais se destacam as belas flores vistosas e exuberantes, com coloração forte e intensa, em uma variedade de formatos e tamanhos (VANDERPLANK, 2000), algumas bem coloridas, outras mais pálidas, bem como a presença de corona que caracteriza a família Passifloraceae; outros atributos estéticos, como o número abundante de flores e o florescimento ao longo de todo o ano incluem essas espécies na lista de plantas ornamentais (ABREU et al., 2009).

As passifloras são utilizadas como planta ornamental para decorar pérgolas e estufas (RUSHING, 2003) desde o século XVII, na Europa, e especificamente duas espécies eram mais comumente usadas, *P. caerulea* L. e *P. incarnata* L. (PEIXOTO, 2005). O primeiro híbrido ornamental, *P. 'Violacea'* (*P. caerulea* vs. *P. racemosa*) foi desenvolvido no início do século XIX, em 1819 por Milne, em Fulham, na Inglaterra (VANDERPLANK, 2000). No Brasil, apesar da grande diversidade de espécies e das condições climáticas favoráveis, o mercado de passifloras com a finalidade ornamental ainda é praticamente inexistente (VANDERPLANK, 2000). Entretanto, o uso ornamental das passifloras vem sendo cada vez mais ampliado e divulgado (DURANTE, 2013; CARINI, 2014).

Assim, existe um grande interesse na produção de híbridos interespecíficos com características únicas nesse mercado de plantas ornamentais (VANDERPLANK, 2000), entretanto, os híbridos podem ser inviáveis, ou ainda completamente ou parcialmente inférteis (ULMER; MACDOUGAL, 2004). A formação de flores exuberantes, mais vistosas e de

coloração exótica é a característica mais essencial para criação de híbridos ornamentais. A hibridação artificial de muitas espécies de *Passiflora* pode acontecer sem dificuldades (VANDERPLANK, 2000). Além disso, híbridos podem surgir naturalmente sem interferência humana, como resultado de polinização por insetos, abelhas ou morcegos que voam em diferentes áreas com espécies de *Passiflora* ou até na mesma área onde existam espécies compatíveis, principalmente entre aquelas com mesmo número cromossômico (MELO, 2014), como no caso do híbrido natural *P. rosea*, resultado do cruzamento entre *P. tripartita* var. *mollissima* vs. *P. pinnatistipula* (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Desde 2004, a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, possui um Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Passifloras) com a finalidade de obter híbridos interespecíficos que reúnam características de interesse ornamental (CONCEIÇÃO et al., 2011). Alguns híbridos já foram produzidos com sucesso no BAG, como *P.* ‘Bela’, *P.* ‘Gabriela’ (BELO, 2010), *P.* ‘Aninha’, *P.* ‘Alva’ e *P.* ‘Priscilla’ (SANTOS et al., 2012). Considerando a variabilidade genética do gênero, o conhecimento e o estudo sobre o comportamento cromossômico permite a seleção de espécies com genótipos mais favoráveis para os cruzamentos interespecíficos (OHRI, 1998), corroborando com o sucesso das hibridações e da viabilidade do híbrido. O caráter híbrido de uma planta pode ser determinado de diversas formas, como por exemplo, pelo número, tamanho e forma dos cromossomos e pelo seu comportamento meiótico (SOARES-SCOTT et al., 2005).

As análises meióticas fornecem informações detalhadas sobre o comportamento cromossômico e sobre a fertilidade de uma espécie, sendo considerada uma ferramenta importante para auxiliar nos cruzamentos interespecíficos dos programas de melhoramento de plantas (KIIHL et al., 2011). O pareamento entre os cromossomos homeólogos, a recombinação cromossômica, o grau de irregularidades meióticas e a viabilidade dos gametas são informações adquiridas por meio das análises meióticas, importantes para o planejamento de hibridações através de gerações (SOUZA et al., 2003a), pois indicam a homologia entre as espécies genitoras e gera indivíduos com características mais desejáveis para o mercado. O pareamento cromossômico é um evento importante na meiose, tanto para ocorrência de recombinação, quanto para a exata segregação dos cromossomos (FACHINETTO; TEDESCO, 2009). Quando ocorre erro no pareamento cromossômico, na manutenção dos bivalentes ou na formação das fibras do fuso, a segregação pode ocorrer de forma desequilibrada e os gametas podem receber uma quantidade desbalanceada de cromossomos, levando à diminuição da quantidade de gametas viáveis (SOUZA et al., 2003a).

Técnicas envolvendo citogenética molecular vêm sendo amplamente utilizadas e tem se mostrado uma excelente ferramenta para o estudo do comportamento meiótico. O uso da hibridação genômica *in situ* (GISH) tem sido empregado para identificar híbridos em diversas famílias de plantas (SILVA; SOUZA, 2013; YOUNIS et al., 2015; SILVA, 2014). A GISH permite identificar a participação de cada genoma parental na formação dos univalentes, bivalentes e multivalentes, assim como observar a ocorrência de pareamento entre cromossomos homeólogos, frequência de recombinação e posição dos quiasmas (GUERRA, 2004; SILVA; SOUZA, 2013; MELO et al., 2015). Essa técnica permite distinguir os genomas parentais nos híbridos, marcando o DNA genômico total de uma espécie e utilizando-o para identificar esses cromossomos no híbrido. Pode também ser utilizado simultaneamente um DNA total marcado e um DNA total não marcado da outra espécie que funcionará como bloqueio desse genoma (GUERRA, 2004).

O presente trabalho teve o objetivo principal realizar análises meióticas nos genitores, *P. gardneri* e *P. gibertii*, e nos híbridos interespecíficos denominados de progênie HD15, visando inferir sobre a compatibilidade genética entre os genitores e implicação da hibridação interespecífica no genoma dos híbridos. Desta forma, os objetivos específicos foram: (i) analisar o comportamento meiótico dos híbridos e compará-los com os genitores; (ii) observar a viabilidade polínica dos genitores e dos híbridos; (iii) aplicar GISH nos híbridos HD15 utilizando como sonda o DNA paterno (*P. gibertii*) e como bloqueio o DNA materno (*P. gardneri*) para observar o pareamento entre cromossomos homeólogos das espécies genitoras nos híbridos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A família Passifloraceae e o gênero *Passiflora* L.

A família Passifloraceae A.L. de Jussieu ex Kunth pertence atualmente à ordem Malpighiales (MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ, 2004), possui 17 gêneros e cerca de 650 espécies. São geralmente plantas trepadeiras herbáceas ou lenhosas, com gavinhas, podendo ser encontradas como ervas e arbustos e são distribuídas nos trópicos e subtropicais quentes, principalmente América e África (FALEIRO et al., 2005; BERNACCI et

al., 2013). O número de espécies dessa família vem aumentando devido às novas descobertas que estão sendo feitas recentemente, tais como *P. cacao* Bernacci & M.M. Souza (BERNACCI; SOUZA, 2012) e *P. pottiae* Cervi & Imig (CERVI; IMIG, 2013).

As principais características da família Passifloraceae são a presença de gavinhas axilares robustas usadas para sustentação, já que são plantas trepadeiras, glândulas extraflorais, flores com uma variedade de cores, presença de corona, folhas alternas simples, androceu com cinco estames, gineceu com três estiletes e as sementes ariladas (KILLIP, 1938; VANDERPLANK, 2000); a flor é hermafrodita e apresenta uma única antese (BRAGA et al., 2005). As espécies, em sua maioria, possuem um mecanismo de autoincompatibilidade (SOUZA et al., 2006), e dependem de agentes polinizadores como alguns insetos e abelhas, entre eles a mais eficiente é a mamangava (*Xylocopa* spp.). Entretanto, a abelha *Apis mellifera* é prejudicial à polinização e o vento não tem contribuição como agente polinizador, pois o pólen é pegajoso e pesado (BRUCKNER et al., 2005). No Brasil são registrados quatro gêneros da família Passifloraceae, *Ancistrothrysus* Harms, *Mitostemma* Mast., *Dilkea* Mast. e *Passiflora* L. (BERNACCI et al., 2013).

O gênero *Passiflora* é o mais rico dentro da família, com cerca de 525 espécies já descritas (CERVI; IMIG, 2013). O Brasil é considerado um importante centro de diversidade do gênero *Passiflora*, com 137 espécies (BERNACCI et al., 2013), muitas delas nativas e de interesse econômico, sendo o Centro - Norte a principal região de distribuição geográfica no país (FALEIRO et al., 2005). O estado da Bahia constitui um centro de expressiva diversidade, com cerca de 31 espécies relatadas, distribuídas em praticamente todos os seus biomas (NETO, 2008), sendo a floresta atlântica do Sul do estado e a Chapada Diamantina os principais centros de diversidade (NUNES; QUEIROZ, 2006).

O gênero *Passiflora* possui ampla variabilidade genética inter e intraespecífica (MELETTI et al., 2005, SOUZA; PEREIRA, 2011; SOUSA et al., 2015) e essa variabilidade é encontrada nas espécies no Brasil, algumas delas com elevada variabilidade fenotípica (BERNACCI et al., 2003; NUNES; QUEIROZ, 2006). Compreende plantas que são comumente conhecidas como maracujazeiros, e o fruto maracujá é denominação indígena, que significa ‘alimento em forma de cuia’, de origem tupi e apresentam ciclo de vida perene ou semi perene (FALEIRO et al., 2005; PEREIRA et al., 2005). São plantas trepadeiras herbáceas ou lenhosas, arbustivas ou arborescentes e com gavinhas. Algumas espécies arborescentes podem chegar a 15 m de altura e possuir 20 cm de diâmetro no caule, como por exemplo, *P. arborea* Spreng (MACDOUGAL; FEUILLET, 2004). As gavinhas, ausentes em

espécies lenhosas e arbustivas, crescem nas axilas das folhas (CUNHA et al., 2002) e gavinhas solitárias é uma característica da família (NUNES; QUEIROZ, 2006).

O maracujazeiro é planta alógama (BRUCKNER et al., 2005), hermafrodita, com flores solitárias ou aos pares, com uma grande variedade de cores, que vai desde o vermelho intenso até flores brancas. Floresce geralmente durante vários meses do ano e as flores permanecem abertas por até um dia. O cálice é formado por cinco sépalas carnosas, membranáceas e ovais. A corona tem cinco pétalas brancas ou coloridas, membranáceas, que se alternam com as sépalas. A corona é formada por um grupo de filamentos dispostos na base do ovário, de cores vivas e atraentes. O androginóforo é uma coluna que está localizada na base central do tubo do cálice e suporta as partes reprodutivas (ULMER; MACDOUGAL, 2004). A corona, juntamente com o androginóforo, caracteriza a família Passifloraceae. O ovário é globuloso, ovóide ou fusiforme, unilocular, multiovulado com placentação parietal. Os estiletos, em número de três, são distintos ou unidos na base e cilíndricos. O androceu é formado por cinco estames com filetes livres e as anteras são dorsifixas (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004; NUNES; QUEIROZ, 2006).

Na maioria das espécies as folhas são geralmente simples e alternadas, elípticas ou orbiculares, pecioladas, inteiras ou lobadas, a margem foliar é geralmente inteira, serrada ou dentada, de base arredondada, truncada ou cuneada. O pecíolo pode conter glândulas e mede em geral de 1 a 5 cm (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Os frutos podem ser como bagas ou como cápsulas, geralmente indeiscentes, muito diversificados em forma, tamanho e cor, podendo ser globosos, elipsoides ou ovoides e de coloração amarela, vermelha ou roxa, com grande número de sementes. Suas sementes apresentam diversos formatos, podendo ser compridas, reticuladas, pontuadas e são consideradas ortodoxas ou ortodoxas intermediárias, que toleram baixa umidade. São revestidas por um arilo mucilaginoso ou aquoso e o endosperma é oleoso e proteico (NUNES; QUEIROZ, 2006; VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

2.2 Potencial ornamental das passifloras

O cultivo das passifloras como planta ornamental em casas de vegetação teve início no século XVII, por volta de 1625, na Europa, com as espécies *P. caerulea* L. e *P. incarnata* L (PEIXOTO, 2005). O maracujazeiro foi, provavelmente, a planta americana que mais encantou os europeus, não só pelas belas flores como também pela propagação de sua flor com um sentido religioso. O nome *Passiflora* ou flor da paixão, nome pouco popular no

Brasil, se deve a descoberta da primeira espécie (*P. incarnata* L.) e a morfologia da flor e das folhas representavam para os homens de fé símbolos da Paixão de Cristo. Tal correlação foi explicada por Frei Vicente, onde as folhas, em forma de lança, representavam a lança que transpassou Jesus; as gavinhas representava o açoite; a corona representava a coroa de espinhos; os três estiletos simulavam os três cravos e as cinco anteras as chagas de Cristo crucificado (CERVI, 1997; FALEIRO et al., 2005).

As passifloras até hoje despertam o interesse das pessoas devido, principalmente, a beleza exótica de suas flores (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004), e estão inseridas na lista de plantas ornamentais por possuírem flores vistosas, de coloração intensa e brilhante, grande quantidade de flores, florescer mais de uma vez por ano e pela presença de corona, que é uma característica exclusiva da família Passifloraceae (ABREU et al., 2009). Outra característica importante é a ampla variedade dos formatos das folhas dentro do gênero que a torna interessante no comércio de plantas ornamentais apenas em função das folhagens (ABREU et al., 2009).

Devido a todos os atributos estéticos de suas flores e folhas exóticas e da ampla variabilidade inter e intraespecífica (MELETTI et al., 2000), as passifloras foram utilizadas para ornamentações no ‘Velho Mundo’ e até hoje são utilizadas como elemento decorativo, seja para causar um efeito harmonioso entre vaso e planta, decorar ambientes internos e sombreados (PEIXOTO, 2005; SOUZA, 2006), ou para uso em ambientes externos como cercas, muros, estufas e pérgolas (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Na Europa e nos Estados Unidos o uso das passifloras como planta ornamental já é consolidado há mais de um século e são atualmente utilizadas na ornamentação dos jardins, muros, cercas, além de ser fonte de renda de diversos produtores (RUSHING, 2003; VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

O Brasil, embora seja considerado o centro de diversidade do grupo, possui uma ampla variabilidade genética e ter um clima tropical favorável, não se destaca no uso das passifloras como planta ornamental. Apesar do grande valor econômico do maracujá, é incipiente o número de cultivares comerciais lançados no mercado e os programas de melhoramento visam especificamente o aumento da produtividade dos frutos, resistência a doenças e o consumo *in natura* e pouco se faz para identificar espécies e obter híbridos ornamentais mais adaptados às diversas regiões do país (FALEIRO et al., 2005; PEIXOTO, 2005; SOUZA et al., 2003b).

Em 1819, o inglês Thomas Milne conseguiu produzir o primeiro híbrido artificial a partir do cruzamento de *P. caerulea* com *P. racemosa*, obtendo assim *P. ‘Violacea’*, que

permanece em cultivo até hoje (PEIXOTO, 2005). Desde então, já foram produzidos e registrados uma imensa quantidade de híbridos para serem utilizados na ornamentação com flores e folhas que atendam a todos os gostos e ambientes (<http://www.passiflorasociety.org>). No Brasil existem poucos relatos da utilização da *Passiflora* exclusivamente ornamental. Na região Norte há relatos do uso de *P. coccinea* Aubl e no nordeste da *P. cincinnata* Mast. como planta para ornamentação (PEIXOTO, 2005).

A espécie *P. caerulea* é utilizada apenas para fins ornamentais na formação de cercas-vivas (MELETTI et al., 2005). No sudeste do Brasil utiliza-se a *P. alata* Dryand e *P. edulis* Sims em cercas ou pérgolas para aproveitar os frutos, e como consequência apreciar a beleza e o perfume das flores. Algumas revistas de paisagismo e decoração vêm divulgando a *P. alata* como a espécie mais utilizada para ornamentar ambientes externos e para os interiores (PEIXOTO, 2005; DURANTE, 2013; CARINI, 2014).

A Embrapa lançou as primeiras variedades de híbridos de *Passiflora* ornamental no Brasil: BRS Estrela do Cerrado, BRS Roseflora e BRS Rubiflora (JUNQUEIRA et al., 2007; FALEIRO et al., 2007a; 2007b). A preservação do germoplasma de passifloras é feito em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), a maioria instalada em instituições públicas de pesquisa. Os principais BAGs nacionais estão na UNESP, em Jaboticabal (SP); no Instituto Agrônomo em Campinas (SP); no IAPAR em Londrina (PR); na Embrapa Cerrados/UnB em Planaltina (DF); na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical em Cruz das Almas (BA); na UESB em Vitória da Conquista (BA) e no Instituto Plantarum em Nova Odessa (SP) (MELETTI et al., 2005). Em 2004 foi criado o Banco Ativo de Germoplasma (BAG Passifloras), na UESC em Ilhéus (BA) voltado para o melhoramento genético de espécies de *Passiflora* silvestres e a criação de híbridos com características únicas para o mercado de plantas ornamentais (SOUZA, 2006).

2.3 Híbridações em passifloras

O primeiro híbrido de *Passiflora* foi obtido através de reprodução sexuada por Thomas Milne, segundo a fórmula de hibridação descrita por Jean-Louis-Auguste-Loiseleur-Destongchamps e foi denominado de *P. 'Violacea'* (PEIXOTO, 2005; VANDERPLANK, 2000). Ainda é desconhecido para qual finalidade foi obtido esse híbrido, mas acredita-se que tenha sido para fins de ornamentação, já que só depois da obtenção desse híbrido que surgiu a necessidade de expandir a ideia de hibridação de passifloras para uso ornamental pela Europa (ABREU et al., 2009).

Entende-se por híbrido, o cruzamento interespecífico entre dois genitores com genótipos diferentes que irá originar um indivíduo com características intermediárias e que carregam genes alelos de interesse. O tipo mais comum de hibridação envolve indivíduos de espécies que se reproduzem de forma sexuada por polinização cruzada e como consequência do cruzamento dão origem a descendentes variáveis, resultantes da segregação e recombinação de genes (ALLARD, 1971; VANDERPLANK, 2000; GRIFFITHS et al., 1998).

Numerosas combinações híbridas de *Passiflora* têm sido produzidas, com a finalidade exclusivamente ornamental (VANDERPLANK, 2000). Nos programas de melhoramento, a hibridação interespecífica é bastante utilizada e o sucesso nas hibridações depende de uma série de fatores incluindo a compatibilidade genética entre as espécies envolvidas no cruzamento e a homologia cromossômica para obter híbridos mais viáveis (PEREIRA et al., 2005).

Em *Passiflora*, a técnica de hibridação é relativamente simples (MELETTI et al., 2005), uma vez que na maioria das espécies o florescimento é abundante e ocorre durante quase todo o ano, com flores grandes assim como, as anteras e os estigmas o que facilita a polinização (BRUCKNER; OTONI, 1999). Entretanto, deve-se salientar a existência de híbridos naturais ocasionados por diversos fatores evolutivos, mas principalmente pelo mecanismo de autoincompatibilidade comum as espécies de maracujazeiro (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002). O processo de incompatibilidade pode ocorrer em qualquer estágio, podendo ser desde a polinização até a fertilização (BRUCKNER et al., 1995). A autoincompatibilidade é a incapacidade de uma planta fértil, quando autopolinizada, de produzir sementes viáveis, sendo uma barreira reprodutiva para diversas espécies. É um mecanismo fisiológico, com base genética e é resultante do fracasso do grão de pólen da própria planta de aderir ou germinar no estigma (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

No maracujazeiro a autoincompatibilidade pode ser útil na produção de híbridos, pois torna necessário, quase sempre, a polinização cruzada (BRUCKNER et al., 2005). A técnica de hibridação sexuada é muitas vezes limitada pela incompatibilidade que pode se tornar uma barreira na hibridação (PAYÁN; MARTIN, 1975). As hibridações interespecíficas não têm sido exploradas adequadamente pelos programas de melhoramento e no Brasil, muitos híbridos apresentam problemas de desenvolvimento, suscetibilidade às doenças, macho esterilidade, baixa viabilidade polínica, baixo florescimento em alguns cruzamentos, entre outros (MELETTI; BRUCKNER, 2001; OLIVEIRA; RUGGIERO, 1998). Embora existam

algumas dificuldades na obtenção de híbridos através da hibridação sexuada, essa técnica é uma ferramenta muito importante, pois possibilita a introgressão de novos genes de interesse e uma maior variabilidade genética, além de ser um método simples (SIQUEIRA et al., 1988; VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

No Brasil, a maioria dos híbridos obtidos envolve cruzamentos de *P. edulis* f. *edulis* e algumas espécies silvestres com o objetivo de obter cultivares de maracujá comercial resistente a doenças e com alta produtividade (JUNQUEIRA et al., 2005). Essa espécie é considerada um ótimo progenitor por florescer abundantemente de outubro a maio, em regiões paulistas, e durante o ano inteiro em regiões tropicais (MELETTI; BRUCKNER, 2001). Entretanto, com o avanço do uso de passifloras com a finalidade ornamental, a produção de híbridos tem ganhado mais espaço e vários híbridos estão sendo obtidos com essa finalidade (BELO, 2010; ABREU et al. 2009; SANTOS et al., 2012). Foram obtidos híbridos interespecíficos do cruzamento de sete espécies de *Passiflora* com finalidade ornamental e esses híbridos foram retrocruzados para obter progênies de cruzamentos entre híbridos e verificar a compatibilidade reprodutiva entre os genitores (CONCEIÇÃO et al., 2011).

A hibridação somática por fusão de protoplastos é uma técnica biotecnológica considerada eficiente em passifloras para superar a barreira da incompatibilidade cruzada entre as espécies (BARBOSA; VIEIRA, 1997; LIMA et al., 2000). A técnica consiste na fusão de protoplastos, que são células desprovidas de parede celular, por ação enzimática e combina o genoma nuclear das espécies genitoras, formando indivíduos poliploides que carregam alelos de ambos os pais (GROSSER; GMITTER, 1990). As técnicas biotecnológicas utilizadas para as hibridações podem contribuir para a transferência de genes entre espécies nas quais o cruzamento convencional não é possível (VANDERPLANK, 2000). Dessa forma, híbridos de *Passiflora* estão sendo obtidas através de hibridação sexuada (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004; KING, 2011) ou somática (BARBOSA; VIEIRA, 1997; LIMA et al., 2000) e ambas as técnicas estão dando resultados positivos em passifloras (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004; PAYÁN; MARTIN, 1975).

2.4 As espécies *Passiflora gibertii* N.E. Brown e *P. gardneri* Mast.

A espécie *Passiflora gibertii* N.E. Brown é liana e pode crescer alcançando vários metros de altura, podendo ser encontrada nas margens de estradas. É uma espécie heliófita, possui folhas trilobadas e flores com pétalas e sépalas de coloração branca, medindo entre 7 e

8 cm de diâmetro e em condições normais produz de 10 a 30 folhas por dia (PEIXOTO, 2016; VANDERPLANK, 2000). Pode ser encontrada na Argentina, no Paraguai e, no Brasil, essa espécie é encontrada no estado do Mato Grosso, sendo endêmica desse estado (PEIXOTO, 2016). Floresce e frutifica de dezembro a março e seus frutos são bastante apreciados por diversas espécies de pássaros (CERVI, 1997).

Existem relatos que citam *P. gibertii* como uma das espécies silvestres que possuem resistência à morte precoce, à bacteriose e a outras doenças causadas por patógenos do solo, além do interesse ornamental pelas belas flores e folhas (JUNQUEIRA et al., 2005; MELETTI; BRUCKNER, 2001; FISCHER et al., 2005). Essa espécie é bastante utilizada como porta enxerto e para o melhoramento genético, sendo ideal como porta enxerto para *P. edulis* por apresentar resistência à bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, uma praga que acomete a maioria dos pomares de maracujá no Brasil (JUNQUEIRA et al., 2005; LIMA, 2005; FISCHER et al., 2007), e também na conservação de encostas (VANDERPLANK, 2000).

Passiflora gardneri Mast. se encontra distribuída geograficamente no estado de Goiás, mais precisamente na cidade de Almas e por esse motivo entende-se que pode se tratar de uma espécie endêmica do país (CERVI, 1997). É uma espécie heliófita que necessita de níveis elevados de luz intensa e não tolera sombreamento. Desenvolvem-se na orla de florestas ciliares, capoeiras e capoeirões. Suas folhas são trilobadas com flores roxas medindo entre 6 e 7 cm. Floresce e frutifica de setembro a março, apresentam 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, com corna dividida em cinco séries de filamentos (PEIXOTO, 2016; CERVI, 1997).

Na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) essas duas espécies estão sendo utilizadas em programas de melhorando para produção de híbridos ornamentais e a hibridação tem sido bem sucedida. Suas belas flores e folhas foram as características principais para a utilização dessas espécies no programa e alguns híbridos já foram produzidos e registrados na Sociedade Internacional de *Passiflora* (<http://www.passiflorasociety.org>) como *P.* ‘Gabriela’ (#170) e *P.* ‘Bella’ (#171) (BELO, 2010).

2.5 Comportamento meiótico

Cromossomos são estruturas essenciais na organização e estruturação genômica de organismos eucarióticos. Seu comportamento na reprodução controla os mecanismos de

herança e sua organização regula a atividade gênica no processo de divisão celular (SUMNER, 2003).

Todas as células totipotentes ou com pouca diferenciação possuem a capacidade de crescer e se reproduzir. Esse processo é chamado de ciclo celular e mantém a vida em organismos pluricelulares e replica organismos unicelulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). A mitose é o processo pelo qual os organismos pluricelulares aumentam o número de células somáticas pela segregação cromossômica igualitária da célula mãe para cada polo celular, originando duas células-filhas idênticas entre si. Todo esse processo exige uma replicação cromossômica precisa, a qual ocorre na fase de síntese (fase S) e é assegurada por pontos de checagem que garantem que os eventos subsequentes do ciclo celular ocorram corretamente (SUMNER, 2003). Durante o ciclo celular a segregação cromossômica também deve ser precisa para garantir a estabilidade do ciclo. O ponto de checagem das fibras do fuso regula a segregação detectando os cromossomos que não estão ligados aos microtúbulos do fuso, a perda de tensão dos cromossomos que estão alinhados na placa metafásica e impede a progressão do ciclo celular para a anáfase, mantendo os cromossomos na metáfase até que todos os cinetócoros estejam capturados pelas fibras (GORBSKY, 2014).

Em organismos de reprodução sexuada, células que estão presentes nos órgãos sexuais femininos e masculinos sofrem duas divisões consecutivas, uma reducional e outra equacional, reduzindo à metade seu conteúdo cromossômico. Esse processo é denominado meiose formando organismos geneticamente distintos dos genitores graças à recombinação meiótica (JOHN; LEWIS, 1973). Em plantas, a androsporogênese resulta em quatro andrósporos haploides, enquanto que a ginosporogênese resulta em um ginósporo haploide (MURPHY; BASS, 2012).

Durante a reprodução sexuada, a união de duas células haploides restaura o estado diploide do organismo (SINGH, 2003). A recombinação de genes que acontece por meio do *crossing over* é essencial na adaptação das populações e na evolução dos seres vivos (GUERRA, 1988). A meiose é um evento controlado por genes e de alta estabilidade evolutiva, entretanto mutações nos genes responsáveis pelo controle meiótico podem resultar em anormalidades, afetando diretamente a fertilidade do organismo (KARSBURG; BATTISTIN, 2006).

Na primeira divisão meiótica, ocorre a segregação de cromossomos homólogos (divisão reducional) e na segunda divisão ocorre a segregação das cromátides irmãs (divisão equacional), e cada célula filha carrega a metade do material genético dos pais (ZAMARIOLA et al., 2014). Na metáfase I os cromossomos homólogos se repelem e ficam

ligados apenas pelos quiasmas. Todos esses eventos da meiose também são precisamente controlados por pontos de checagem e alguns mutantes meióticos, principalmente os sinápticos, ignoram esses pontos (SINGH, 2003). Quando o cinetócoro de pelo menos um cromossomo não está capturado pelas fibras do fuso na metáfase I ou II, ou quando os cromossomos não estão todos alinhados na placa metafásica, proteínas que regulam o ciclo sinalizam para pausar a divisão celular. Este atraso fornece tempo para que as células corrijam o erro e garantam a perfeita segregação cromossômica (YAMAMOTO et al., 2008).

Mutações podem mudar drasticamente o comportamento normal dos cromossomos e as etapas da meiose com sérias consequências, produzindo gametas anormais ou inviáveis. Mutações ocorrem antes da meiose, durante as etapas da meiose e após a meiose II e podem alterar a divisão e reduzir a viabilidade de sobrevivência de uma planta. As mutações que impedem o pareamento de cromossomos homólogos, a formação do complexo sinaptonêmico, o *crossing over* e a formação dos quiasmas são denominadas assinápticas e ocorrem nas primeiras subfases da prófase I (SINGH, 2003).

Outras mutações também ocorrem na prófase I e podem desfazer o complexo sinaptonêmico antes da fase correta. Essas mutações ocorrem em mutantes denominados dessinápticos e pode causar o pareamento incompleto entre cromossomos homólogos com consequências na taxa de recombinação, diminuição na quantidade de quiasmas e formação de cromossomos univalentes, com posterior segregação irregular na anáfase e desbalanceamento cromossômico ao final da meiose (SINGH, 2003). Alguns estudos mostram que durante a prófase da meiose, os telômeros ficam organizados em contato com a membrana nuclear num arranjo conhecido como buquê. O buquê é exclusivo da meiose e contribui no reconhecimento dos cromossomos homólogos para a sinapse e pareamento cromossômico (BASS et al., 2003).

A correta disjunção cromossômica na meiose é essencial para a formação de gametas haploides e falhas nesses processos levam à formação de gametas desbalanceados e plantas aneuploides (ZAMARIOLA et al., 2014). A meiose requer mecanismos bem elaborados para o pareamento dos cromossomos, formação de *crossing over* e a disjunção correta de todos os pares de cromossomos homólogos. Técnicas de citogenética utilizando microscopia eletrônica, hibridação fluorescente *in situ* (FISH – *Fluorescent in situ Hybridization*), dentre outras, facilitam a observação do comportamento dos cromossomos na meiose (MURPHY; BASS, 2012).

Desde o início da década de 1970, diversas técnicas de citogenética clássica vêm sendo utilizadas para análises cromossômicas, baseadas na morfologia cromossômica, tais

como: tamanho do braço, posição do centrômero, números cromossômicos, entre outros (SILVA; SOUZA, 2013). Recentemente, os avanços nas técnicas de citogenética têm melhorado e contribuído para o estudo detalhado dos cromossomos, desde a análise do cariótipo até a localização exata de determinado gene de interesse (YOUNIS et al., 2015). A técnica de hibridação *in situ* consiste em parear determinado segmento de DNA ou RNA, marcado com algum fluorocromo, com uma sequência nucleotídica complementar dentro de uma determinada célula de interesse. Tanto a FISH quanto a hibridação genômica *in situ* (GISH – *Genomic in situ Hybridization*) vem contribuindo muito para análise da citogenética vegetal, permitindo estabelecer novos marcadores, localização de genes e sequências repetitivas, contribuir para a criação de mapas físicos de diferentes espécies de plantas e para análise de híbridos naturais e artificiais (GUERRA, 2004). O estudo do comportamento meiótico de plantas e a observação de irregularidades na meiose podem afetar a fertilidade de um indivíduo e interferir nos programas de melhoramento de plantas.

2.6 Estudo da meiose associado ao melhoramento de plantas

A diversidade genética das espécies de plantas vem sendo explorada e essa variação é capaz de aumentar a produtividade agrícola e produzir culturas mais viáveis economicamente (HARRISON et al., 2010). Para aumentar essa diversidade e a eficiência das culturas é importante compreender o mecanismo que gera variabilidade e como essa variação é gerada e transmitida (HARRISON et al., 2010). A meiose representa uma série de eventos altamente conservados e coordenados e estudos citológicos e moleculares vêm sendo realizados em diferentes organismos para compreender como o material genético é passado de geração para geração (BOATENG et al., 2008). A formação de um complexo sinaptonêmico, permitindo o pareamento entre os cromossomos homólogos e a recombinação meiótica é característica da prófase I da meiose e é pré-requisito para a divisão reducional (BASS et al., 2003).

Os trabalhos com melhoramento de plantas tiveram início por volta do século XX e desempenham um papel importante no aumento da produtividade e melhoria de características de espécies de interesse agrônomo (PAGLIARINI, 2001). O estudo da meiose em plantas tem sido relevante para o melhoramento genético, considerando que na meiose ocorre a recombinação de genes (FACHINETTO; TEDESCO, 2009). A compreensão da fertilidade de espécies selecionadas para os programas de melhoramento genético e hibridação intra ou interespecífica aumenta as chances dos cruzamentos serem bem sucedidos (MARTINS et al., 2010).

Hibridações interespecíficas são realizadas em programas de melhoramento, muitas vezes visando à introgressão de genes de resistência. Em três espécies silvestres da família Caricaceae, *Vasconcellea goudotiana*, *Vasconcellea quercifolia* e *Jacaratia spinosa*, que são bastante promissoras para os programas de melhoramento do mamão papaya por apresentarem resistência a doenças e ao frio, foi observado o comportamento meiótico. A meiose dessas espécies foi parcialmente normal, apresentando viabilidade polínica com valores satisfatórios, variando de 68% em *V. goudotiana* a 96% em *J. spinosa*. Esse estudo sugere que em programas de hibridação a espécie silvestre *V. goudotiana* pode ser utilizada como genitor materno, já que essa espécie obteve o menor índice meiótico e a menor viabilidade polínica, se comparada às outras espécies estudadas (SILVA et al., 2012).

Estudos meióticos têm relevância na seleção de espécies para as hibridações interespecíficas como alternativa na introgressão de genes de resistência de espécies silvestres em cultivares. Três espécies de *Passiflora* foram analisadas quanto ao comportamento meiótico, *P. setacea*, *P. incarnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo essa última uma espécie de grande importância econômica, entretanto é muito suscetível a doenças. O estudo do comportamento meiótico evidenciou pareamento cromossômico regular nas três espécies de *Passiflora* estudadas, que comprovaram a presença de nove bivalentes e conseqüentemente as fases da meiose foram regulares com poucas anormalidades e formação de grãos de pólen viáveis, o que pode favorecer a utilização dessas espécies em hibridações interespecíficas (SOARES-SCOTT et al., 2003). O comportamento meiótico de genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa* identificados como autocompatíveis, apresentando flores totalmente brancas, foi regular com índice meiótico (IM) de 96,3%, comparado ao genótipo autoincompatível, com IM de 97,7%, indicando os genótipos autocompatíveis promissores para o uso em programas de melhoramento do maracujazeiro azedo (SOUZA et al., 2010a).

A variação do número cromossômico, quando não conhecida, dificulta o melhoramento genético via hibridação. Estudos do número cromossômico e do comportamento meiótico foram realizados para identificar e explicar os altos índices de gametas inviáveis em acessos e híbridos de *Brachiaria brizantha* (Gramineae). A análise realizada em 22 acessos dessa espécie revelou a existência de 18 tetraploides, um diploide e três hexaploides. Foi identificado comportamento meiótico altamente irregular nos hexaploides e em tetraploides, com altos índices de grãos de pólen inviáveis sugerindo que esses acessos não sejam utilizados como genitores em programas de melhoramento (MENDES-BONATO et al., 2002).

Avaliação do comportamento meiótico de diversas espécies de plantas permitiu identificar anormalidades que afetam a fertilidade, e algumas mutações que podem ser exploradas com sucesso pelos programas de melhoramento, principalmente pela total macho-esterilidade (PAGLIARINI, 2000). No macho-estéril, o grão de pólen é inviável e não pode germinar nem fecundar para produzir sementes, sendo que o sistema reprodutor feminino geralmente não é alterado. Em triticale a instabilidade meiótica devido à ocorrência de cromossomos retardatários, formação de micronúcleos nas tétrades, segregação irregular e grãos de pólen inviáveis levam a ocorrência de macho-esterilidade. Essa condição pode ser bastante explorada em programas de melhoramento com o objetivo de produzir sementes híbridas, pois evita autofecundação, entretanto, esses indivíduos devem ser cuidadosamente selecionados devido às diversas irregularidades meióticas (GUERRA, 2008).

A análise meiótica pode ser importante para selecionar linhagens que apresentem estabilidade meiótica e que possuam altos índices de grãos de pólen viáveis para contribuir no planejamento dos programas de melhoramento. Doze linhagens de *Capsicum* L. foram estudadas quanto ao comportamento meiótico e a viabilidade polínica para identificar quais desses materiais poderiam ser utilizados em programas de melhoramento. A análise da meiose mostrou comportamento normal na maioria das linhagens durante as fases da meiose e alto percentual de viabilidade polínica, exceto em três linhagens, CNPH 0283, CNPH 3000 3 CNPH 3773 que apresentaram menor percentual de grãos de pólen viáveis, com 77, 66 e 58%, respectivamente (POZZOBON et al., 2011). Esses resultados indicam a importância dos estudos citológicos para auxiliar na seleção de genótipos que apresentem estabilidade meiótica e sejam potencialmente férteis para os programas de melhoramento.

Genomas considerados instáveis quanto ao comportamento meiótico podem ser resultado de alterações evolutivas em algumas espécies. A observação do comportamento meiótico em espécies diploides de *Solanum*, *S. macrocarpon*, *S. aethiopicum*, *S. gilo*, *S. anguivi* e *S. melongena*, demonstrou genomas instáveis, com elevada ocorrência de pontes cromossômicas e anáfase desigual, que levou a formação de grãos de pólen inviáveis. A análise do comportamento meiótico dessas espécies indicou a necessidade de seleção cuidadosa no uso delas como genitoras em programas de melhoramento por causa da instabilidade meiótica e da baixa viabilidade polínica que poderá ocasionar infertilidade nas plantas (OYELANA; NWANGBURUKA, 2013). Estudos com *Arabidopsis* e autotetraploides revelaram que as taxas de recombinação meiótica foram significativamente mais elevadas em tetraploides, com formação de multivalentes, quando comparados com os diploides. Essas análises mostraram que o sucesso evolutivo de plantas poliploides na natureza pode estar

relacionado com o aumento na recombinação cromossômica, aumentando assim a diversidade genética e o potencial de adaptação em ambientes naturais mais desfavoráveis. Além disso, o genoma duplicado dos poliploides pode ajudar a estabilizar o conjunto cromossômico, com uma segregação em anáfase regular e melhorar a formação de bivalentes em alotetraploides, aumentando assim a diversidade genética e contribuindo no melhoramento de plantas (PECINKA et al., 2011).

2.7 Estudo do comportamento meiótico em híbridos

A meiose em híbridos é um evento importante, sendo um dos fatores que determina a sua fertilidade. Um híbrido só será fértil ou terá algum grau de fertilidade, quando apresentar uma meiose regular e, conseqüentemente, a produção de gametas viáveis. A presença de irregularidades cromossômicas durante a meiose pode afetar significativamente a estabilidade genética, o índice meiótico e a viabilidade polínica em híbridos. Sendo assim, uma das conseqüências da hibridação pode ser a redução da fertilidade ou total esterilidade dos híbridos em comparação com as espécies genitoras. Devido às alterações que podem ocorrer na formação de novos híbridos, a análise da meiose permite verificar como esse evento ocorre em híbridos, se há irregularidades e se essas irregularidades estão afetando a fertilidade do híbrido. As alterações meióticas mais frequentes encontradas em híbridos são a presença de univalentes, multivalentes, pontes anafásicas, fragmentos de cromossomos, cromossomos retardatários e precoces e micronúcleos.

Em programas de melhoramento, os cruzamentos são ferramentas valiosas para gerar variabilidade em plantas cultivadas (PAGLIARINI, 2001). A análise meiótica associada ao melhoramento reduz o tempo necessário para a produção de novas cultivares híbridas, uma vez que, híbridos com irregularidades meióticas e/ou grãos de pólen inviáveis podem ser descartados, e assim, permitir a seleção de genótipos mais estáveis (POZZOBON et al., 2011). Normalmente, híbridos resultantes de cruzamentos entre espécies com genomas semelhantes tendem a apresentar alto índice de pareamento entre os cromossomos homeólogos, enquanto que, em espécies que estão distantes geneticamente, o pareamento entre os cromossomos homeólogos não ocorre ou ocorre em um nível muito baixo e o híbrido não consegue passar por uma meiose regular e ter algum grau de fertilidade (LEE et al., 2011). Dessa forma, a distância genética pode ser um fator limitante em cruzamentos. Em híbridos de *Paphiopedilum delenatii* vs. *P. callosum* e *P. delenatii* vs. *P. glaucophyllum* foram observados muitas irregularidades meióticas e baixos índices de pareamento

cromossômico, o que reflete a distância genética entre as espécies genitoras (LEE et al., 2011).

Investigações meióticas têm sido realizadas em acessos de pimenta para utilização desses genótipos em hibridações. A hibridação *C. baccatum* L. vs. *C. chinense* Jacq. ($2n = 24$) resultou em baixa taxa de fertilidade; análises meióticas nas progênes híbridas demonstraram irregularidades meióticas como presença de cromossomos retardatários e univalentes, pontes cromossômicas, assimetria na formação das fibras dos fusos e citomixia, tornando esse cruzamento pouco viável para a obtenção de cultivares (SOUZA et al., 2012).

A utilização de dados sobre o pareamento cromossômico é útil na seleção de genótipos para programas de melhoramento, já que o grau de homologia entre cromossomos homeólogos nos híbridos demonstra o grau de relacionamento entre os genitores (TECHIO; DAVIDE, 2007). O pareamento cromossômico de duas espécies tetraploides, *Arachis glabrata* e *A. nitida* ($2n = 4x = 40$) produziu diferentes configurações em diacinese e metáfase I. Em *A. glabrata* foi encontrado 21 configurações diferentes desde a formação de 20II até a formação de 4II + 8IV e em *A. nitida*, sete configurações, desde 20II, 2I + 12II + 2III + 2IV. A associação de 8IV observada em *A. glabrata* pode ser um indicativo de que essa espécie surgiu de um autopoliploide (ORTIZ et al., 2011). A ocorrência de bivalentes e multivalentes é considerada como indicativo de recombinação meiótica, e o sucesso das hibridações depende da eficiência da recombinação.

Muitas espécies silvestres carregam características interessantes para serem exploradas nos programas de melhoramento e a capacidade de produzir híbridos interespecíficos é bem relevante. Dessa forma, a hibridação pode produzir híbridos interespecíficos diploides e poliploides e introduzir genes desejáveis a partir de germoplasma exótico (MARTINEZ-PEREZ; MOORE, 2008). A observação do comportamento meiótico e da viabilidade polínica de espécies silvestres pode fornecer informações importantes sobre seu genoma, índice de recombinação, grau de irregularidade e viabilidade dos gametas para que cruzamentos sejam bem sucedidos na utilização dessas espécies em programas de hibridações interespecíficas (SOUZA et al., 2003a).

A análise do comportamento cromossômico na meiose também pode contribuir com estudos de relações filogenéticas e a similaridade entre genomas de espécies diferentes e, assim, estimar a frequência de recombinação que poderá ocorrer nos híbridos interespecíficos, contribuindo com os programas de melhoramento genético (TECHIO; DAVIDE, 2007). Híbridos interespecíficos de *Brassica* foram produzidos para identificar a relação entre os genomas de três espécies, *B. rapa* ($2n = 20$, AA), *B. nigra* ($2n = 16$, BB) e *B. oleracea* ($2n =$

18, CC) por meio de análises de pareamento cromossômico na meiose. Três indivíduos alotetraploides de *Brassica* foram produzidos, *B. juncea* ($2n = 4x = 36$, AABB), *B. napus* ($2n = 4x = 38$, AACC) e *B. carinata* ($2n = 4x = 34$, BBCC) derivadas de cruzamentos entre as espécies diploides; o estudo do comportamento desses híbridos mostrou que os genomas A e C divergiram mais recentemente a partir de um mesmo ancestral comum e o genoma B é mais distante (MASON et al., 2011). Em *Paphiopedilum*, o comportamento cromossômico na metáfase I de oito híbridos foi analisado para identificar homologia no genoma das espécies genitoras e fornecer informações úteis na criação de programas de melhoramento dessa espécie. O pareamento cromossômico nos híbridos do cruzamento de *P. delenatti* vs. *P. bellatulum* ($2n = 26$) apresentou, em média, 6,9 univalentes e 10,7 bivalentes por meiócito, já nos híbridos de *P. delanatii* vs. *P. micranthum* ($2n = 26$) foram observados 3,1 univalentes e 11,6 bivalentes, sugerindo maior homologia entre o genoma dessas duas últimas espécies (LEE et al., 2011).

Em uma variedade de arroz foram identificados cinco mutantes completamente estéreis, que apresentavam crescimento vegetativo normal e se distinguiam do tipo selvagem através da morfologia da planta durante a fase vegetativa. Foi observada a frequência de quiasmas em ambos os genótipos e durante a diacinese até a metáfase I foi identificada a presença de muitos univalentes e um número reduzido de bivalentes (2,03 por célula) nos mutantes quando comparados com o tipo selvagem (12 por célula). Além disso, os grãos de pólen dos genótipos mutantes foram considerados vazios ou encolhidos, confirmando a esterilidade dos indivíduos (LUO et al., 2013).

Em híbridos triploides ($2n = 3x = 21$) resultantes do cruzamento entre capim elefante (*Pennisetum purpureum*, $2n = 4x = 28$) com milheto (*Pennisetum glaucum*, $2n = 2x = 14$) foram observadas várias alterações cromossômicas como formação de univalentes e multivalentes, ascensão precoce de cromossomos na primeira e segunda divisão meiótica, segregação irregular, pontes na anáfase, cromossomos aderentes, assincronia, formação de células com tamanhos desiguais, citomixia, fuso anormal, células binucleadas e formação de micronúcleos (TECHIO et al., 2006a). Essas alterações ocorreram devido à natureza triploide dos híbridos onde o pareamento e a segregação cromossômica é sempre irregular e leva a total esterilidade da planta.

O estudo de três híbridos de *Passiflora*, *P.* 'Alva', *P.* 'Aninha' e *P.* 'Priscilla' resultantes do cruzamento *P. sublanceolata* vs. *P. foetida* var. *foetida* demonstrou comportamento regular na meiose, tanto nos genitores quanto nos híbridos, com alto índice de pareamento cromossômico e formação de quiasmas, o que permitiu reconhecer o grau de

relação genética entre os genitores (SANTOS et al., 2012). No híbrido somático ($4n = 4x = 36$), obtido do cruzamento *P. edulis* f. *flavicarpa* ($2n = 18$) vs. *P. amethystina* ($2n = 18$) pela fusão de protoplastos, foram observados pelo menos 14 bivalentes na maioria das células (96,7%). No entanto, anormalidades tais como univalentes, quadrivalentes, cromossomos retardatários e pontes anafásicas também foram observadas (BARBOSA; VIEIRA, 1997). Já no híbrido somático ($4n = 4x = 36$) obtido do cruzamento *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. cincinnata* ($2n = 18$), foi observada a formação de 18 bivalentes na maioria das células, revelando uma estabilidade na meiose (BARBOSA et al., 2007). O estudo do comportamento meiótico em um híbrido sexual (*P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. setacea*, $2n = 18$) e um híbrido somático (*P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. incarnata*, $2n = 36$) mostrou a formação de bivalentes e multivalentes em metáfase I e a presença de algumas anormalidades nas diferentes fases da meiose; esses híbridos produziram grãos de pólen viáveis e podem ser utilizados no melhoramento do maracujazeiro (SOARES-SCOTT et al., 2003).

O cruzamento entre espécies com diferentes números cromossômicos pode ser dificultado, uma vez que o número cromossômico é um fator limitante para que ocorra uma meiose regular com todos os cromossomos pareados na meiose I. O cruzamento interespecífico entre *P. sublanceolata* ($2n = 22$) vs. *P. cincinnata* ($2n = 18$), teve insucesso provavelmente devido ao fato delas possuírem número cromossômico diferente (CONCEIÇÃO et al., 2011). O pareamento e a recombinação entre cromossomos de espécies relacionadas não ocorre somente pela presença de sequências repetitivas, que podem ser semelhantes nos cromossomos. Estudos feitos em cereais e gramíneas revelaram que existem regiões gênicas altamente conservadas e que o pareamento e a recombinação entre cromossomos homeólogos ocorrem em grande parte nessas regiões gênicas ou em regiões com muita homologia (MARTINEZ-PEREZ; MOORE, 2008).

2.8 Pós-meiose

Ao final da meiose II é formada uma estrutura com quatro células haploides, conhecida como tétrade, confirmando que uma célula ao passar pelo processo de meiose dá origem a quatro células filhas com metade do número cromossômico; essa estrutura é envolta por uma parede de calose que irá se dissolver liberando os andrósporos e passará pela androgametogênese para dar origem ao grão de pólen (PAGLIARINI; POZZOBON, 2004). Irregularidades na meiose podem alterar a formação de tétrades e produzir produtos pós-meióticos anormais, como mônades, díades, tríades, políades, micronúcleos e células

aneuploides ou poliploides (SOARES-SCOTT et al., 2003; SOUZA et al., 2003a). Problemas envolvendo a formação da citocinese também podem resultar em produtos pós-meióticos anormais (PAGLIARINI, 2000). A formação de tríades pode estar diretamente relacionada com a variação no tamanho dos grãos de pólen viáveis e inviáveis e diversas espécies de *Passiflora* (SOUZA et al., 2003a).

Díades e tríades foram observadas em duas plantas em híbridos de *Citrus* sugerindo a formação de gametas não reduzidos. As plantas tiveram a viabilidade polínica reduzida, em torno de 22,9 a 24,4%, provavelmente devido às irregularidades meiótica, e essas plantas, com produção de gametas não reduzidos, podem ser utilizadas como potenciais genitores em cruzamentos que visam à produção de frutos sem sementes em indivíduos triploides (CAVALCANTE, et al. 2000). No híbrido somático de *P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. incarnata*, 75% dos produtos pós-meióticos continham mais de quatro andrósporos e mais de um micronúcleo foi observado por andrósporo; já no híbrido sexuado de *P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. setacea* não foram observados micronúcleos e nenhuma alteração na formação de tétrades, mostrando-se estáveis (SOARES-SCOTT et al, 2003).

O índice meiótico acima de 90% indica que a planta pode ser considerada citologicamente estável (LOVE, 1951) e é calculado através da quantidade de tétrades normais. Muitas espécies de *Passiflora* apresentaram índice meiótico acima de 90% indicando que as irregularidades observadas durante a meiose influenciam na formação de grãos de pólen viáveis (SOUZA; PEREIRA, 2011). Em *P. edmundoi* o índice meiótico variou de 95,88% a 99,18% e irregularidades como mônades, díades e tríades também foram observadas sendo que tríade foi a irregularidade mais observada (SOUZA et al., 2003a). Índice meiótico acima de 90% também foi observado em *P. edulis* f. *flavicarpa* e em uma planta mutante dessa espécie, apesar de terem sido observadas algumas irregularidades (SOUZA et al., 2010a).

2.9 Irregularidades meióticas x fertilidade em plantas

Cada espécie contém uma quantidade específica de DNA, e seus cromossomos possuem tamanhos e posições de centrômeros diferentes, quantidade de heterocromatina variada, entre outras; essas variações resultam em rearranjos estruturais e numéricos que ocorrem em quase todas as espécies e podem ser observadas com análise citogenética detalhada (SOARES-SCOTT et al., 2005). A instabilidade meiótica causada por irregularidades pode afetar a fertilidade da planta podendo levar a decadência de uma cultivar,

sendo de grande importância análises citológicas contínuas nos programas de melhoramento (PAGLIARINI, 2001). As etapas de pré e pós-meiose são controladas por um número relativamente pequeno de genes. O comportamento meiótico normal demonstra o grau de fertilidade das plantas, entretanto genes que controlam esse processo podem sofrer mutações que levam a irregularidades e afetam a fertilidade de um indivíduo (PAGLIARINI, 2000). Em 22 acessos de *Brachiaria brizantha* foram encontradas diversas irregularidades como a formação de multivalentes relacionados à poliploidia, cromossomos precoces e retardatários, segregação irregular, formação de micronúcleos e políades, principalmente nos poliploides. Essas irregularidades podem comprometer a viabilidade dos gametas e afetar a fertilidade da planta (MENDES-BONATO et al., 2002).

Nos programas de melhoramento, um dos fatores responsáveis pelo sucesso dos cruzamentos é a seleção de genótipos com alto percentual de gametas viáveis (TECHIO et al., 2006a). A viabilidade polínica é considerada uma importante ferramenta para medir a fertilidade do gameta masculino e pode ser determinada pela utilização de diversas metodologias (OLIVEIRA et al., 2001) e por diferentes corantes, como o carmim acético, a solução de Alexander, o diacetato de fluoresceína e o reagente de lugol. Esses métodos utilizam corantes químicos que reagem a componentes celulares do grão de pólen maduro, indicando com pólen viável ou inviável. O teste de solução de Alexander baseia-se na metodologia de tripla coloração com Laranja G (intensificador), Fucsina básica (cora o citoplasma de vermelho) e Verde malaquita (cora de verde a parede do grão de pólen). Assim, o núcleo do grão de pólen viável reage com a fucsina e este se cora de rosa, enquanto o grão de pólen inviável fica verde (ALEXANDER, 1969). Outro teste bastante utilizado é a reação fluorocromática, pela aplicação do diacetato de fluoresceína (DFA), um corante vital que indica a presença de atividade da enzima esterase, que está relacionada com a integridade da membrana das células do grão de pólen. Quando o grão de pólen fica fluorescente ele é considerado viável e quando fica pouco fluorescente ou sem fluorescência é considerado inviável (HESLOP-HARRISON et al., 1984).

Híbridos interespecíficos obtidos através de cruzamentos podem ter sua fertilidade reduzida e essa infertilidade pode ser identificada através do comportamento meiótico irregular (GRANATO, 2010). Estudo citogenético na meiose e estimativa da fertilidade do grão de pólen foi feito em híbridos de *Citrus* (*Citrus clementina* vs. [*C. paradisi* vs. *C. tangerina*]). O comportamento meiótico foi regular na maioria das plantas analisadas, com índice meiótico em torno de 90% e viabilidade polínica acima de 80%, contudo foram observadas seis plantas apresentando viabilidade abaixo de 70%. Foram observadas algumas

irregularidades nas fases da meiose, como univalentes, cromossomos retardatários e pontes em anáfase. Entretanto, essas irregularidades não afetaram a fertilidade da planta e esses híbridos tiveram a capacidade de produzir gametas viáveis e podem ser usados como doadores de pólen em programas de melhoramento (CAVALCANTE et al., 2000).

Análise do comportamento meiótico e a viabilidade polínica de quatro acessos de *Capsicum* demonstrou meiose regular na maioria das células analisada, apresentando poucas irregularidades como migração precoce de cromossomos, cromossomos retardatários e assincronia. Em *Capsicum*, apesar das irregularidades, a viabilidade polínica variou de 96,53% a 98,91%, e as irregularidades não comprometeram a fertilidade da espécie (MARTINS et al., 2010). A viabilidade polínica na maioria das espécies de *Passiflora* tem sido superior a 80% (SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2003a). Estudos realizados em 17 espécies de *Passiflora*, silvestres e domesticadas, mostrou altos índices de viabilidade polínica, acima de 90%, exceto em *P. pentagona* que obteve 78% de viabilidade (SOUZA et al., 2004). A viabilidade polínica de *P. edulis*, *P. incarnata*, *P. setacea* e de dois híbridos foi observada durante dois anos. Em *P. incarnata* a viabilidade polínica variou de 55% no primeiro ano a 85,3% no segundo ano, com uma média de 70,2% de grãos de pólen viáveis, em *P. edulis* se obteve a média de 94,3%, em *P. setacea* a média foi de 81,2%; a média da viabilidade polínica no híbrido somático foi de 37,2% e no híbrido sexuado foi de 65,76% (SOARES-SCOTT et al., 2003).

Através da análise pela solução de Alexander, os grãos de pólen (GP) inviáveis podem ser considerados de três tipos: vazio (T1 – ausência de citoplasma), contraído (T2 – citoplasma contraído) e pulverizado (T3 – citoplasma pulverizado) (SOUZA et al., 2004; ABREU, 2008). O GP T1 é caracterizado pelo tamanho menor que o viável na maioria das espécies de *Passiflora* e pela ausência de citoplasma - observado pela coloração verde quando corado com solução de Alexander onde apenas a parede reage com o. No GP T2 tanto a parede quanto o citoplasma reagem à coloração, entretanto é observado um espaço entre a parede celular e a membrana plasmática e uma contração do citoplasma (SOUZA et al., 2003a; SOUZA et al., 2012). O GP T3 é pouco observado em espécies de *Passiflora* (ABREU, 2008) e é caracterizado por corar tanto a parede quanto o citoplasma, entretanto o citoplasma é observado de forma fragmentada, com falhas na coloração com tonalidade mais clara, e seu tamanho é comparado ao GP do T2. Também são encontrados grãos de pólen tipo gigante (considerado viável) e micropólen resultantes de desbalanço cromossômico ou gametas não reduzidos (SOUZA et al., 2004). Em *P. edmundoi* a viabilidade polínica foi de 97,9% e os grãos de pólen inviáveis foram mensurados. Foi observado maior percentual de

grãos de pólen inviáveis vazios em relação ao grão de pólen contraído, sugerindo que as irregularidades meióticas podem ter sido a causa da inviabilidade polínica (SOUZA et al., 2003a). Fatores bióticos e abióticos podem interferir nos processos de fertilização em espécies que não estão em seu habitat natural (SOUZA et al., 2004) e mutações que ocorrem durante a meiose e pós-meiose podem afetar e reduzir a viabilidade polínica de uma espécie.

As mutações podem ocorrer de origem espontânea em populações naturais, induzidas por mutagênicos ou como resultado de hibridações interespecíficas (SINGH, 2003). As mutações meióticas podem ocorrer durante a síntese de DNA originando mutantes pré-meióticos, durante a prófase I originando mutantes sinápticos, na anáfase I até a telófase II originando mutantes de disjunção; as mutações pós-meióticas ocorrem no final da segunda divisão, resultando em mutantes pós-meióticos, entretanto os mutantes meióticos são os mais comuns em plantas (SINGH, 2003).

A análise cromossômica contribui muito para o melhoramento de plantas e a citogenética fornece técnicas e informações necessárias que podem estar relacionadas apenas com a estrutura e o número de cromossomos ou ao comportamento dos cromossomos durante as divisões. Problemas meióticos que causam alterações do genoma podem afetar a produtividade de uma espécie gerando gametas inviáveis (PAGLIARINI, 2001). Muitas mutações meióticas foram identificadas em *Arabidopsis*, como nos genes *SYN1/DIF1* que causam erros no pareamento cromossômico e levam à formação de univalentes, com egregação em anáfase I e II irregular; resultam em produtos pós-meióticos de tamanhos e formas irregulares, ploidia variável e formação de gametas desbalanceados e inviáveis (LIU; QU, 2008).

A produção de gametas viáveis depende da regularidade da meiose, começando pelo correto pareamento dos cromossomos homólogos com trocas de fragmentos entre as cromátides e a formação dos quiasmas. Para que ocorra o pareamento, a recombinação ou *crossing over* entre cromossomos homólogos é necessária que haja quebra na fita dupla de DNA (DSBs - *Double Strand Break*), que na maioria das espécies é catalisada pela proteína Spo11, bastante conservada entre as espécies, e a recombinação é pré-requisito para gerar variabilidade (EDLINGER; SCHLOGELHOFER, 2011; GRELON et al., 2001). Estudos feitos em *Arabidopsis thaliana* mostraram que mutações na proteína Spo11 reduzem drasticamente a formação de quiasmas e está associada com a ausência de sinapse na prófase I. Essas mutações podem afetar todo o curso da meiose, desde a diminuição da variabilidade genética até a total infertilidade da planta (MUYT et al., 2009).

As mutações meióticas são identificadas através de observações citológicas, evidências genéticas e quantidade de óvulos e pólen abortados (SINGH, 2003). Esses eventos estão sob controle gênico e, tanto em plantas quanto em animais, as mutações afetam a capacidade de pareamento cromossômico, de recombinação, de orientação e a separação dos cromossomos na anáfase I e II (JOHN; LEWIS, 1973). Os mutantes sinápticos afetam a formação do complexo sinaptonêmico nas subfases da prófase e na metáfase I (GOLUBOVSKAYA et al., 2011). Esses mutantes podem ser assinápticos (ex. *asy1*) que causam assinapse e afetam o pareamento dos cromossomos homólogos ou dessinápticos (ex. *dsy1*, *dsy10*) que causam dessinapse e desfaz o pareamento entre os cromossomos precocemente. Em ambos os casos vai haver a formação de univalentes ao invés de bivalentes na prófase I (LIU; QU, 2008). Esses cromossomos univalentes não se pareiam e não se alinham na placa metafásica levando a uma segregação desigual em anáfase I, causando desbalanceamento cromossômico ao final da meiose e infertilidade da planta (ELLIOTT, 1958).

No milho *Zea mays* L. células mães de grão de pólen foram analisadas por meio da citogenética molecular utilizando FISH para identificar mutantes meióticos dessinápticos. Os mutantes *dy* e *dsy1* foram identificados por alterar a organização dos telômeros em forma de buquê na prófase I. O mutante *dsy1* afeta a formação da sinapse entre os homólogos e o mutante *dy* reduz as taxas de recombinação. Alguns telômeros foram localizados no centro do núcleo impedindo a interação telômero/envelope nuclear, o reconhecimento dos homólogos e o pareamento cromossômico, conseqüentemente foram encontrados muitos cromossomos univalentes nas fases seguintes da prófase I com formação de grãos de pólen desbalanceados e redução da fertilidade da planta (BASS et al., 2003).

Estudos sobre os mutantes meióticos contribuem para o entendimento dos mecanismos de regulação das células meióticas e de reparo do DNA que ocorrem nos eucariotos (CANDE; FREELING, 2011). Em milho foram identificados mais de 60 mutantes, representando em torno de 35 genes e a maioria desses mutantes estão relacionados com erros na formação de bivalentes, defeitos no pareamento de homólogos, na sinapse e na recombinação, resultado em gametas inviáveis ao final da meiose (GOLUBOVSKAYA et al., 2011).

Estudos citológicos têm sido realizados para identificar diversos mutantes importantes como os ‘ameióticos 1’ (*am1*), que são necessários para estabelecer o ciclo celular meiótico em milho, e ‘ausência de primeira divisão’ (*afd1*), necessário para que ocorra a segregação dos cromossomos homólogos e a redução à metade do conjunto cromossômico (CANDE; FREELING, 2011). Geralmente esses mutantes são identificados nas gerações segregantes e

são distinguíveis de plantas normais pela quantidade de pólen e óvulos abortados. Mutantes sinápticos são os mais encontrados na literatura e de cada quinze genes dessinápticos encontrados, treze são de origem espontânea e dois induzidos por radiação com raio X (SINGH, 2003). As consequências são a formação de andrósporos e ginósporo desbalanceados resultando na redução da viabilidade polínica (SINGH, 2003). Mutações nos genes *ASY1* resultam em assinapse e reduzem a formação de quiasmas que mantém cromossomos homólogos unidos até a anáfase I, formando univalentes. Outros estudos mostram que a formação do DSB pode ser normal em mutantes *asy1*, entretanto os níveis de recombinação diminuem devido à baixa frequência de quiasmas (SANCHEZ-MORAN et al., 2007).

A instabilidade meiótica pode levar a formação de plantas aneuploides, que consistem na perda ou ganho de um ou poucos cromossomos e surgem a partir de gametas com número irregular de cromossomos causados por segregação irregular, falhas na sinapse ou atrasos na migração de cromátides para os polos na anáfase I ou II. Essas plantas podem ter sua fertilidade reduzida ou serem completamente inférteis (PAGLIARINI, 2001). Uma das maiores contribuições dos estudos sobre mutantes meióticos é o seu papel como elemento importante no desenvolvimento de métodos de melhoramento de plantas, uma vez que a utilização de gametas não reduzidos é uma forma eficaz e eficiente para transmitir diversidade genética para uma cultivar de interesse agrônomico (PELOQUIN et al., 1999).

A formação de gametas não reduzidos ou gametas $2n$ podem surgir a partir de erros na meiose I em que os cromossomos não migram para os polos na anáfase e forma uma célula com número diploide ou quando há falha na citocinese na meiose II, com formação de díades ou tríades. Esse fenômeno pode ocorrer de forma espontânea em quase todas as plantas ou podem aumentar com cruzamentos interespecíficos e fatores ambientais (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001). Gametas não reduzidos foram observados em algumas espécies de *Brassica* em frequências baixas, entretanto em híbridos interespecíficos essa frequência foi bem maior. Foi relatado que um híbrido interespecífico (CnCcAB) do cruzamento *B. napus* (AACnCn) vs. *B. carinata* (BBCcCc) produziu uma proporção alta de gametas com aproximadamente o mesmo complemento cromossômico e que esses surgiram por falha na segregação cromossômica na primeira divisão meiótica e por baixas temperaturas, que também podem ter interferido nas etapas da meiose. Esses gametas não reduzidos são viáveis e podem ser utilizados em programas de melhoramento para indução da poliploidia (MASON et al., 2011).

A poliploidia pode ser uma forma de combinar genes de espécies diferentes, tendo um papel importante no processo evolutivo de algumas espécies e uma ferramenta importante para o melhoramento de plantas (ALLARD, 1971). Entretanto, é necessário um pequeno grau de parentesco entre as espécies para que haja uma homologia entre os cromossomos, resultando na formação de multivalentes ou bivalentes e em diferentes recombinações cromossômicas entre as espécies envolvidas na hibridação (PAGLIARINI, 2001).

Em plantas poliploides a multiplicação de todo o complemento cromossômico pode causar problemas na meiose e a manutenção do estado poliploide ao longo de gerações requer mecanismos especiais para controlar o pareamento e segregação cromossômica correta de mais de dois homólogos. Entretanto, altas taxas de recombinação em plantas poliploides pode levar a um rápido processo de diversificação e otimizar a domesticação de espécies silvestres em ambientes diferentes (PECINKA et al., 2011). Plantas poliploides podem ser geradas através de eventos de poliploidização por duplicação somática ou gametas não reduzidos e são consideradas uma evolução no genoma das plantas (ZAMARIOLA et al., 2014).

2.10 O uso de GISH para análises meióticas em híbridos

A hibridação genômica *in situ* (GISH) consiste em uma modificação da FISH, em que o genoma total de uma espécie é marcado e utilizado como sonda em híbridos (SCHWARZACHER et al., 1989). As análises meióticas em híbridos com base em GISH têm sido realizadas para verificar o pareamento entre cromossomos homeólogos e a frequência de quiasmas e, conseqüentemente, a recombinação entre os cromossomos homeólogos, uma vez que a recombinação entre cromossomos homeólogos permite que genes sejam introduzidos em espécies de interesse agrônômico e que os cromossomos homeólogos permaneçam pareados durante a metáfase, resultando em segregação normal durante a anáfase da meiose I.

Utilizando a GISH foi possível distinguir os genomas de duas espécies próximas, *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* (ambas $2n = 2x = 24$) e assim verificar o pareamento entre os cromossomos homeólogos e a presença de recombinações. As progênies RC₁, RC₂ e RC₃ envolvendo híbridos somáticos (*L. esculentum* vs. *L. peruvianum*) foram analisadas, sendo possível observar um pareamento regular e um alto grau de recombinações entre os cromossomos homeólogos na progênie RC₁. Em RC₂ e RC₃ os cromossomos homeólogos continuaram a se parar (na ausência de homólogos); os quiasmas foram encontrados exclusivamente nos segmentos distais dos cromossomos (PAROKONNY et al., 1997). O pareamento cromossômico na meiose foi estudado em linhagens do tomate cultivado, *L.*

esculetum, que continha um ou dois segmentos cromossômicos da espécie selvagem *Solanum lycopersicoides*. A média da frequência de quiasma no cromossomo sete, contendo introgressão terminal no braço longo, foi estimada em 0,78. Nas linhagens que possuíam dois segmentos longos introgridos, a frequência de quiasmas foi fortemente reduzida, quando comparado com linhagens com uma única introgressão. A frequência de células com univalentes também foi muito maior nessas linhagens com duas introgressões, indicando falha no pareamento cromossômico (JI; CHETELAT, 2007).

GISH foi utilizada para verificar a formação de bivalentes entre duas espécies de gêneros diferentes, *Festuca* e *Lolium*. Um híbrido F_1 ($n = 4x = 28$) foi obtido do cruzamento *F. arundinacea* var. *glaucescens* tetraploide (GGG'G') vs. *L. multiflorum* tetraploide artificial (LmLmLmLm). Esse híbrido F_1 foi retrocruzado com *L. multiflorum* diploide, produzindo uma progênie RC_1 triploide ($2n = 3x = 21$, LmLmG). A GISH revelou que na metáfase I da meiose dos indivíduos RC_1 há uma predominância de bivalentes formados pelos cromossomos homólogos (LmLm), univalentes (G) e a presença de alguns trivalentes formados por dois homólogos (LmLm) e um homeólogo (G), com a presença de dois quiasmas por cromossomo. Embora ocorra apenas a formação de alguns trivalentes, foi possível ocorrer recombinação entre os genomas, em que características de interesse do genoma G foram introduzidas no genoma Lm (MORGAN et al., 2001).

Em híbridos F_1 e plantas RC_1 e RC_2 envolvendo o cruzamento entre *Lilium longiflorum* (LL) vs. *L. rubellum* (RR) a GISH foi utilizada para verificar se ocorreram recombinações entre os cromossomos homeólogos. Em plantas F_1 (LR) foram observadas apenas a presença de um quiasma entre cromossomos homeólogos, mas quando esses híbridos foram transformados em anfidiplóides (LLRR), ocorreu apenas pareamento entre os cromossomos homólogos, sem qualquer recombinação entre os genomas. Os indivíduos RC_1 e RC_2 não apresentaram cromossomos recombinantes, indicando a ausência de pareamento entre os cromossomos homeólogos (LIM et al., 2000).

Uma análise detalhada na metáfase I da meiose em seis híbridos de *Festuca pratensis* vs. *Lolium perenne* ($2n = 4x = 28$), a média das configurações cromossômicas em todos os híbridos foram: 1,13 univalentes, 11,51 bivalentes, 0,32 trivalentes e 0,72 quadrivalentes. A frequência de quiasmas foi 21,96 por célula. GISH mostrou que o pareamento foi predominantemente intragenômico (ZWIERZYKOWSKI et al., 2008).

O pareamento cromossômico na metáfase I analisado em oito híbridos envolvendo espécies do gênero *Paphiopedilum* utilizando GISH demonstrou a relação filogenética entre as espécies genitoras. A incapacidade de discriminar os cromossomos parentais com a técnica

de GISH nos híbridos de *P. delenatii* vs. *P. micranthum* pode ter sido devido à curta distância entre os genomas dos genitores desses híbridos (LEE et al., 2011). Em híbridos envolvendo *Brassica maurorum* ($2n = 16$, MM) vs. *B. rapa* ($2n = 20$, AA) todos os cromossomos permaneceram sem se parear em 28% das células mães de grão de pólen, sugerindo uma homologia relativamente baixa entre os genomas M e A (YAO et al., 2010).

Na metáfase I da meiose de híbridos interespecíficos de *Musa acuminata* (AA) vs. *M. balbisiana* (BB) foram observadas através de GISH a presença de univalentes, bivalentes, trivalentes e multivalentes envolvendo os cromossomos hemeólogos e a presença de cromossomos recombinantes entre os genomas A e B. A presença de cromossomos recombinantes em híbridos de *Musa*, assim como em outras espécies de plantas, é importante para a domesticação e o melhoramento de cultivares interespecíficas (JERIDI et al., 2011).

2.11 Citogenética molecular e estudos na meiose em plantas

A aplicação de técnicas citogenéticas moleculares trouxeram benefícios para o entendimento do comportamento meiótico em vários organismos (SCHWARZACHER, 2003b). De fato, as inferências realizadas acerca do comportamento meiótico, genes envolvidos na meiose e a rota de reconhecimento entre cromossomos homólogos na meiose foram inicialmente descritos em levedura e posteriormente observadas e estendidas a outros grupos taxonômicos (PRIMIG et al., 2000). Eventos citogenéticos essenciais na meiose, como o reconhecimento e pareamento entre cromossomos homólogos, *crossing over*, disjunção cromossômica e formação de complexos recombinantes são os principais elementos envolvidos na análise citogenética antes e durante o processo meiótico (SCHWARZACHER, 2003b).

A FISH permite a localização de regiões específicas com a utilização de sondas para determinado DNA alvo, como por exemplo, para DNA repetitivo (DNAr, telomérico, DNA satélite) ou de poucas cópias. O pareamento cromossômico antes do leptóteno tem sido um alvo importante de investigações, indicando diferentes mecanismos envolvidos no reconhecimento de cromossomos homólogos, onde múltiplas características cromossômicas e genômicas estão envolvidas nesse processo (SCHWARZACHER, 2003b). Análises em linhagens artificiais de trigo/arroz mostraram que os cromossomos homólogos iniciam o pareamento antes da meiose, sendo três estágios essenciais para esse processo: o

reconhecimento entre homólogos com a formação de domínios, o alinhamento entre homólogos e a sinapse entre homólogos (SCHWARZACHER, 1997).

Diversas regiões cromossômicas estão envolvidas no reconhecimento e pareamento entre cromossomos homólogos na meiose (SYBENGA, 1999). Tais regiões podem ser localizadas e caracterizadas com a utilização de FISH, permitindo a definição do padrão de reconhecimento entre cromossomos na meiose. O telômero, onde em plantas geralmente possui sequência TTTAGGG, exerce um importante papel no reconhecimento e pareamento entre homólogos, mesmo antes do leptóteno sendo a primeira região cromossômica a apresentar sinapse enquanto as regiões intersticiais ainda não se encontram pareadas, sendo tal reconhecimento essencial para outras fases subsequentes da meiose (JENKINS; WHITE, 1990). Adicionalmente, a ausência de homologia em regiões distais dos braços cromossômicos sugere a ausência de pareamento entre homólogos na meiose (LUKASZEWSKI, 1997). A região telomérica atua na organização cromossômica e na formação de domínios cromossômicos em núcleos interfásicos e pré-meióticos muitas vezes com ligação à carioteca. Assim como a região telomérica, as subteloméricas também são essenciais para o reconhecimento e pareamento entre cromossomos homólogos no início da meiose e em alguns casos mesmo antes do leptóteno (SCHWARZACHER, 2003b). Em batata (*Solanum tuberosum*) duas regiões subteloméricas foram identificadas e posteriormente localizadas por FISH, revelando cromossomos com regiões preferenciais no braço cromossômico curto e longo, assim como a colocação de duas sequências distintas na mesma região subtelomérica. Tal fato sugere a atuação destas regiões cromossômicas em domínios nucleares pela exigência de tipos cromossômicos específicos, podendo esse padrão ser necessário também para o reconhecimento e pareamento entre cromossomos homólogos em meiose (TORRES et al., 2011).

O centrômero também exerce a função de reconhecimento e pareamento entre cromossomos homólogos na meiose, e em algumas espécies como o trigo a associação entre homólogos se inicia pelo centrômero (MIKHAILOVA et al., 1998). Por outro lado, tem sido verificada a importância de proteínas associadas ao centrômero como essenciais ao reconhecimento e pareamento de homólogos e outros eventos importantes ao comportamento meiótico. Em *Lilium* L. as proteínas mais representativas no reconhecimento cromossômico do DNA satélite existem em regiões centroméricas (SUZUKI et al., 1997). Apesar da possibilidade da identificação, isolamento e localização do centrômero em preparações citológicas de vegetais pela técnica de FISH, a observação e a inferência acerca do comportamento do centrômero durante a meiose não tem sido relatada na literatura.

Sequências simples repetitivas (SSR) podem ser localizadas *in situ* e têm sido aplicadas como marcadores cromossômicos para identificar a localização cromossômica e elaboração de mapas integrados durante a meiose (GORTNER et al., 1998; CUADRADO; JOUVE, 2010).

Cromossomos meióticos podem ser superiores aos mitóticos no sentido da informação obtida via aplicação da técnica de FISH com a utilização de sondas para poucas cópias ou de cópias simples. Tal fato é comumente observado em cromossomos paquitênicos, sendo também mais vantajosos que cromossomos na diacinese (ZHONG et al., 1999). Cromossomos paquitênicos têm sido utilizados para a localização de sequências via FISH que não são visualizadas em cromossomos metafásicos permitindo inferências sobre o pareamento inicial na meiose e a respeito da distribuição cromossômicas de marcadores para o mapeamento físico (HAN et al., 2009). Em *Brassica oleaceas* var. *alboglabra* a aplicação da FISH para DNA repetitivo em cromossomos meióticos reforçou os resultados anteriormente observado pela aplicação da técnica em cromossomos mitóticos (ARMSTRONG et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Foram utilizadas as espécies genitoras *Passiflora gardneri* Mast. ($2n = 18$; SEGER et al., 2009), acesso 247, e *P. gibertii* N.E. Brown ($2n = 18$; VIEIRA et al., 2004), acesso 174, ambas doadas pela Embrapa Cerrados (Brasília) e quatro híbridos interespecíficos F_1 , da progênie denominada HD15 101, HD15 106, HD15 107 e HD15 109 (BELO, 2010; SILVA, 2014). As espécies e os genótipos híbridos vêm sendo mantidos em cultivo protegido (sombreamento de 50%) no Banco Ativo de Germoplasma (BAG – Passifloras) da Universidade Estadual Santa Cruz (UESC), localizado em 14° 39` S, 30° 10` W; 78m de altitude; Ilhéus, BA, Brasil.

3.2 Condições de Cultivo

Estacas foram obtidas e mantidas em sacos de polietileno com volume de 1 L, contendo areia lavada. Em seguida, essas estacas foram transferidas para vasos de 10 L,

contendo terra peneirada e o nematicida Furadan[®]. O controle de pragas foi realizado com o defensivo agrícola Decis[®]. Os fungos foram controlados com pulverização de produtos a base de cobre (Fungitol). As plantas mantidas na casa de vegetação foram podadas quinzenalmente e regadas todos os dias. A nutrição nas plantas foi realizada todo mês com 23,3 g/L de uréia e uma solução de micronutrientes (1,019 g/L Bo; 2,5 g/L Cu; 0,14 g/L Mo; 8,4 g/L Zn; 5,58 g/L Mn), 15g/L de KCl a cada três meses e 34,3 g/L de fosfato de amônia (MAP) a cada seis meses.

3.3 Comportamento meiótico e pós-meiótico

Botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados e fixados em Carnoy I (etanol [Merck, RH378518323]: ácido acético [Merck, R45139063347] 3:1, v/v; JOHANSEN, 1940), com trocas realizadas nos períodos de 30 e 180 minutos em temperatura ambiente (TA), e estocados a -20 °C por 24 horas. Os botões foram transferidos para etanol 70% e mantidos a ± 10 °C até a análise. Foi utilizada apenas uma antera de cada botão floral para análise. Lâminas temporárias foram preparadas pela técnica de esmagamento. As anteras foram amaciadas com duas gotas de ácido acético 60% por 7 minutos e, depois de retirado o ácido com papel de filtro, coradas com carmim acético (Fluka, 22000) 2% (SOUZA; PEREIRA, 2011). Foram observadas pelo menos 50 células de cada fase meiótica, por planta híbrida e genitor. Foi analisada a frequência de quiasmas terminal, intersticial e total, para o cálculo do índice de recombinação ($IR = [\sum n^\circ \text{ total de quiasmas} \div n^\circ \text{ de células analisadas}] + \text{valor de } n$) (DARLINGTON, 1958), sendo considerado um quiasma para os bivalentes associados em bastão (*rod*) e dois quiasmas para os bivalentes associados em anel (*ring*) (SENDA et al., 2005). Os números dos produtos pós-meióticos (mônades, díades, tríades, tétrades e políades) foram registrados para o cálculo do índice meiótico ($IM (\%) = [n^\circ \text{ de tétrades normais} \times 100] \div n^\circ \text{ de produtos pós-meióticos contados}$) (LOVE, 1951) e para a análise de variância (ANOVA), considerando-se delineamento inteiramente ao acaso, com repetições de quatro lâminas por genótipo. Foi utilizado o programa computacional SISVAR (*open source*).

Para registro das fases meióticas e pós-meióticas, as lâminas temporárias foram transformadas em permanentes, sendo mergulhadas em ácido acético 60% por 1 hora e em etanol 70% por 30 minutos para retirada do carmim acético e da lamínula. As lâminas foram secas em TA, coradas com 2 μ L DAPI (Sigma, D9542; 2 μ g/mL) detectado com o filtro U-MWU (330-385 nm de excitação/emissão >420 nm) e fotografadas em microscópio de

epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 e com o *software* DP2-BSW.

3.4 Viabilidade polínica

Para análise da viabilidade polínica, flores abertas foram coletadas ao acaso nos horários entre 7h30 e 8h30 e os grãos de pólen (GP) foram testados com dois corantes: (i) solução de Alexander (ALEXANDER, 1969), que utilizou a tripla coloração com orange G (intensificador), fucsina básica (cora o citoplasma de vermelho; Sigma, P1528) e verde malaquita (cora de verde a parede do grão de pólen) que proporcionou a reatividade da parede/citoplasma, sendo considerados viáveis os GP corados e com citoplasma íntegro; os GP inviáveis foram classificados em três tipos: tipo 1 (T1), vazio (ausência de citoplasma); tipo 2 (T2), citoplasma contraído (SOUZA et al., 2004) e tipo 3 (T3), citoplasma pulverizado (ABREU, 2008); (ii) diacetato de fluoresceína (Sigma, F7378) (HESLOP-HARRISON; HESLOP-HARRISON, 1970), fluorocromo que indica presença de atividade da enzima esterase relacionada com a integridade da plasmalema, sendo considerado viável o GP cujo citoplasma tenha corado de amarelo-esverdeado fluorescente, observando-se apenas os tipos viável e inviável.

Para o teste com solução de Alexander, uma antera aberta foi delicadamente colocada sobre uma gota do corante para liberar os GP e, em seguida, os GP foram observados em microscópio de luz quanto ao aspecto morfológico e corabilidade, contados e mensurados. Para o teste com diacetato de fluoresceína, uma antera foi delicadamente colocada sobre o fluorocromo em lâmina, incubada em câmara úmida por 10 min no escuro em TA. Os GP foram contados e observados quanto à corabilidade utilizando-se o microscópio de epifluorescência Olympus BX41 com filtro U-MWB (450-480 nm de excitação/emissão >515 nm), equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 e com o *software* DP2-BSW. Foram analisadas quatro plantas (repetições) por acesso e 1000 GP foram contados por repetição/acesso. Os comprimentos de 50 GP viáveis e inviáveis foram mensurados. Os resultados foram submetidos à ANOVA com auxílio do programa computacional SISVAR (*open source*).

3.5 Extração de DNA genômico

Para a realização da técnica de hibridação genômica *in situ* (GISH), o DNA dos genitores foi extraído usando o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) com modificações (VIANA et al., 2003). Folhas jovens de *P. gardneri* e *P. gibertii* foram maceradas em nitrogênio líquido, acondicionadas 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%). Foi feito o isolamento dos ácidos nucleicos com solução (24:1) clorofórmio (Merck, K38408045806): álcool isoamílico (Merck, 31790478313) e o DNA foi ressuspensão com tampão TE [Tris (Promega, 318188) a 10 mM; EDTA (USB, 109531) a 1 mM]. A análise da concentração do DNA genômico foi realizada através da comparação com 100 ng de DNA lambda (NEB, New England Biolabs) em eletroforese de gel agarose 1,2%, (Pronadisa, 8016) corado com SYBR safe (Invitrogen®, S33102).

3.6 Tratamento de lâminas para hibridação *in situ*

O preparo das lâminas seguiu o protocolo proposto por Zwierzykowski et al. (2008). Anteras foram colocadas em carmin acético 1% por 2 horas, em seguida lavadas e maceradas em ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido por cerca de 5 minutos para a retirada da lamínula, secas em TA e estocadas -20 °C. O tratamento das lâminas seguiu o protocolo para hibridação fluorescente *in situ* proposto por Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000), com modificações (SOUZA et al., 2010b). As lâminas foram descongeladas em TA e secas em estufa a 37 °C por 1 hora, submetidas à tratamento com RNase (Sigma, R5125) a 100 µg/mL em tampão 2xSSC (cloreto de sódio [Sigma, S3014] a 0,3 M + citrato de sódio [Sigma, S5941] a 0,03 M) e incubadas em câmara úmida por 1 h a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em 2xSSC em TA duas vezes por 5 min cada e 50 µL de HCl a 10 mM foi adicionado sobre a lâmina por 5 min. Após retirada do HCl foi adicionado 50 µL de pepsina (Sigma, P6887) (pepsina a 10 mg/mL; HCl a 10 mM [1:100 v/v]), as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 min a 37 °C, lavadas com 2xSSC em TA duas vezes por 5 min cada, imersas em formaldeído (Sigma, P9037) 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, secas em TA por pelo menos 30 min, para imediata aplicação da técnica de GISH.

3.7 Preparo de sondas e DNA de bloqueio para hibridação genômica *in situ* – GISH (*Genomic in situ hybridization*)

A diferenciação genômica foi realizada através da GISH com a adição de DNA de bloqueio. Foi realizada a clivagem do DNA genômico de ambos os genitores com o uso do sonicador (Qsonica[®], Q125) através da programação: 40% amplitude, 2 segundos ligado e 2 segundos desligado no período total de 5 minutos (JAUHAR; PETERSON, 2006). A verificação do tamanho dos fragmentos clivados foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, 8016) a 2% usando como parâmetro para tamanho de fragmento o marcador de peso molecular 100 bp *ladder marker*. Os fragmentos separados por eletroforese foram corados com SYBR Safe, dando-se a preferência pelo uso de fragmentos clivados entre 200-1000 pb (MELO et al., 2015). A purificação do DNA genômico clivado foi realizada através da precipitação de ácidos nucleicos com a adição de 2% do volume final de acetato de sódio a 3 M mais 200% do volume final de etanol anidro gelado (-20 °C). Após o estoque overnight a -20 °C, o precipitado foi centrifugado a 14.000 rpm a 20 °C por 10 min, sendo o pellet ressuspensionado com Tris a 10 mM pH 8 para a concentração final de 1,1 µg/µL. A sonda genômica foi elaborada a partir de 1 µg do DNA clivado do progenitor paterno marcada com Biotin-16-dUTP por *nicktranslation* seguindo o protocolo proposto pelo fabricante (Roche Diagnostics, 11093070910). O DNA de bloqueio foi preparado utilizando 35 µg de DNA do genitor feminino em um volume final de 350 µL. O DNA de bloqueio foi clivado, quantificado no gel de agarose a 2% e purificado, utilizando os mesmos métodos citados acima. A mistura foi estocada a -20 °C overnight e em seguida foi centrifugado por 10 min a 20 °C. O sobrenadante foi eliminado e o pellet secou em TA por no mínimo 1 hora, em seguida foi resuspensionado com Tris a 10 mM pH 8 para a concentração final de 1,1 µg/µL do DNA clivado.

3.8 GISH

A aplicação da GISH seguiu o protocolo de Melo et al. (2015). Nas lâminas contendo as preparações citológicas foi adicionada a mistura de hibridação com o volume final de 15 µl, contendo formamida (Sigma, P9037) 50%, dextran sulfato (Sigma, 42867) 10%, (pré-aquecida a 37 °C em estufa), 2xSSC, SDS (dodecil sulfato de sódio [Bioagency, 161-0301N]) 0,13%, sendo utilizados 33 ng de sonda e 3,3 µg do DNA de bloqueio. O mix da hibridação foi aquecido a 75 °C por 10 min em termociclador (Eppendorf, Mastercycler) e transferido para gelo por 5 min. As preparações citológicas contendo 15 µl do mix coberto com lamínula de vidro foram desnaturadas em termociclador contendo um adaptador para lâminas (Techne,

TC-412) a 75 °C por 10 min e incubadas a 37 °C em câmara úmida *overnight*. As lâminas foram mergulhadas em 2xSSC em TA por 5 min para a remoção das lamínulas. Em seguida foram realizados banhos pós-hibridação a 42 °C em banho Dubnoff (Quimis, 9226ML) duas imersões por cinco min cada em 2xSSC, duas em 0,1xSSC e outras duas em 2xSSC. As lâminas foram imersas em solução com 4xSSC/Tween 20 (Sigma, P7949) a 0,2% em TA e tratadas com 50 µL de BSA (*bovine serum albumin*, fração V [Sigma, A3059]) a 5% por 10 min. Sondas marcadas com biotina foram detectadas com 0,7 µL de avidina-FITC (*fluorescein isothiocyanate*; Vector, SA-5001) e 19,3 µL de BSA a 5%. As lâminas contendo os anticorpos para a detecção foram incubadas em câmara úmida por 1h a 37 °C. O excesso de anticorpos foi removido com três imersões por 5 min cada em 4xSSC/0,2% Tween 20 em TA. As lâminas foram brevemente imersas em 2xSSC, simultaneamente montadas e contracoradas com meio DAPI/Vectashield® (Vector, H-1200) e estocadas a ± 8 a 10 °C até análise.

As diferentes fases da meiose foram fotodocumentadas com a utilização do microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 pelo *software* DP2-BSW. A visualização dos sítios de hibridação detectados com avidina-FITC foi realizada com o uso do filtro U-MWB (450-480 nm de excitação / emissão > 515 nm) e contracorados com DAPI utilizando o filtro U-MWU (330-385 nm de excitação/emissão > 420). As confecções de pranchas e sobreposições FITC/DAPI (sobreposição de camadas utilizando o recurso opacidade 75% da camada FITC) foram realizadas com o uso do *software* photoshop SC5.

4 RESULTADOS

4.1 Meiose e pós-meiose

As espécies genitoras, *P. gardneri* e *P. gibertii*, e os quatro híbridos interespecíficos HD15 estudados apresentam número cromossômico $2n = 18$ e número haploide $n = 9$. Na diacinese foram observadas diferentes associações cromossômicas nos genótipos híbridos (dados não tabelados), com predominância de associação bivalente (um par de cromossomos homeólogos), mas também foram encontrados associação tetraivalente (4 cromossomos ou 2

pares de cromossomos homeólogos) ou cromossomos univalentes (ausência de pareamento) (Figura 1).

Foram observados quiasmas terminais e intersticiais, com predominância de quiasmas intersticiais em todos os genótipos. A frequência de quiasmas foi menor nos híbridos, com até 25% a menos de quiasmas terminais e 47,6% a menos de quiasmas intersticiais em relação ao genitor feminino; o total de quiasmas foi 42% menor nos híbridos, afetando diretamente o IR (Tabela 1).

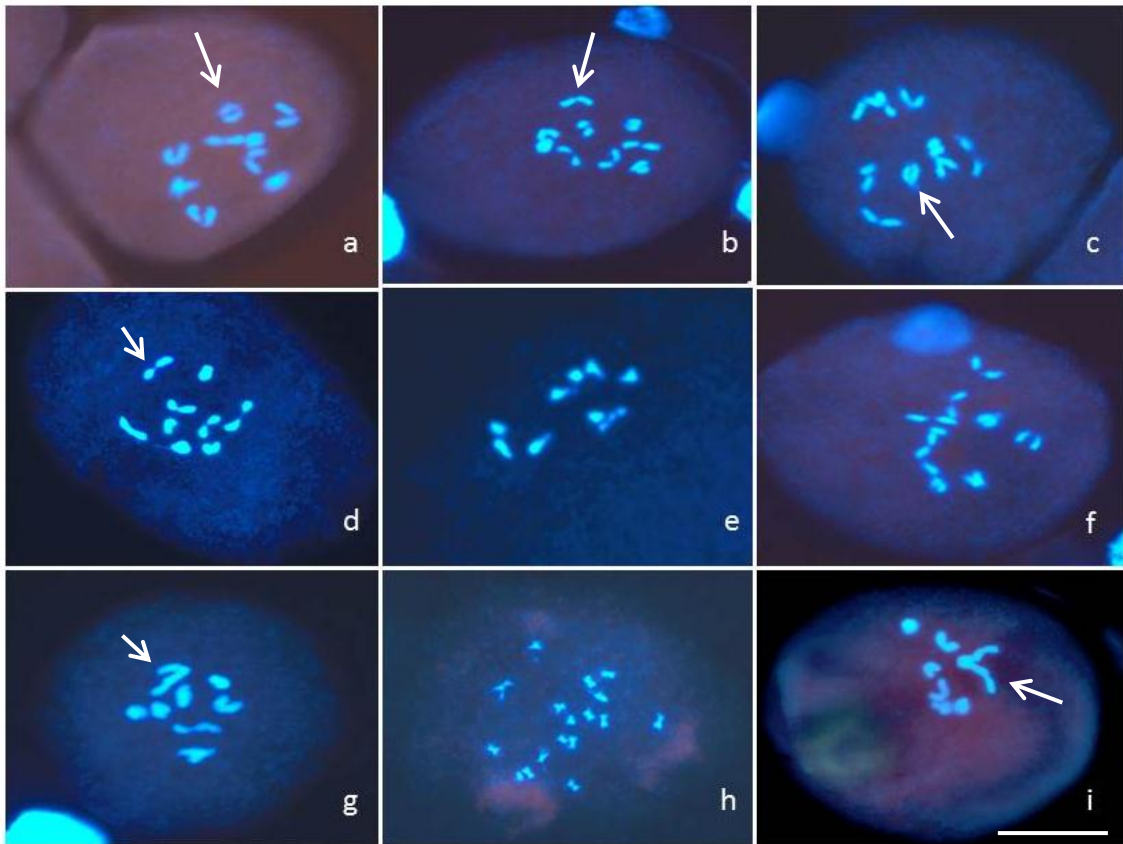


Figura 1 Configuração do pareamento cromossômico em genitores de *Passiflora* e híbridos F_1 da progênie HD15 ($2n = 18$), com pareamento normal, irregularidades e formação de quiasmas intersticiais e terminais, corados com DAPI. **a-f** Diacinese regular com pareamento de homeólogos em genitores e híbridos ($n = 9$). **a)** *P. gardneri*; **b)** *P. gibertii*; **c)** HD15 101; **d)** HD15 106; **e)** HD15 107; **f)** HD15 109; **g-i)** Diacinese com irregularidades no pareamento cromossômico. **g)** HD15 101 com 7 bivalentes e 1 tetravalente (seta); **h)** HD15 107 com 18 univalentes; **i)** HD15 109 com 6 bivalentes e 1 multivalente (seta). Observa-se também a formação de quiasma intersticial (**b** e **d**) e terminal (**a** e **c**). Barra = 20 μ m.

Tabela 1 Número e localização de quiasmas observados por célula em diacinese e índice de recombinação (IR) em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15

Genótipos (n = 9)	Terminal		Intersticial		TQ	IR
	Média	(Min-Max ± dp)	Média	(Min-Max ± dp)	Média	
<i>P. gardneri</i>	3,68	(2-6 ± 1,23)	5,46	(2-8 ± 1,24)	9,14	18,1
<i>P. gibertii</i>	3,42	(2-4 ± 0,81)	5,06	(3-6 ± 0,76)	8,48	17,4
HD15 101	2,44	(0-4 ± 1,01)	2,86	(1-4 ± 0,72)	5,3	14,3
HD15 106	2,52	(0-4 ± 0,97)	3,4	(1-5 ± 0,90)	5,92	14,9
HD15 107	2,56	(2-4 ± 0,81)	3,44	(2-5 ± 0,83)	6,0	15,0
HD15 109	2,74	(0-4 ± 0,94)	3,28	(1-5 ± 1,08)	6,02	15,1

Min = mínimo; Max = máximo; dp = desvio padrão; TQ = total de quiasmas.

A análise de variância indicou haver diferença significativa ($P < 0,05$) na localização dos quiasmas terminais e intersticiais entre os genitores e híbridos (Tabela 2).

Tabela 2 Resumo da análise de variância para os tipos de quiasmas (Q) em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Q Terminal	Q Intersticial
Genótipos	5	13,75*	57,05*
Erro	294	0,95	0,89
Coeficiente de variação (%)		33,72	24,18

GL = graus de liberdade, * $P < 0,05$.

Irregularidades no comportamento meiótico dos genitores e, principalmente, dos híbridos foram observadas durante as fases da meiose I e II (Figuras 2 e 3; Tabela 3). Foi encontrado maior percentual de cromossomos precoces e retardatários em metáfase I, anáfase I e telófase I, porém observados em menor quantidade na meiose II na maioria dos indivíduos (Figuras 2d, 2f, 2h, 2i e 3b, 3i, 3m). Algumas células apresentaram ponte cromossômica formada durante a segregação cromossômica em anáfase I ou II (Figuras 2e e 3j). Na meiose II foram observadas algumas células com assincronia durante a divisão celular, com células apresentando um grupo cromossômico em metáfase e outro em anáfase, ou um grupo cromossômico na placa metafásica e outro grupo desorganizado (Figuras 3e e 3h). Em algumas células também foram encontradas irregularidades na orientação das fibras do fuso em meiose II, onde grupos cromossômicos de uma mesma célula se posicionaram na placa metafásica de forma irregular, dando origem à formação de fuso transversal em formato de

“T” (Figuras 3c e 3g) ou fuso tripolar em formato de “V” (Figura 3d). Essas irregularidades na formação das fibras do fuso levou a alteração na posição dos quatro núcleos formados ao final da meiose, na telófase II, com assimetria no alinhamento dos núcleos sendo consequência da organização irregular em metáfase II e anáfase II (Figura 3l). Outra alteração encontrada em algumas células foi à formação de três núcleos em vez de quatro e cromossomos retardatários em telófase II (Figura 3m).

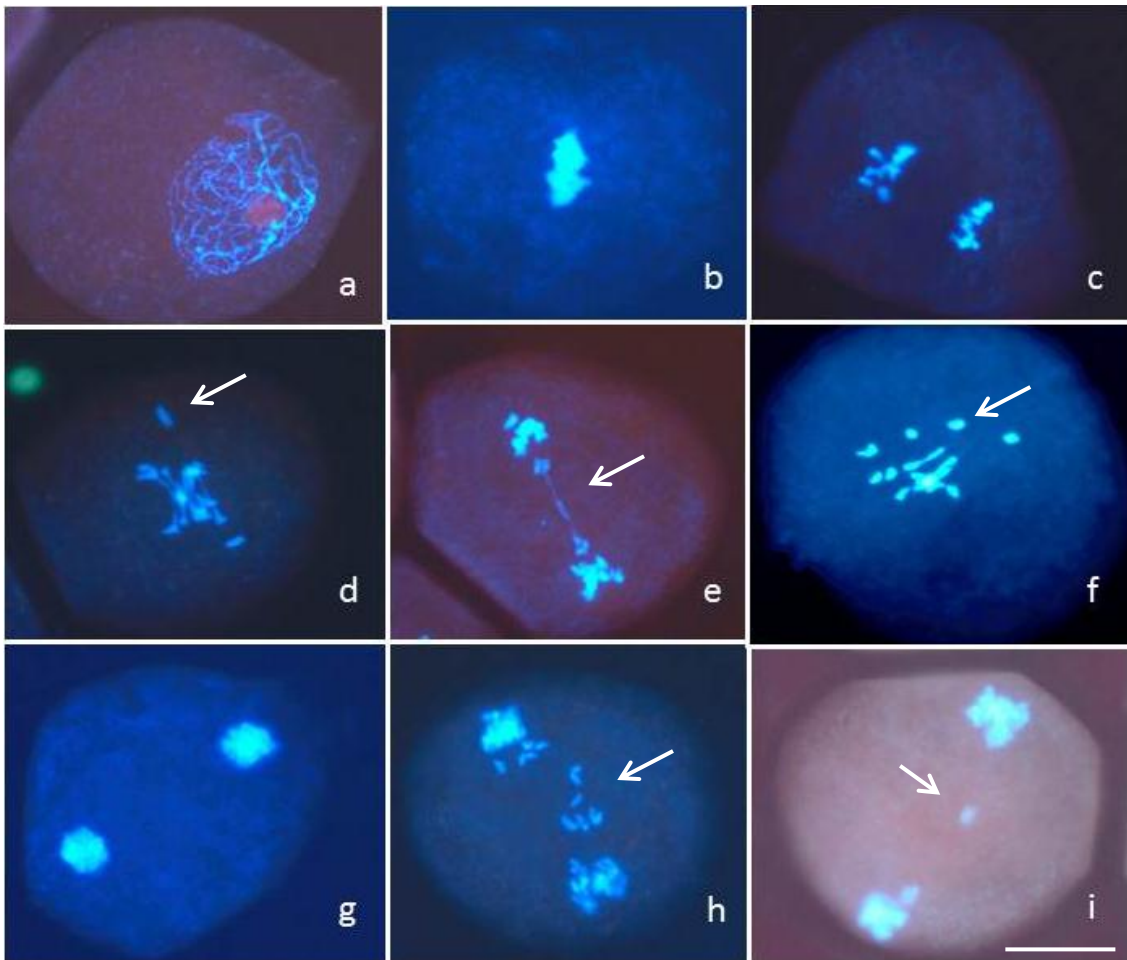


Figura 2 Comportamento meiótico na meiose I em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15. **a)** Paquíteno em *P. gardneri*; **b)** Metáfase regular em *P. gibertii*; **c)** Anáfase regular em HD15 101; **d)** Anáfase com cromossomos precoces em HD15 106 (seta); **e)** Anáfase com ponte cromossômica em HD15 107(seta); **f)** Anáfase com cromossomos univalentes em HD15 109 (seta); **g)** Telófase regular em HD15 106; **h)** Telófase com muitos cromossomos retardatários em HD15 107(seta); **i)** Telófase com cromossomo retardatário em HD15 101(seta). Barra = 20 μ m.

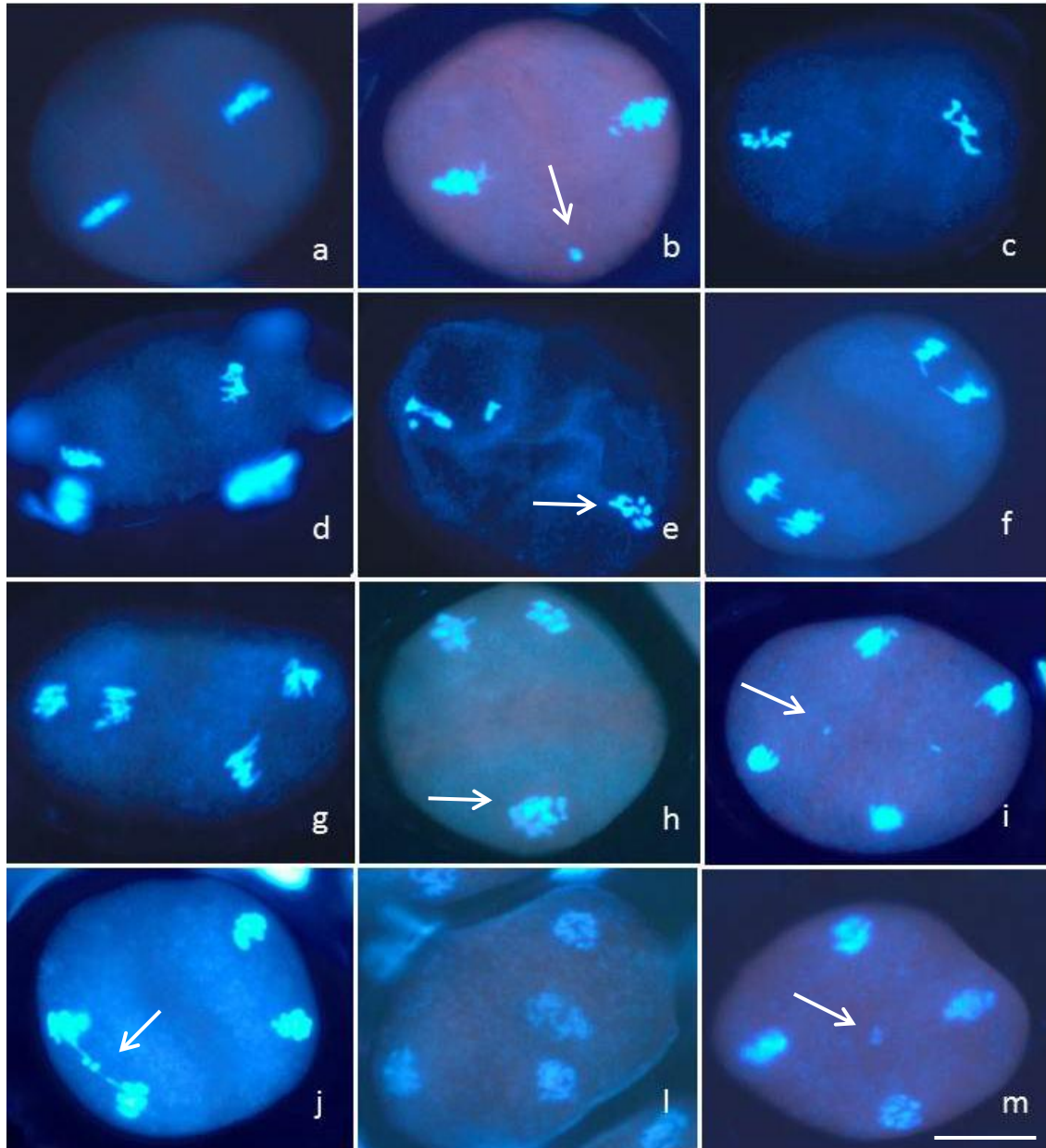


Figura 3 Comportamento meiótico na meiose II em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15. **a)** Metáfase regular em *P. gardneri*; **b)** Metáfase com cromossomo precoce em *P. gibertii* (seta); **c)** Metáfase com fuso transverso em formato de “T” em HD15 101; **d)** Metáfase com fuso tripolar em formato de “V” em HD15 106; **e)** Metáfase com cromossomo precoce e assincronia em HD15 107 (seta); **f)** Anáfase regular em HD15 109; **g)** Anáfase com irregularidade de fuso em HD15 101; **h)** Anáfase com assincronia em HD15 106 (seta); **i)** Anáfase com cromossomos retardatários em HD15 107 (seta); **j)** Anáfase com ponte cromossômica em HD15 109 (seta); **l)** Telófase com assimetria no alinhamento dos núcleos em *P. gibertii*; **m)** Telófase com cromossomo retardatário em *P. gardneri* (seta). Barra = 20 μ m.

Tabela 3 Células observadas com irregularidades no comportamento meiótico em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15

Genótipos	Cromossomos precoces/retardatários						Ponte cromossômica		Assincronia		Irregularidade de fuso			Três núcleos	
	MI	AI	TI	MII	AII	TII	AI	AII	MII	AII	MII	AII	TII	TII	
<i>P. gardneri</i>	11	9	6	8	9	7	1	0	5	5	6	5	5	3	
<i>P. gibertii</i>	15	12	8	8	5	3	0	0	11	6	6	12	14	4	
HD15 101	19	14	11	9	7	8	2	1	7	7	14	9	7	3	
HD15 106	16	13	8	11	8	6	1	0	7	4	8	7	8	2	
HD15 107	15	14	11	10	7	7	0	2	5	4	13	9	9	5	
HD15 109	21	14	15	11	8	10	1	2	7	3	12	8	7	1	

M = metáfase; A = anáfase; T = telófase; I = meiose I; II = meiose II.

Produtos pós-meióticos irregulares também foram encontrados, como mônades, díades, políades e tríades (Figura 4), sendo a última mais frequente em todos os indivíduos. O IM variou entre 92,8 no híbrido HD15 109 e 96,7 no genitor *P. gardneri* (Tabela 4). O quadrado médio indicou haver diferença significativa ($P < 0,05$) para as irregularidades dos produtos pós-meióticos, menos para mônades (Tabela 5).

Tabela 4 Valores médios de produtos pós-meióticos (tétrades normais e irregularidades) e índice meiótico (IM) em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15

Genótipos	Tétrades normais	PPM				Total PPM	IM (%)
		Irregularidades					
		Mônades	Díades	Tríades	Políades		
<i>P. gardneri</i>	1175	1,5	4,2	31,7	2,5	1215	96,7
<i>P. gibertii</i>	951,5	1,2	3	29,5	1,7	987	96,4
HD15 101	873,2	1,5	8,7	51,5	4	939	92,9
HD15 106	840	1,5	6,5	48,7	2,2	899	93,4
HD15 107	811,7	2	9,2	45,2	4,5	872,7	93
HD15 109	906	1,2	9,5	52,7	6,5	975,5	92,8

PPM = produto pós-meiótico; IM = índice meiótico.

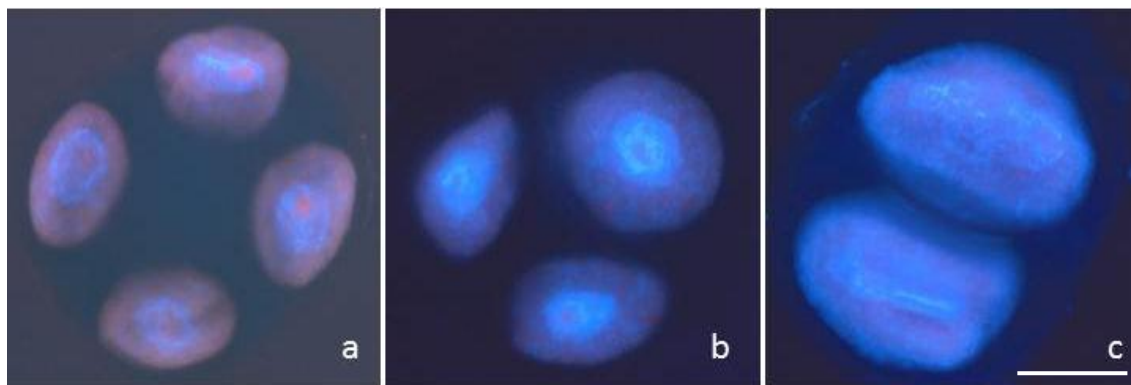


Figura 4 Produtos pós-meióticos em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15. **a)** Tétrade normal observada em HD15 101; **b e c)** irregularidades nos produtos pós-meióticos; **b)** tríade em HD15 106; **c)** díade em HD15 107. Barra = 20 µm.

Tabela 5 Resumo da análise de variância para os diferentes tipos de produtos pós-meióticos em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15

FV	GL	QM				
		Tétrades	Tríades	Díades	Mônades	Políades
Genótipos	5	69241,6*	411,1*	29,56*	0,3 ^{NS}	12,66*
Erro	18	22571,25	67,94	9,08	0,8	1,69
CV (%)		16,22	19,06	44,11	59,84	36,33

FV = Fonte de variação; GL = grau de liberdade; CV = coeficiente de variação; QM = quadrado médio; *P < 0,05; ^{NS} = não significativo.

4.2 Viabilidade polínica

Os grãos de pólen dos genitores e dos híbridos HD15 reagiram positivamente aos dois testes utilizados (Figura 5). Com a solução de Alexander, os genitores *P. gardneri* e *P. gibertii* apresentaram maiores percentuais de GP viáveis, 83,3 e 87,7%, respectivamente. Nos híbridos o percentual médio de GP viáveis, com parede e citoplasma íntegros, ficou abaixo de 42%; foram observados os três tipos de GP inviáveis. O maior percentual de GP T1 (vazio) foi encontrado no híbrido HD15 101 (16,6%), o GP T2 (citoplasma contraído) foi encontrado no híbrido HD15 106 (15,2%) e o GP T3 (citoplasma fragmentado) que foi observado somente nos híbridos, com maior percentual em HD15 109 (42,3%) (Tabela 6). A análise de variância mostrou diferenças significativas (P < 0,05) para viabilidade do pólen em ambos os testes e para os diferentes tipos de inviabilidade, vazio (T1), contraído (T2) e pulverizado (T3) (Tabela 7).

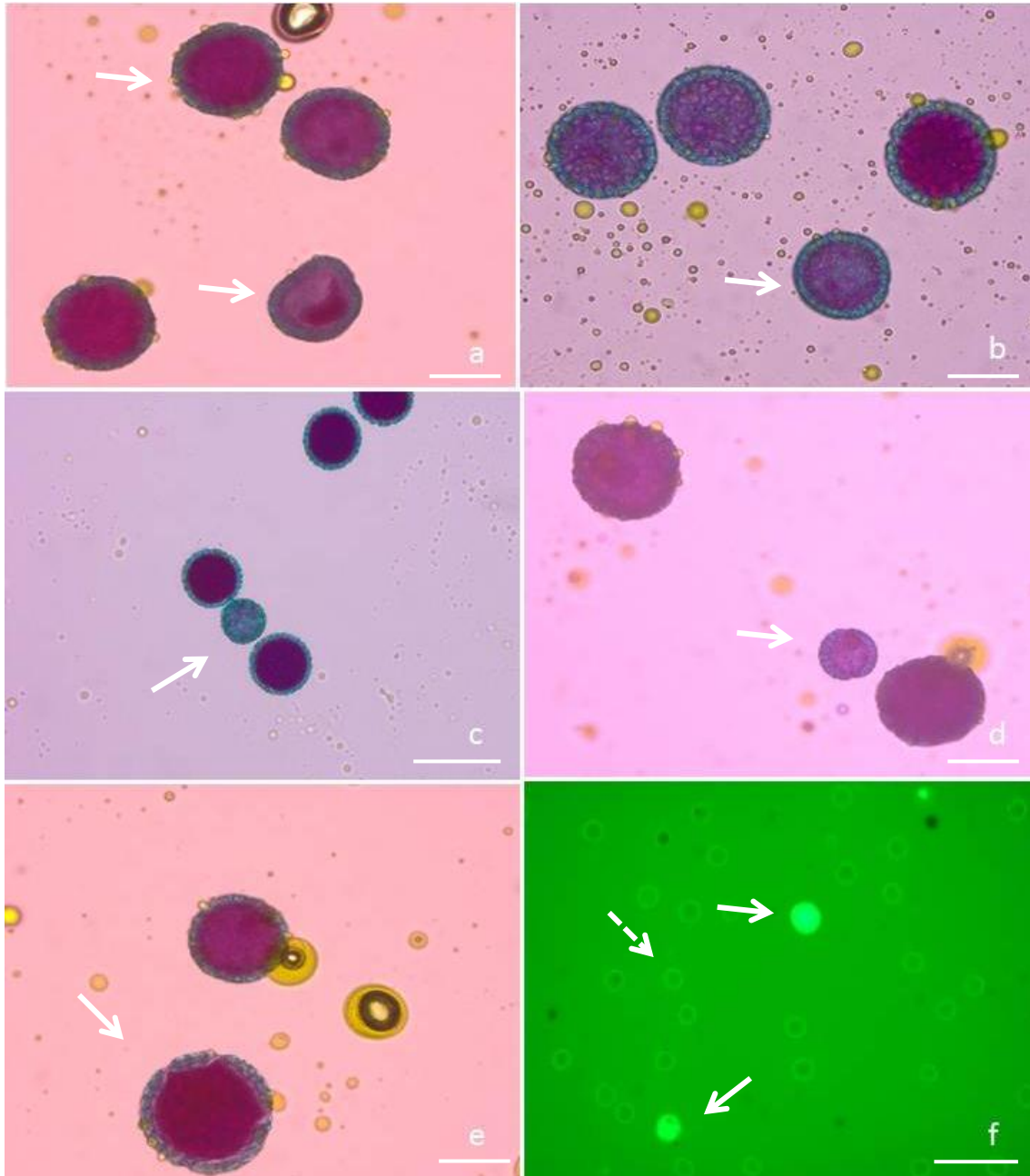


Figura 5 Grãos de pólen (GP) em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15. **a–e)** teste com solução de Alexander **a)** GP viável – citoplasma vermelho (seta) e GP inviável contraído (seta) em HD15 101, Barra = 20 µm; **b)** GP inviável pulverizado em HD15 106, Barra = 20 µm; **c)** GP inviável vazio em HD15 107, Barra = 50 µm; **d)** GP inviável do tipo microgrão em HD15 109, Barra = 20 µm; **e)** GP gigante em *P. gardneri* (seta), Barra = 20 µm; **f)** teste com diacetato de fluoresceína evidenciando GP verdes fluorescentes viáveis (seta) e não fluorescentes inviáveis (seta tracejada) em HD15 101. Barra = 100 µm.

Para análise da viabilidade polínica utilizando o fluorocromo diacetato de fluoresceína foram observados baixos percentuais de grãos de pólen viáveis em todos os genótipos, com percentuais médios que variaram de 6,1% em HD15 101 a 19,8% em *P. gardneri* (Tabela 6).

Tabela 6 Valores percentuais médios de GP viáveis e inviáveis T1, T2 e T3 utilizando diacetato de fluoresceína e solução de Alexander em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15

Genótipos	Diacetato de fluoresceína		Solução de Alexander			
	% GP viável	% GP inviável	% GP T1	% GP T2	% GP T3	% GP viável
<i>P. gardneri</i>	19,8	80,2	7,3	7,7	-	83,3
<i>P. gibertii</i>	18	82	6,9	4,2	-	87,7
HD15 101	6,1	93,9	16,6	13,5	26,6	41,7
HD15 106	8,3	91,7	11,8	15,2	37,6	33,8
HD15 107	7,4	92,6	11,2	11,8	40,3	35,0
HD15 109	10,3	89,7	10,3	14	42,3	31,5

GP = grão de pólen; T1 = vazio; T2 = contraído; T3 = pulverizado.

Tabela 7 Resumo da análise de variância para o total de GP viável (V) e inviável (Inv) com diacetato de fluoresceína e solução de Alexander em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15

FV	GL	Quadrado médio					
		Diacetato de fluoresceína		Solução de Alexander			
		GP V	GP Inv	GP V	GP Inv T1	GP Inv T2	GP Inv T3
Genótipos	5	13610,67*	136010,67*	272411,1*	4990,96*	7181,24*	155607,4*
Erro	18	1093,2	1098,2	1564,6	733,7	731,7	730,6
CV (%)		28,47	3,74	7,59	25,33	24,43	11,05

FV = fonte de variação; CV = coeficiente de variação; GL = grau de liberdade; T1 = vazio; T2 = contraído; T3 = pulverizado. *P < 0,05.

O diâmetro dos GP viáveis e inviáveis variou entre os genótipos. O diâmetro médio dos GP viáveis variou entre 57,1 µm em HD15 106 e 60,1 µm em *P. gardneri*. O GP inviável T1 apresentou o menor comprimento (52,2 µm) em *P. gibertii* quando comparados com os outros tipos de GP inviáveis. O GP T2 variou de 54,6 µm a 57,7 µm e o GP T3, observado apenas nos híbridos variou de 56,4 µm a 58,1 µm, ambos com comprimentos menores que o GP viável (Tabela 8). A análise de variância mostrou haver diferença significativa (P < 0,05) nos genitores e híbridos para característica comprimento do GP viável, inviável T1, inviável T2 e inviável T3 (Tabela 9). GP do tipo microgrão e GP gigantes também foram encontrados em um percentual bem menor em todos os genótipos analisados (Figuras 5d e 5e).

Tabela 8 Valores médios, mínimos e máximos do diâmetro (μm) de GP viáveis e inviáveis T1, T2 e T3 utilizando a solução de Alexander em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15

Genótipos	GP Viável		GP Inviável		
	(Min-Max) Med	T1	T2	T3	
<i>P. gardneri</i>	(56,7 - 64,6) 60,1	(51,2 - 57,9) 54,8	(52,2 - 56,8) 54,6	0	
<i>P. gibertii</i>	(53,4 - 62,8) 58,1	(49,5 - 54,9) 52,2	(52,4 - 59,5) 56,0	0	
HD15 101	(53,4 - 64,4) 58,2	(51,5 - 57,9) 55,0	(55,3 - 59,8) 57,4	(53,4 - 64,4) 58,1	
HD15 106	(54,4 - 59,9) 57,1	(49,6 - 57,4) 54,8	(55,1 - 64,4) 57,7	(53,7 - 64,4) 57,4	
HD15 107	(57,0 - 63,8) 60,1	(49,6 - 57,2) 53,1	(53,6 - 58,8) 55,9	(52,4 - 58,8) 56,4	
HD15 109	(55,5 - 61,8) 58,6	(49,9 - 56,4) 53,6	(53,7 - 63,6) 57,7	(53,4 - 62,4) 57,6	

Min = mínimo; Max = máximo; Med = média; T1 = vazio; T2 = contraído; T3 = pulverizado.

Tabela 9 Resumo da análise de variância para característica diâmetro do GP viável e inviável T1, T2, e T3 utilizando a solução de Alexander em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		GP Via	GP Inv T1	GP Inv T2	GP Inv T3
Genótipos	5	82,81*	52,81*	66,96*	44232,45*
Erro	294	4,84	3,14	2,6	3,92
CV (%)		3,76	3,3	2,85	5,16

GL = grau de liberdade; CV = coeficiente de variação; T1 = vazio; T2 = contraído; T3 = pulverizado. *P < 0,05.

4.3 Citogenética Molecular

A GISH foi aplicada na subfase diacinese da prófase I, permitindo distinguir o conjunto cromossômico de cada genitor nos híbridos, e confirmando o caráter híbrido em todas as plantas F₁ analisadas. Foram observados nove cromossomos fortemente hibridados marcados em verde (FITC), representando o genoma paterno, *P. gibertii*, e nove cromossomos contracolorados com DAPI, representando o genoma materno, *P. gardneri* (Figura 6). Foi possível observar o pareamento cromossômico entre os cromossomos homeólogos da progênie HD15 ($n = 9$) com a formação de bivalentes (Figuras 6a - d) e tetravalentes (Figura 6c), ausência de pareamento resultando em univalentes em todos os genótipos híbridos (Figuras 6a - d) e pareamento entre cromossomos do mesmo genoma (Figura 6d).

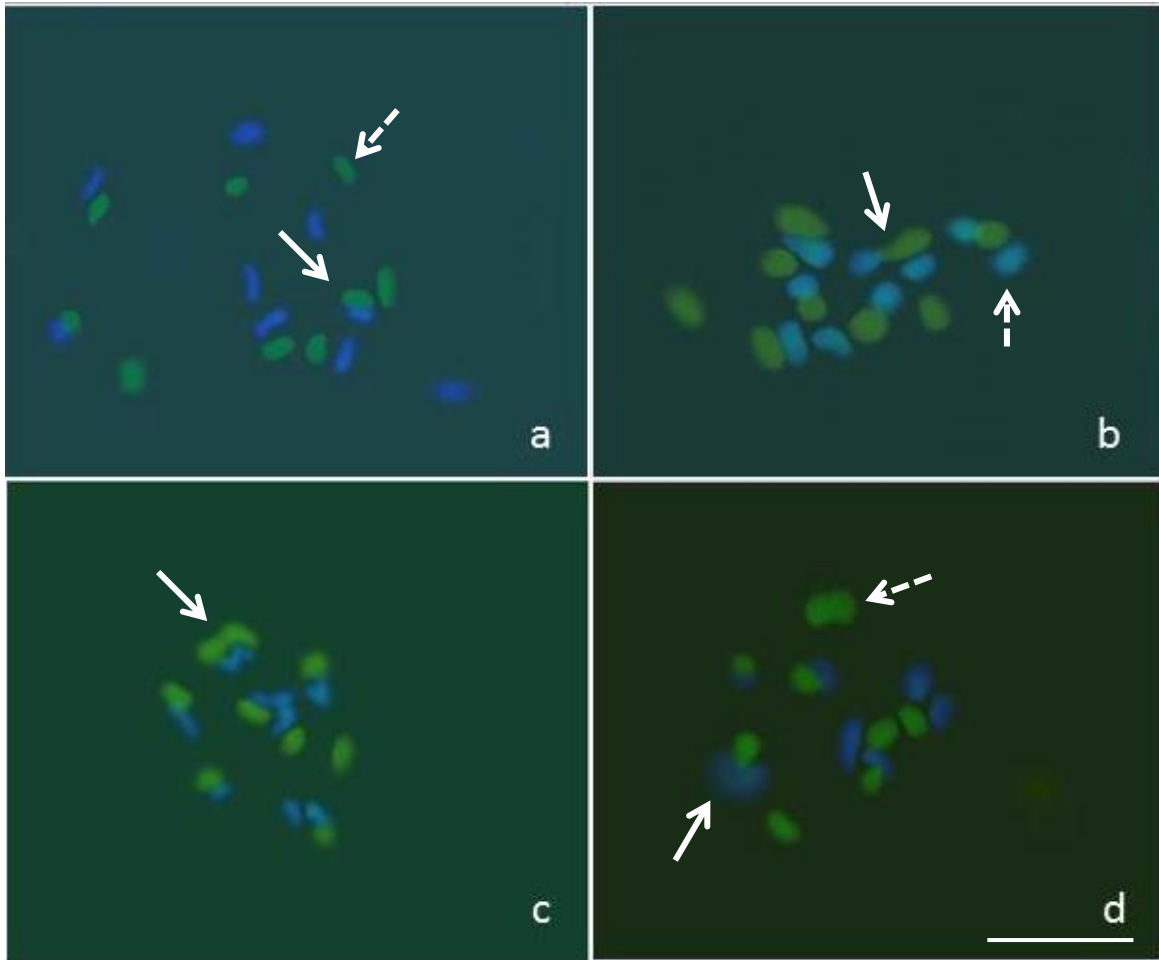


Figura 6 Hibridação genômica *in situ* (GISH) em diacinese em genitores de *Passiflora* e híbridos F₁ da progênie HD15. **a)** HD15 101 com pareamento entre cromossomos homeólogos (seta) e univalentes (seta tracejada); **b)** HD15 106 com pareamento de homeólogos e univalentes; **c)** HD15 107 com pareamento de homeólogos, univalentes e tetravalentes (seta); **d)** HD15 109 com pareamento de homeólogos, univalentes, tetravalentes (seta) e pareamento de cromossomos do mesmo genoma (seta tracejada). Barra = 10µm.

5 DISCUSSÃO

A meiose é um evento longo, de elevada complexidade mecânica e bioquímica, altamente conservada entre as espécies (GUERRA, 1988; PAGLIARINI; POZZOBON, 2004), de alta estabilidade evolutiva que reduz o número cromossômico nas células filhas à metade. O curso normal da meiose garante a viabilidade do gameta e qualquer irregularidade pode resultar em produtos pós-meióticos anormais e, conseqüentemente, na infertilidade da planta (PAGLIARINI, 2000). O pareamento cromossômico é um dos eventos mais importantes da meiose, pois precisa ocorrer para que haja *crossing over*, que juntamente com a formação de células haploides, justifica a necessidade de duas divisões sucessivas que

caracteriza a meiose, ao invés de apenas uma, bem mais simples, como na mitose. Em híbridos interespecíficos, onde a célula carrega no núcleo genomas de genitores diferentes, pode ocorrer ausência de pareamento entre os genomas durante as fases da meiose afetando diretamente o seu potencial reprodutivo. Porém, todas as etapas da meiose estão suscetíveis a mutações que podem ocorrer de forma natural ou induzida, alterando os genes envolvidos nessas etapas e causando irregularidades (LOPES, 2006; PAGLIARINI, 2000).

As mutações na meiose mudam drasticamente o comportamento dos cromossomos e podem ocorrer na pré-meiose, meiose e pós-meiose. Os primeiros mutantes sinápticos, que afetam a prófase I e causam erros na sinapse, foram descobertos por Beadle and McClintock em 1928 em milho (SINGH, 2003). Após essa descoberta, muitos mutantes sinápticos foram identificados em uma grande variedade de espécies (KODURU; RAO, 1981), como o *afd1* que causa ausência da primeira divisão em arroz (GOLUBOVSKAYA et al., 2011), o *syn1/dif1* que causa erros no pareamento em *Arabidopsis* (LIU; QU, 2008), os *dy* e *dys1* que afetam a formação da sinapse e reduzem as taxas de recombinação, observados em *Zea mays* L. (BASS et al., 2003). Os mutantes meióticos são quase sempre identificados através de análises citogenéticas, evidências genéticas e quantidade de óvulos e de pólen abortados, sendo comum ocorrer em populações naturais de origem espontânea, induzidas por mutagênicos ou ser resultados de hibridações interespecíficas (SINGH, 2003).

Na progênie F₁ HD15 foram observados híbridos com número haploide $n = 9$ com pareamento cromossômico e formação de bivalentes. Algumas irregularidades como a formação de tetravalentes e multivalentes também foram encontradas, demonstrando assim a existência de pareamento envolvendo homólogos e homeólogos entre os genomas dos genitores. A presença de multivalentes pode ser indicativa de recombinação meiótica entre cromossomos homólogos (SOARES-SCOTT et al., 2003). Essas diferentes configurações cromossômicas indicam similaridade estrutural e genômica, fornecendo evidências de fluxo gênico entre as espécies genitoras e demonstrando o grau de proximidade filogenética entre elas (TECHIO; DAVIDE, 2007). Outros híbridos de *Passiflora*, da progênie F₁ de *P. foetida* var. *foetida* vs *P. palmeri* var. *sublanceolata*, demonstraram pareamento de bivalentes em dois grupos com $n = 10$ e $n = 11$ em cerca de 90% das células analisadas (ABREU, 2008). O pareamento completo ou quase completo em híbridos indica similaridade genotípica entre as espécies (ABREU, 2008; RISSO-PASCOTTO et al., 2005) e o sucesso dessas hibridações se deve em grande parte ao seu grau de parentesco e similaridade, como observados nos híbridos F₁ HD15 de *Passiflora*.

Dados sobre o pareamento cromossômico em híbridos são úteis para selecionar espécies que são geneticamente mais próximas (TECHIO; DAVIDE, 2007), sendo úteis para análise dos índices de recombinação e variabilidade genética (SYBENGA, 1999). A manutenção dos bivalentes até a metáfase I ocorre através da formação de quiasmas, e é necessária para manter a estabilidade genética e para que ocorra a segregação regular dos cromossomos na anáfase (SYBENGA, 1992). A frequência de quiasmas é um indicador de parentesco entre espécies e do grau de recombinação genética e está sob controle poligênico (PAGLIARINI, 2000; PAGLIARINI; POZZOBON, 2004). Univalentes foram observados nas células em diacinese tanto nos genitores quanto nos híbridos HD15, podendo ser resultado de mutações assinápticas que impedem a formação do complexo sinaptonêmico e consequentemente do pareamento dos cromossomos homólogos (SINGH, 2003) ou pela baixa frequência de quiasmas observada nos híbridos que leva a separação dos bivalentes antes da metáfase I formando os univalentes observados na prófase e em outras fases da meiose como cromossomos retardatários ou precoces. Entretanto, o IR sugere que houve recombinação dos cromossomos nos genótipos híbridos de HD15. A formação de univalentes já foi relatada em outras espécies como em *Capsicum* L. (SOUZA et al., 2012), em 15 espécies de *Passiflora* L. (SOUZA et al., 2003a; SOUZA; PEREIRA, 2011), em *Paspalum* (BERNARDO FILHO, 2012) e pode ter ocorrido devido à baixa frequência de quiasmas.

A análise do número de quiasmas terminal, intersticial e total nas células em diacinese e demonstrou maior formação de quiasmas intersticial tanto nos genitores quanto nos híbridos HD15, indicando a existência de pelo menos um quiasma por bivalente e associação cromossômica. O total de quiasmas variou com média de 5,3 no híbrido HD15 101 a 9,14 em *P. gardneri*. Os valores médios observados nos híbridos HD15 para quiasmas terminais ($< 2,75$) e intersticiais ($< 3,45$) foram considerados baixos em comparação aos genitores e de outras espécies de *Passiflora* (SOUZA et al., 2003a; SOUZA; PEREIRA, 2011). Os resultados desse estudo confirmaram a predominância de quiasmas intersticial observados em outras espécies de *Passiflora* como *P. amethystina*, *P. mucronata*, *P. gibertii* e *P. cincinnata*, sendo que a média de quiasmas por célula nas espécies $n = 9$ variou de 8,70 em *P. alata* a 14,72 em *P. malacophylla* (SOUZA; PEREIRA, 2011). O quiasma terminal mantém a estrutura física do bivalente para a perfeita segregação cromossômica e o quiasma intersticial é indicador de recombinação (LOPES, 2006; SOUZA et al., 2012). O baixo número de quiasmas nos híbridos HD15 pode ter levado à formação de cromossomos univalentes e irregularidades observadas em algumas fases da meiose. Em muitas linhagens puras de *Zea mays* o aparecimento de cromossomos univalentes está diretamente relacionado com a baixa

frequência de quiasmas (PAGLIARINI, 2000). Apesar da baixa frequência de quiasmas observada nos híbridos HD15, o índice de recombinação e maior ocorrência de quiasmas intersticiais sugerem que houve recombinação entre cromossomos homeólogos das espécies genitoras nos híbridos aumentando a variabilidade genética e interferindo diretamente na adaptação desses indivíduos no ambiente. Embora a formação de quiasmas seja consequência do *crossing over*, eles possuem uma importante função na manutenção dos bivalentes e asseguram a perfeita segregação dos cromossomos na metáfase I (SUMNER, 2003).

O estudo detalhado do comportamento meiótico e da viabilidade polínica em *Passiflora* deve preceder aos processos de hibridação, já que a análise das diferentes fases da meiose fornece informações importantes sobre o pareamento cromossômico nos híbridos, índice de recombinação, tipos de irregularidades e viabilidade dos gametas nas plantas híbridas (SOUZA et al., 2003a). Os eventos da meiose são controlados por fatores genéticos, sendo assim mutáveis e responsáveis por algumas irregularidades meióticas, como os cromossomos retardatários (CONSOLARO et al., 1996) e a formação das fibras do fuso acromático (SHAMINA, 2005). As irregularidades meióticas não são desejáveis, pois alteram os genótipos e ocasionam instabilidade meiótica, característica indesejada que dificulta os trabalhos de hibridação interespecífica em programas de melhoramento por causar variação cromossômica em função da perda ou ganho de cromossomos nos descendentes (DEFANISCOARIZE et al., 1996).

As mutações na meiose I ou II afetam diretamente a androsporogênese e a ginosporogênese, resultando em esporos desbalanceados e causam esterilidade na planta (SINGH, 2003). A aneuploidia é um fenômeno comum em híbridos interespecíficos e é decorrente de fragmentação cromossômica, formação de pontes anafásicas, não alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, segregação irregular, com formação de micronúcleos e desbalanço (NASS et al., 2001) causando aumento ou diminuição de um ou mais pares de cromossomos. Nos híbridos HD15 não foram observadas células com aneuploidias, porém o índice de univalentes observados em todos os genótipos pode levar à instabilidade cromossômica em progênies F₂ e em progênies subsequentes, como ocorrido em alotetraploides de *Boronia* Sm. (SHAN et al., 2003) e em híbridos triploides de trigo (ALONSO; KIMBER, 1981).

Irregularidades foram observadas nas fases da meiose nos genitores e híbridos HD15 como cromossomos precoces ou retardatários, ponte cromossômica, assincronia, irregularidade na orientação das fibras do fuso, formação de três núcleos e podem ser resultado de mutações gênicas ou de fatores ambientais. A formação de cromossomos

precoces ou retardatários é caracterizada por um ou mais cromossomos univalentes que não se alinham na placa metafásica durante a metáfase I ou II podendo ser consequência da baixa frequência de quiasmas, sendo observada na progênie HD15, principalmente durante a meiose I. Cromossomos precoces e retardatários podem resultar em segregação irregular e formação de micronúcleo. Em híbrido somático de *P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. incarnata* e em híbrido sexuado de *P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. setacea* foi observada segregação irregular de cromossomos ocasionada pela presença de univalentes e cromossomos retardatários (SOARES-SCOTT et al., 2003). O estudo do comportamento meiótico de híbridos do cruzamento entre *Brachiaria ruziziensis* vs *Brachiaria brizantha* mostrou a formação de cromossomos precoces ou retardatários dando origem a micronúcleos em telófase I que permaneceram até a meiose II, resultando em citocinese irregular (RISSO-PASCOTTO et al., 2005). Em *P. edmundoi* cromossomos retardatários foram encontrados em 9,75% das células em metáfase I enquanto na telófase II esse percentual foi apenas 1,22%, sugerindo a ocorrência de checkpoint durante as fases da meiose (SOUZA et al., 2003a). Assim, esses pontos de checagem funcionaram de forma a garantir segregação cromossômica regular. Pontos de checagem ocorrem durante o ciclo celular e mantêm os cromossomos alinhados na placa metafásica e ligados às fibras do fuso nas metáfases I e II (YAMAMOTO et al., 2008).

Genes estão envolvidos na orientação das fibras do fuso e transmitem sinais para formar as fibras na posição correta (GROSSI et al., 2011; CAETANO-PEREIRA; PAGLIARINI, 2001), conduzindo à perfeita segregação dos cromossomos para os polos opostos da célula e mantendo o curso normal na meiose. Algumas mutações também podem causar falhas na formação das fibras do fuso e interferir na segregação cromossômica, interferindo na orientação das fibras do fuso, que podem unir ou separar os complementos cromossômicos (SHAMINA et al., 2000; PAGLIARINI, 2000). A formação de fusos anormais em forma de “T” (transverso) ou “V” (tripolar), como observados nos genitores e híbridos HD15, ocorre devido à desorganização na orientação das fibras do fuso, que não se alinham de forma paralela, se organizando de forma transversa ou convergente (GROSSI et al., 2011). Tanto o fuso tripolar quanto o fuso transverso podem levar à formação de gametas $2n$ se dois núcleos estiverem muito próximos na telófase II, formando como produto final mônades, díades ou tríades (PAGLIARINI, 2000; GROSSI et al., 2011; SOUZA; PEREIRA 2011). Entretanto, essas irregularidades nas fibras do fuso também podem resultar em grãos de pólen de tamanho reduzido ou aumentado por estarem desbalanceados em relação ao número de cromossomos (SOUZA et al., 2003a). Irregularidades envolvendo a orientação das fibras do fuso ocorrem em diversas espécies de *Passiflora* (SOARES-SCOTT et al., 2003;

SOUZA; PEREIRA, 2011; SOUZA et al., 2003a; SOUZA et al., 2008), de *Brachiaria* (RISSO-PASCOTTO et al., 2005; FUZINATTO et al., 2012), *Zea mays* (RICCI et al., 2007) e na família Meliaceae (GROSSI et al., 2011), causando perda de material genético e dando origem a gametas aneuploides ou duplicando o material genético dando origem a gametas não reduzidos. As espécies genitoras e os híbridos HD15 analisados nesse estudo demonstraram a presença dessas irregularidades da metáfase II até a telófase II, sendo que o genitor *P. gibertii* foi o genótipo em que mais ocorreu anormalidades envolvendo as fibras do fuso.

Assincronia também foi encontrada em metáfase II e anáfase II em todos os genótipos analisados. A falta de sincronia é exclusiva na meiose II e caracteriza-se pela presença de dois conjuntos cromossômicos de uma mesma célula em fases distintas do ciclo celular. Essa irregularidade pode ser resultado da despolimerização das fibras do fuso na célula, resultando na formação de três núcleos em telófase II (SOUZA et al., 2003a), originando gametas não reduzidos ou desbalanceados. Em *P. edulis* f. *flavicarpa*, espécie domesticada e de valor agrônomico, a assincronia também foi encontrada na segunda divisão meiótica (SOUZA et al., 2000).

A formação de ponte cromossômica observada em anáfase I e II foi a irregularidade menos observada nos genótipos e não foi encontrada em *P. gibertii*. Esses dados confirmam um estudo já relatado para espécies silvestres de *Passiflora*, onde não foi observada ponte cromossômica em *P. gibertii* (SOUZA; PEREIRA, 2011). Uma das prováveis causas dessa irregularidade nos híbridos HD15 e no genitor *P. gardneri* pode estar relacionada com falhas na terminalização de quiasmas (ORTIZ et al., 2011) ou pode ser atribuída a inversões paracêntricas (ELLIOTT, 1958). Essas pontes surgem em momentos de quebra e fusão (*crossing over*) espontâneas nos cromossomos homólogos na meiose e não são formadas quando a quebra envolve o centrômero (inversões pericêntricas) (ELLIOTT, 1958; LEVIN, 2002). Essas irregularidades também podem interferir na segregação cromossômica e reduzir a fertilidade das plantas.

As irregularidades meióticas são responsáveis por formar produtos pós-meióticos anormais, como mônades, díades, tríades e políades. A formação da citocinese é determinada pela posição e pelo número de núcleos formados ao final da meiose II, assim o alinhamento da clivagem no citoplasma é regulado pela localização dos cromossomos (LORSON et al., 2000). Tríade foi a irregularidade mais observada nos genitores e híbridos HD15 e pode ter sido ocasionada por erros na orientação das fibras do fuso ou pela assincronia encontrada nas fases da meiose. A formação de mônades, pouco observada nos genótipos, pode ter sido resultado da ausência de citocinese ao final da telófase II, resultando também em gametas

desbalanceados ou não reduzidos, como observado em outras espécies do gênero (SOUZA; PEREIRA, 2011).

O índice meiótico ficou acima de 90% nos genitores e híbridos HD15, indicando que células com irregularidades meióticas foram menos frequente do que células normais e sugerindo a eficácia dos pontos de checagem durante a meiose. IM acima de 90% indica estabilidade meiótica (LOVE, 1951), assim o elevado IM permite considerar os genótipos estudados como organismos citologicamente estáveis. Muitas espécies de *Passiflora* possuem IM acima de 90% como em *P. edulis*, *P. alata*, *P. rubra*, *P. cincinnata* e *P. edmundoi* (SOUZA; PEREIRA, 2011; SOUZA et al, 2003a).

Espécies com baixos IM são instáveis citologicamente e produzem gametas aneuploides, principalmente por falhas na segregação dos cromossomos na meiose I ou II, ou gametas poliploides de vários tamanhos e inviáveis. Genótipos com viabilidade polínica acima de 90% são desejados em programas de melhoramento de plantas, uma vez que altos percentuais de GP viáveis aumentam as chances de fertilização (TECHIO et al., 2006b; BRITO, 2013) e em espécies alógamas, como o maracujazeiro, quanto maior a viabilidade polínica, maior a variabilidade genética decorrente de diferentes combinações alélicas trazidas pelos gametas masculinos e femininos (SOUZA et al., 2002).

Utilizando a solução de Alexander, a viabilidade polínica nos genitores foi acima de 80%, semelhante a outros estudos envolvendo espécies de *Passiflora* (SOUZA et al., 2003a; SOARES-SCOTT et al., 2003; SOUZA et al., 2004; MELETTI et al., 2003; SOUZA, 2014). Entretanto, nos híbridos HD15 foram verificados baixos percentuais de GP viável, em torno de 35%. Assim como relatado em outros estudos, a viabilidade polínica para espécies de *Passiflora* é alta, como em *P. alata*, *P. capsularis*, *P. foetida* (SOUZA et al., 2004; MELETTI et al., 2003), *P. edmundoi* (SOUZA et al., 2003a), *P. edulis* (SOUZA et al., 2004; MORENO et al., 2015; SOARES-SCOTT et al., 2003) e *P. setacea* (SOARES-SCOTT et al., 2013); o percentual de GP viáveis acima de 70% é considerado alto em espécies de *Passiflora* (SOUZA et al., 2002). Foram verificados baixos percentuais de GP viáveis nos genitores e híbridos HD15 quando analisados pelo teste utilizando diacetato de fluoresceína. A principal propriedade da enzima esterase identificada através do diacetato de fluoresceína é promover a integridade da parede celular (HESLOP-HARRISON; HESLOP-HARRISON, 1970) e essa enzima está envolvida em reações de hidrólise de ésteres que podem ser alteradas à medida que ocorre mudanças drásticas nos níveis de temperatura e teor de água (SANTOS et al., 2004; ALVIM, 2008). Análises realizadas em milho indicaram não haver relação entre perda de viabilidade e atividade desta enzima (ALVIM, 2008).

Percentuais elevados de grãos de pólen viáveis são esperados como resultado de altos percentuais de tétrades normais em consequência de uma meiose regular (CORRÊA et al., 2005). Entretanto, GP inviáveis também podem ocorrer durante a androgametogênese por falhas no comportamento meiótico, baixa frequência de quiasmas e irregularidade de fuso (SOUZA et al., 2004; TWEL, 1995) que resultam em gametas desbalanceados, anucleados ou GP com citoplasma contraído, além de ter sido relacionada com a perda de água em outras espécies, como *Festuca arrundinaceae* (TECHIO et al., 2006b; ZANATTO et al., 2009). Contudo, a viabilidade polínica ainda pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma mesma espécie e entre flores coletadas de um mesmo indivíduo (TECHIO et al., 2006b).

Fatores ambientais e genéticos podem interferir na viabilidade polínica de uma espécie (SOUZA et al., 2004). A viabilidade do pólen pode variar ao longo do seu desenvolvimento, assim logo após a abertura da flor o GP é mais viável e vai perdendo sua viabilidade à medida que o tempo avança (SOUZA et al., 2002). A hibridação interespecífica, baixa frequência de quiasmas, irregularidades nas fases da meiose associados a fatores ambientais podem ter influência nos resultados obtidos nesse estudo com os híbridos HD15. Altos índices de umidade e temperaturas elevadas podem interferir na androsporogênese e androgametogênese, como observados no maracujazeiro-amarelo (SOUZA et al., 2002; SOUZA, 2014), além do período de florescimento e das diferenças genotípicas (TECHIO et al., 2006b) que podem ser encontrada nos híbridos. Em híbridos F₁ de *P. racemosa* vs. *P. mucronata*, *P. racemosa* vs. *P. gibertii* e *P. racemosa* vs. *P. edulis* verificou-se baixo percentual de GP viáveis, variando de 9,5% a 35,5% (SAMPAIO et al., 2013).

O diâmetro dos GP observados nos genitores foi relatado por Souza et al. (2004), onde foram encontrados maiores índices de GP inviável tipo 1 (vazio) com menores comprimentos que o GP tipo 2 (contraído). O GP T1 (vazio), por apresentar menores valores para diâmetro, pode ter sido originado por segregação cromossômica irregular ainda na androsporogênese, enquanto o GP T2 (contraído) pode ter sofrido ação gênica durante a fase de pós-meiose ou androgametogênese (SOUZA et al., 2004). Irregularidades durante a pós-meiose podem estar relacionadas à formação do GP T3 (pulverizado) observados em híbridos HD15, não muito comum em maracujazeiros, por ação de fatores genéticos e interferência de fatores ambientais. O GP T3 também foi observado em *P. palmeri* var *sublanceolata* (ABREU, 2008). Mutações gênicas também podem ocorrer na androgametogênese, na primeira divisão mitótica para formação do grão de pólen (TWELL, 1995), além disso, fatores genéticos e ambientais podem contribuir para formação de grãos de pólen inviáveis (SOUZA et al., 2004). GP gigantes observados nesse estudo podem ter sido originados pela formação de

díades e tríades com dois conjuntos cromossômicos, restaurando a diploidia observada nos GP não reduzidos.

A GISH tem tido papel importante para identificar os genomas dos genitores em híbridos interespecíficos (SCHWARZACHER, 2003a), para a observação do comportamento meiótico e do pareamento entre os cromossomos homólogos ou homeólogos (SILVA; SOUZA, 2013). Análise meiótica utilizando a GISH permite ainda identificar os cromossomos envolvidos na formação de univalentes, bivalentes, multivalentes e a frequência de quiasmas entre cromossomos homólogos (SILVA; SOUZA, 2013), que resultam em recombinação cromossômica.

Para a identificação do pareamento cromossômico em *Musa*, através da GISH, foram observadas células em metáfase I (JERIDI et al., 2011; ZWIERZYKOWSKI et al., 2008), como em dois híbridos triploides (AAB e ABB) do cruzamento *M. acuminata* (AA) vs. *M. balbisiana* (BB), com formação de univalente, bivalente e multivalente envolvendo cromossomos homeólogos o que sugere recombinação entre os genomas A e B (JERIDI et al., 2011). Em híbridos F₁ do cruzamento *Lilium longiflorum* vs. *Lilium asiatic* a GISH permitiu observar o pareamento de cromossomos homeólogos constituído pelo genoma de ambos os genitores formando bivalentes, poucos multivalentes e alguns bivalentes formados por dois cromossomos do mesmo genoma (ZHOU et al., 2008); a meiose desses híbridos foi irregular, com não separação de bivalentes e univalentes sendo divididos ocorrendo segregação de cromátides irmãs ainda na anáfase I, explicando a razão da total esterilidade e formação de um pequeno número de gametas não reduzidos (ZHOU et al., 2008). Em híbridos HD15, a GISH foi observada em células em diacinese devido aos cromossomos estarem condensados, pareados e espalhados pelo citoplasma, enquanto na metáfase I eles estão alinhados na placa metafásica tornando difícil a visualização dos pares cromossômicos. O pareamento dos híbridos HD15 apresentou formação de bivalentes entre cromossomos homeólogos e univalentes, entretanto, outras configurações também foram observadas, como formação de multivalentes e pareamento de não homólogos entre cromossomos do mesmo genoma. O pareamento dos cromossomos homeólogos nos híbridos confirma a similaridade entre os genomas dos genitores e que houve recombinação nos híbridos. Além disso, o pareamento entre cromossomos do mesmo genoma se deve ao fato de cromossomos de plantas serem constituídos em grande parte de DNA repetitivo, comum a todos os cromossomos de um mesmo genoma, podendo ocorrer pareamento entre eles através dessas regiões.

6 CONCLUSÃO

A utilização das espécies genitoras *P. gibertii* e *P. gardneri* foi bem sucedida em cruzamentos interespecíficos, e a homologia genética dessas espécies foi comprovada pela existência de pareamento entre cromossomos homeólogos, associações cromossômicas multivalentes e formação de quiasmas observados nos híbridos HD15, mesmo que em menor proporção que dos genitores, indicando haver recombinação e geração de variabilidade genética, com chances de alelos de interesse serem incorporados na progênie F₁. As irregularidades meióticas observadas durante todas as fases da meiose I e II podem estar relacionadas com os produtos pós-meióticos anormais e, conseqüentemente, com a formação de grãos de pólen inviáveis. Erros na segregação cromossômica foram os principais responsáveis pela produção de GP T1 (vazio). Os GP T2 (citoplasma contraído) e o T3 (citoplasma pulverizado) observados nos genótipos sugerem ação de fatores genéticos durante a androgametogênese. O alto percentual de grãos de pólen viáveis observados nos genitores possibilita a utilização dessas duas espécies como genitores masculinos em programas de melhoramento. Os híbridos HD15 são considerados citologicamente estáveis por apresentarem índice meiótico acima de 90% e a baixa viabilidade polínica indica a necessidade de testes mais aprofundados para confirmação desses dados. A GISH confirmou o caráter híbrido dos genótipos da progênie HD15 e a existência de recombinação, podendo esses genótipos serem utilizados em programas de melhoramento genético visando à introgressão de genes de interesse e a produção de híbridos ornamentais com características desejadas para o mercado.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, P.P. **Análise em *Passiflora palmeri*, *Passiflora foetida* e híbridos F₁ ornamentais: relação citogenética e caracterização fisiológica**. 2008, 188 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2008.
- ABREU, P.P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 166, p. 307 – 315, 2009.
- ALLARD. R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 1971.
- ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. **Stain Technology**, v. 44, p. 117 - 122, 1969.
- ALONSO, L.C.; KIMBER, G. The analysis of meiosis in hybrids. II. Triploids hybrids. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 23, p. 221-234, 1981.
- ALVIM, P.O. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho**. 2008, 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- ARMSTRONG, S.J.; FRANSZ, P.; MARSHALL, P.F.; JONES G.H. Physical mapping of DNA repetitive sequences to mitotic and meiotic chromosomes of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* by fluorescence in situ hybridization, **Heredity**, v. 81, p. 666 – 673, 1998.
- BARBOSA, L.V.; MONDIN, M.; OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. P.; VIEIRA, M. L. C. Cytological behavior of the somatic hybrids *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *P.cincinnata*. **Plant Breeding**, p. 1- 6, 2007.
- BARBOSA, L. V.; VIEIRA M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, v. 98, p. 121-127, 1997.
- BASS. H.W.; BORDOLI, S.J.; FOSS, E.M. The desynaptic (dy) and desynaptic1 (dysl) mutations in maize (*Zea mays* L.) cause distinct telomere-misplacement phenotypes during meiotic prophase. **Journal of Experimental Botany**, Tallahassee, v. 54, n. 380, p. 39-46, 2003.

BELO, G.O. **Análises morfológicas e genéticas em progênie híbrida F₁ do cruzamento *Passiflora gardneri* Mast x *Passiflora gibertii* N. E. Brown.** 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** (Saint Louis, Mo.), v. 22, 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, v. 3, p. 247 - 274, 2003.

BERNARDO FILHO, R.A. **Caracterização citogenética de espécies de *Paspalum* (Poaceae).** 2011, 49 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

BOATENG, K.A.; YANG, X.; DONG, F.; OWEN, H.A.; MAKAROFF, C.A. SWI1 is required for meiotic chromosome remodeling events. **Molecular Plant**, v. 1, n. 4, p. 620 - 633, 2008.

BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K.P. Maracujá-doce: melhoramento genético e germoplasma. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Org.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 601- 616, 2005.

BRITO, F.F. **Progênies híbridas de maracujazeiros do cruzamento *Passiflora cincinnata* Mast. x *Passiflora quadrangulares* Linn.** 2013. 152 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2013.

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, n.1, p. 45 - 52, 1995.

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

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, p. 317 - 338, 2005.

CAETANO-PEREIRA, C.M; PAGLIARINI, M.S. A new meiotic abnormality in *Zea mays*: multiple spindles associated with abnormal cytokinesis in both divisions. **Genome**, v. 44, p. 865 – 871, 2001.

CANDE. W.Z.; FREELING. M. Inna Golubovskaya: The life of a geneticist studying meiosis. **Genetics**, v. 188, p. 491 - 498, 2011.

CARINI, M. Dentro do apê, cresce um jardim. **Casa Cláudia**, v. 629, n. 1, p. 122 - 126, 2014.

CAVALCANTE, H.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DORNELLES, A.L.C. Meiotic behavior and pollen fertility in an open-pollinated population of ‘Lee’ mandarin [*Citrus clementine* x (*C. paradise* x *C. tangerine*)]. **Scientia Horticulturae**, v. 86, p. 103 - 114, 2000.

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

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

CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; SOUZA, M.M.; BELO, G.O.; SANTOS, S.F.; FREITAS, J.C.O. Hybridization among wild passionflower species. **Rev. Bras. Bot.**, v. 34, p. 237 - 240, 2011.

CONSOLARO, M.E.; PAGLIARINI, M.S.; CHAVES, L.J. Meiotic behavior, pollen fertility and seed production in Brazilian populations of *Centella asiatica* (L.) Urban (Umbelliferae). **Cytologia**, v. 61, p. 375 – 381, 1996.

CORRÊA, M.G.S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J.B.; ÁVILA, P.F.V.; BUSATO, G.R.; LEMES, J.S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta bot. Bras.**, v. 19, n. 2, p. 295 - 303, 2005.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using non-denaturing FISH (ND-FISH). **Chromosoma**, v. 119, p. 495 – 503, 2010.

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, p. 15 - 24, 2002.

DARLINGTON, C.D. **Evolution of genetic systems**. London: Oliver and Boyd, 1958.

DEFANI-SOARIZE, M.A.; PAGLIARINI, M.S.; AGUIAR, C.G. Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). **Nucleus**, v. 39, p. 10 – 18, 1996.

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

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

EDLINGER, B.; SCHLOGELHOFER, P. Have a break: determinants of meiotic DNA double strand break (DSB) formation and processing in plants. **Journal of Experimental Botany**. v. 62, n. 5, p. 1545 - 1563, 2011.

ELLIOTT, F.C. **Plant breeding and cytogenetics**. New York: Mcgraw-Hill Book Company, INC., 1958.

FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v. 11, n. 1, p. 110 – 116, 2009.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, N.F.; PEIXOTO, J.R. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 187 - 209, 2005.

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.; BERGE, 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.

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.

FUZINATTO, V.A.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in apomictic *Brachiaria ruziziensis* x *B. brizantha* (Poaceae) progenies. **Scientia Agric.**, v. 69, n. 6, p. 380 – 385, 2012.

GOLUBOVSKAYA, I.N.; WANG, R.; TIMOFEJEVA, L.; CANDE, Z. Maize meiotic mutants with improper or non-homologous synapsis due to problems in pairing or synaptonemal complex formation. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1533 - 1544, 2011.

GORBSKY, G.J. The spindle checkpoint and chromosome segregation in meiosis. **The FEBS Journal**, v. 282, p. 2471 - 2487, 2014.

GORTNER, G.; NENNO, M.; WEISING, K.; ZINK, D.; NAGL, W.; KAHL, G. Chromosomal localization and distribution of simple sequence repeats and the Arabidopsis-type telomere sequence in the genome of *Cicer arietinum* L. **Chromosome Research**, v. 6, p. 97 – 104, 1998.

GRANATO, L.M. **Comportamento meiótico em híbridos de café arabusta (*C. arabica* cv Bourbon Vermelho X *C. canephora* cv Robusta)**. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em genética, melhoramento vegetal e biotecnologia) – Instituto Agrônomo, Campinas, 2010.

GRELON, M.; VEZON, D.; GENDROT, G.; PELLETIER, G. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 3, p. 589 - 600, 2001.

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, 856 p., 1998.

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.

GROSSI, J.A.; GODOY, S.M.; MACEDO, C.R.; PAULA, G.B.N.; ROMAGNOLO, M.B.; RISSO-PASCOTTO, C. Comportamento meiótico durante a microsporogênese em espécies da família Meliaceae. **Arq. Ciência Vet. Zool.**, v. 14, n. 1, p. 51 – 56, 2011.

GUERRA, D. **Caracterização fenotípica e citogenética da macho-esterilidade em triticale**. 2008. 162 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GUERRA, M. Hybridization *in situ*: Princípios Básicos. In: GUERRA, M. (Ed.). **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 1 - 32, 2004.

GUERRA, M.S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1988.

HAN, Y.; ZHANG, Z.; LIU, C.; LIU, J.; HUANG, S.; JIANG, J.; JIN, W. Centromere repositioning in cucurbit species: Implication of the genomic impact from centromere activation and inactivation. **PNAS**, v. 106, n. 35, p. 14937 – 14941, 2009.

HARRISON, C.J.; ALVEY, E.; HENDERSON, I.R. Meiosis in flowering plants and other green organisms. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 11, p. 2863 - 2875, 2010.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, v. 45, p. 115 - 120, 1970.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K.R. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, p.367 - 375, 1984.

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.

JENKINS, G.; WHITE, J. Elimination of synaptonemal complex irregularities in a *Lolium* hybrid. **Heredity**, v. 64, p. 45 – 53, 1990.

JERIDI, M.; BAKRY, F.; ESCOUTE, J.; FONDI, E.; CARREEL, F.; FERCHICHI, A.; D'HONT, A.; RODIER-GOUD, M. Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic *in situ* hybridization. **Annal of Botany**, v. 108, p. 975 - 981, 2011.

Jl, Y.; CHETELAT, R. T. GISH analysis of meiotic chromosome pairing in *Solanum lycopersicoides* introgression lines of cultivated tomato. **Genome**. v. 50, p. 825-833, 2007.

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

JOHN, B.; LEWIS, K.R. **The meiotic mechanism**. London: Oxford university press, 1973.

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, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

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, p. 81 - 108, 2005.

KARSBURG, I. V.; BATTISTIN, A. Meiose e número cromossômico de cinco espécies da família Urticaceae do Rio Grande do sul. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 4, n. 1, p. 47 - 60, 2006.

KIIHL, P.R.P.; PEREIRA, A.R.A.; GODOY, S.M.; STENZEL, N.M.C.; RISSO-PASCOTTO, C. Chromosome stickiness during meiotic behavior analysis of *Passiflora serrato-diditata* L. (Passifloraceae). **Ciência Rural**, v. 41, p. 1018 - 1023, 2011.

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.

KODURU, P.R.K; RAO, M.K. Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. **Theor. Appl. Genet.**, v. 59, p. 197 – 214, 1981.

LEE, Y.; CHANG, F.C.; CHUNG, M.C. Chromosome pairing affinities in interspecific hybrids reflect phylogenetic distances among lady's slipper orchids (*Paphiopedilum*). **Annals of Botany**, v. 108, p. 113 - 121, 2011.

LEVIN, D.A. **The role of chromosomal change in plant evolution**. Oxford, University Press, p. 23 – 44, 2002.

LIM, K. B.; CHUNG, J. D.; VAN KRONENBURG, B. C.; RAMANNA, M. S.; JONG, J. H.; VAN TUYL, J. M. Introgression of *Lilium rubellum* Baker chromosomes into *L. longiflorum* Thunb.: a genome painting study of the F₁ hybrid, BC₁ and BC₂ progenies. **Chromosome Research**. v. 8, p. 119-125, 2000.

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, p. 643 - 677, 2005.

LIMA, D.M.; GOLOMBIESKI, E.R.; AYUB, R.A. Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 359 - 363, 2000.

LIU, J.; QU, L. Meiotic and mitotic cell cycle mutants involved in gametophyte development in *Arabidopsis*. **Molecular Plant.**, v. 1, n. 4, p. 564 - 574, 2008.

LOPES, E.F. **Avaliação do comportamento meiótico de milho-pipoca (*Zea mays* L.) durante o processo de endogamia**. 2006. 30 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

LORSON, M.A.; HORVITZ, R.H.; HEUVEL, S.V. LIN – 5 is a novel component of the spindle apparatus required for chromosome segregation and cleavage plane specification in *Caenorhabditis elegans*. **The J. Cell Biol.**, v. 48, n. 1, p. 73 – 86, 2000.

LOVE, R.M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, v. 43, p. 72 - 76, 1951.

LUKASZEWSKI, A.J. The development and meiotic behavior of asymmetrical isochromosomes in wheat. **Genetics**, v. 145, p. 1155 – 1160, 1997.

LUO, Q.; TANG, D.; WANG, M.; LUO, W.; ZHANG, L.; QIN, B.; SHEN, Y.; WANG, K.; LI, Y.; CHENG, Z. The role of OsMSH5 in crossover formation during rice meiosis. **Molecular plant**. v. 6, n. 3, p. 729-742, 2013.

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

MARTINEZ-PEREZ, E.; MOORE, G. To check or not to check? The application of meiotic studies to plant breeding. **Plant Biology**, v. 11, p. 222 - 227, 2008.

MARTINS, K.C.; PEREIRA, T.N.S.; SOUZA, S.A.M.; COSTA, F.R. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1746 – 1751, 2010.

MASON, A.S; NELSON, M.N.; CASTELLO, M.C.; YAN, G.; COWLING, W.A. Genotypic effects on the frequency of homoeologous and homologous recombination in *Brassica napus* x *B. carinata* hybrids. **Theor Appl Genet.**, v. 122, p. 543 - 553, 2011.

MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; AZEVEDO FILHO, J.A.; MARTINS, A.L.M. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agrônômicos e citogenéticos em populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 25, n. 2, p. 275 – 278, 2003.

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, p. 345 - 385, 2001.

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.; 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, p. 55 - 78, 2005.

MELO, C.A.F. **Caracterização morfológica, citogenética e confirmação molecular de híbridos interespecíficos retrocruzados de *Passiflora* L.** 2014. 184 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2014.

- MELO, C.A.F.; SILVA, G.S.; SOUZA, M.M. Establishment of the genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 2176 – 2188, 2015.
- MENDES-BONATO, A.B.; VALLE, C.B.; PAGLIARINI, M.S.; PENTEADO, M.I.O. Caracterização citogenética de acessos de *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, EMBRAPA, 2002.
- MIKHAILOVA, E.I.; NARANJO, T.; SHEPHERD, K.; WENNEKES-VAN E, J.; HEYTING, C.; DE JONG, J.H. The effect of the wheat *Ph1* locus on chromatin organisation and meiotic chromosome pairing analysed by genome painting. **Chromosoma**, v. 107, p. 339 – 50, 1998.
- 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.
- MORENO, E.C.; TIAGO, A.V.; ROSSI, F.S.; ROSSI, A.A.B. Biologia floral, morfometria e viabilidade polínica do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Enciclopédia Biosfera**, Centro científico Conhecer, n. 11, n. 21, p. 2094 – 2104, 2015.
- MORGAN, W. G., KING, L. P.; KOCH, S.; HARPER, J. A.; THOMAS, H. M. Introgression of chromosomes of *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* into *Lolium multiflorum* revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 696-701, 2001.
- MURPHY, S.P.; BASS, H.W. Genetics and cytology of meiotic chromosome behavior in plants. In: BASS, H.W.; BIRCHLER, J.A. (Eds.). **Plant Cytogenetics – Genome, Structure and Chromosome Function**. New York: Springer, p. 193 - 229, 2012
- MUYT, A.; PEREIRA, L.; VEZON, D.; CHELYSHEVA, L.; GENDROT G.; CHAMBON A.; LAINÉ-CHOINARD, S.; PELLETIER G.; MERCIER R.; NOGUÉ F.; GRELON M. A high throughput genetic screen identifies new early meiotic recombination funtions in *Arabidopsis thaliana*. **Plos Genetics**, v. 5, p. 1 - 14, 2009.
- NASS, L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 1183 p., 2001.
- NETO, E.M.C. Análise semântica dos nomes comuns atribuídos às espécies de *Passiflora* (Passifloraceae) no Estado da Bahia, Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, p. 86 - 94, 2008.

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

OHRI, D. Genome size variation and plant systematics. **Annals of Botany**, v. 82, p. 75 - 83, 1998.

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

OLIVEIRA, M.S.; PADILHA, M.M.M.; KALUME, M.A.A. Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasilica**, v. 15, n. 1, p. 27 - 33, 2001.

ORTIZ, A.M.; SEIJO, J.G.; FERNANDEZ, A.; LAVIA, G.I. Meiotic behavior and pollen viability *Arachis glabrata* and *A. nitida* species (Section *Rhizomatosae*, Leguminosae): implications concerning their polyploid nature and seed set production. **Plant Syst Evol.**, v. 292, p. 73 - 83, 2011.

OYELANA, O.A.; NWANGBURUKA, C.C. Correlation between meiotic behavior and species reproductive performance and ecological spread: a case study of eight Nigerian *Solanum L.* species. **International Journal of Plant Breeding and Genetics**, v.7, p. 65 - 75, 2013.

PAGLIARINI, M.S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 871 - 910, 2001.

PAGLIARINI, M.S. Meiotic behavior of economically important plant species: The relation ship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 997 - 1002, 2000.

PAGLIARINI, M.S.; POZZOBON, M.T. **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. EMBRAPA CENARGEN – DF, 2004.

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.

PASSIFLORA SOCIETY INTERNATIONAL. Lista dos híbridos registrados de Passifloras. Disponível em: <http://www.passiflorasociety.org>. Acesso em janeiro de 2016.

PAYÁN, F.R.; MARTIN, F.W. Barriers to the hybridization of *Passiflora* species. **Euphytica**, v. 24, p. 709-716, 1975.

PECINKA, A.; FANG, W.; REHMSMEIER, M.; LEVY, A.A.; SCHEID, O.M. Polyploidization increases meiotic recombination frequency in *Arabidopsis*. **Journal of Biology**, p. 9 - 24, 2011.

PEIXOTO, M. Plantas Brasileiras. Disponível em: <http://www.brazilplants.com/> Acesso em: 04 jan. 2016

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, p. 457 - 463, 2005.

PELOQUIN, S. J.; BOITEUX, L.S.; CARPUTO, D. Meiotic mutants in potato: valuable variants. **Genetics**. v. 153, p. 1493 - 1499, 1999.

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. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 277 - 292, 2005.

PRIMIG, M.; WILLIAMS, R.M.; WINZELER, E.A.; TEVZADZE, G.G.; CONWAY, A.R.; HWANG, S.Y.; DAVIES, R.W.; ESPOSITO, R.E. The core meiotic transcriptome in budding yeasts. **Nature Genetics**, v. 26, p. 415 – 423, 2000.

POZZOBON, M.T.; SOUZA, K.R.R.; CARVALHO, S.I.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 212 – 216, 2011.

RICCI, G.C.L.; SILVA, N.; PAGLIARINI, M.S.; SCAPIM, C.A. Microsporogenesis in inbred line of popcorn (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 1013 – 1018, 2007.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.C.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, v. 145, p. 155 – 159, 2005.

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

SAMPAIO, S.R.; SOARES, T.L.; OLIVEIRA, E.D.; JESUS, O.N. **Hibridação interespecífica e viabilidade polínica em Passiflora com potencial ornamental**. 7ª Jornada Científica, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013.

SANCHES-MORAN, E.; SANTOS, J.L.; JONES, G.H.; FRANKLIN, C.H. ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis. **Genes e Development**, p. 2220 - 2233, 2007.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 110 – 119, 2004.

SANTOS, E.A.; SOUZA, M.M.; ABREU, P.P.; CONCEIÇÃO, L.D.C.S.; ARAÚJO, I.S.; VIANA, P.A.; ALMEIDA, A-A.F.; FREITAS, J.C.O. Confirmation and Characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, v. 184, p. 389 – 399, 2012

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1083 - 1090, 2002.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p. 169 - 175, 2001.

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

SCHWARZACHER, T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent *in situ* hybridization data in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 11 – 23, 2003b.

SCHWARZACHER, T. Three stages of meiotic homologous chromosome pairing in wheat: cognition, alignment and synapsis. **Sexual Plant Reproduction**, v. 10, p. 324 - 331, 1997.

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.

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

SEGER, K.R.; SOUZA, M.M.; BELO, G.O.; ABREU, P.P. **Cariomorfologia de genitores *P. gardneri* Mast. e *P. gibertii* e híbrido ornamental**. In: XVII Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais, Aracajú, 2009. CD-ROM.

SENDA, T.; HIRAOKA, Y.; TOMINAGA, T. Cytological affinities and interfertilities between *Lolium temulentum* and *L. persicum* (Poaceae) accessions. **Hereditas**, v. 142, p. 45 - 50, 2005.

SHAMINA, N.V. A catalogue of abnormalities in the division spindles of higher plants. **Cell Biology International**, v. 29, p. 384 – 391, 2005.

SHAMINA, N.V.; DOROGOVA, N.; TRUNOVA, S.; Radial spindle and the phenotype of maize meiotic mutante, *dv.* **Cell Biology International**, v. 24, p. 729 – 736, 2000.

SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER, J.A. Meiotic chromosome behavior and *Boronia* (Rutaceae) genome reorganization. **Australian Journal of Botany**, v. 51, p. 599-607, 2003.

SILVA, E.N.S.; NETO, M.F.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G. Meiotic behavior of wild Caricaceae species potentially suitable for papaya improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 52 - 59, 2012

SILVA, G.S. **Citogenética clássica e molecular na progênie híbrida F1 do cruzamento *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* N.E. BROW**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2014.

SILVA, G.S.; SOUZA, M.M. Genomic *in situ* hybridization in plants. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 2953 - 2965, 2013.

SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.

SIQUEIRA, W.J.; FONSECA, M.I.S.; SONDHAL, M.R. Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calor com dois anos de cultura in vitro. **Bragantia**, v. 47, n. 1, p. 1 - 8, 1988.

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, p. 213 - 240, 2005.

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.; RECCO-PIMENTEL, S. Meiotic behavior and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. **Caryologia**, v.56, p. 129 - 138, 2003.

SOARES, T.L.; JESUS, O.N.; SOUZA, E.H.; SANTOS-SEREJO, J.A.; OLIVEIRA, E.J. Morphology and viability of pollen grains from passion fruit species (*Passiflora* spp.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 779-787, 2013.

SOUSA, A.G.R.; SOUZA, M.M.; MELO, C.A.F.; SODRÉ, G.A. ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding, **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18534 – 18545, 2015

SOUZA, M.M. Ações de pesquisa para utilização de passifloras silvestres como plantas ornamentais. In: 2º WORKSHOP DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS NO ESTADO DA BAHIA, **Magistra**, v. 18, p. 38 - 40, 2006.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T. N. S. Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. **Revista Brasil. Bot.** v. 34, p. 63 – 72, 2011.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MATINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciênc. Agrotec.**, v. 26, n. 6, p. 1209 – 1217, 2002.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; DIAS, A.J.B.; RIBEIRO, B.F.; VIANA, A.P. Structural, histochemical and cytochemical characteristics of the stigma and style in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 1, p. 93 - 98, 2006.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; RODRIGUES, R.; DUTRA, G.A.; SUDRÉ, C.P. Irregularidade meiótica em pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 748 - 749, 2000.

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, 2003b.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; SUDRÉ, C.P.; RODRIGUES, R. Meiotic irregularities in *Capsicum* L. species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 138 – 144, 2012.

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* Saco (Passifloraceae). **Caryologia**, v. 56, p. 161 - 169, 2003a.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; VIANA, A.P.; SILVA, L.C. Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae). **Beiträge zur Biologie der Pflanzen**, v. 73, p. 359 – 376, 2004.

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

SOUZA, M.M.; VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S. A putative mutante of a self-compatible yellow passion fruit with the corona color as phenotypic marker. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 9 – 16, 2010a.

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, 2010b.

SOUZA, V.O. **Caracterização morfológica, reprodutiva, fisiológica e anatômica em *Passiflora subrotunda* Mast submetida a diferentes níveis de sombreamento**. 114 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, 2014.

SUMNER, A.T. **Chromosomes: Organization and function**. Oxford: Blackwell publishing, 2003.

SUZUKI, T.; IDE, N.; TANAKA I. Immunocytochemical visualization of the centromeres during male and female meiosis in *Lilium longiflorum*. **Chromosoma**, v. 106, p. 434 – 445, 1997.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer – Verlag, 469 p., 1992.

SYBENGA, J. What makes homologous chromosomes find each other in meiosis? A review and a hypothesis. **Chromosoma**, v. 108, p. 209 – 219, 1999.

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. **Biotemas**, v. 20, n. 4, p. 7 - 18, 2007.

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetic and Molecular Biology**, v. 29, p. 353 - 362, 2006a.

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEDROZO, C.A.; PEREIRA, A.V. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). **Acta. Sci. Biol. Sci.**, v. 28, n. 1, p. 7 – 12, 2006b.

TORRES, G.A.; GONG, Z.; IOVENE, M.; HIRSCH, C.D.; BUELL, C.R.; BRYAN, G.J.; NOVÁK, P.; MACAS, J.; JIANG, J. Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. **Bathesda**, v. 1, p. 85 – 92, 2011.

TWELL, D. Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. **Protoplasma**, v. 187, p. 144 - 154, 1995.

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

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, J.F.M.; AMARAL, A.T. Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among passiflora species using RAPD. **Rev. Bras. Fruticult.**, v. 25, p. 489 – 493, 2003.

VIEIRA, M.L.C.; BARBOSA, L.V.; MAYEDA, L.Y. Citogenética dos maracujazeiros (*Passiflora* L.). In: LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. (Ed). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa, p. 47 - 65, 2004.

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

YAMAMOTO, A.; KITAMURA, K.; HIHARA, D.; HIROSE, Y.; KATSUTAMA, S.; HIRAOKA, Y. Spindle checkpoint activation at meiosis I advances anaphase II onset via meiosis-specific APC/C regulation. **The Journal Of Cell Biology**, v. 182, n. 2, p. 277 - 288, 2008.

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.

YOUNIS, A.; RAMZAN, F.; HWANG, Y.J.; LIM, K, B. FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. **Plant Cell Rep.**, v. 34, p. 1477 - 1488, 2015.

ZAMARIOLA, L.; TIANG, C.L.; STORME, N.; PAWLOWSKI, W.; GEELEN, D. Chromosome segregation in plant meiosis. **Plant Science**, v. 5, p. 1 - 19, 2014.

ZANATTO, M.; BRAMMER, S.P.; NASCIMENTO JUNIOR, A.; SCAGLIUSI, S.M. Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de Triticale. **Ciênc. Agrotec.**, v. 33, p. 2078 – 2082, 2009.

ZHONG, X.B.; BODEAU, J.; FRANSZ, P.F.; WILLIAMSON, V.M.; VAN KAMMEN, A.; DE JONG, J.H.; ZABEL, P. FISH to meiotic pachytene chromosomes of tomato locates the root-knot nematode resistance gene Mi-1 and the acid phosphatase gene Aps-1 near the junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively. **Theor. Appl. Genet.**, v. 98, p. 365 – 370, 1999.

ZHOU, S.; RAMANNA, M.S.; VISSER, R.G.F.; TUYL, J.M. Analysis of the meiosis in the F1 hybrids of Longiflorum x Asiatic (LA) of lilies (*Lilium*) using genomic *in situ* hybridization. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 35, p. 687 – 695, 2008.

ZWIERZYKOWSKI, Z.; ZWIERZYKOWSKA, E.; TACIAK, M.; JONES, N.; KOSMALA, A.; KRAJEWSKI, P. Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* x *Lolium perenne* revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). **Chromosome Research**, v. 16, p. 575 – 585, 2008.