

MILENE MIRANDA PRAÇA

**CARACTERIZAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE MARACUJÁ
(*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) COM GIEMSA,
LARANJA DE ACRIDINA E FISH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P895c
2005

Praça, Milene Miranda, 1979-
Caracterização dos cromossomos de maracujá
(*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) com giemsa,
laranja de acridina e fish. / Milene Miranda Praça. –
Viçosa: UFV, 2005.
xi, 47f : il. ; 29cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referência bibliográfica: f. 38-47

1. Maracujá – Citogenética. 2. Maracujá – Cromos-
mos – Morfologia. 3. Maracujá – Cromossomos – Ban-
deamento. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 634.42523

MILENE MIRANDA PRAÇA

**CARACTERIZAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE MARACUJÁ
(*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) COM GIEMSA,
LARANJA DE ACRIDINA E FISH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 15 de julho de 2005.

Prof. Luiz Sérgio Saraiva
(Conselheiro)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Dr^a. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Lyderson Facio Viccini

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

**A Deus,
Aos meus pais, José Fernandes e Maria Libânia**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao professor Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação, ensinamentos, dedicação, amizade, apoio e, principalmente, pela confiança e paciência.

Aos meus conselheiros, prof. Luiz Sérgio Saraiva, prof. Wagner Campos Otoni e prof. Cláudio Horst Bruckner, pela amizade, colaboração e pelas sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Lyderson Facio Viccini, pela amizade, conselhos e pela contribuição à minha formação acadêmica.

A todos os professores que contribuíram para o meu crescimento profissional.

À Conceição e Rita, pelo apoio em assuntos burocráticos.

À Maria Andréia e Francismar, pela amizade, auxílio e importante contribuição com a técnica de FISH, realizada neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, Isane, Carol, Wellington, Fernanda, Ionara, Danival e Lívia, pelo auxílio técnico, pela amizade e agradável convivência no ambiente de trabalho.

Ao “Zé Chico” e “Americano”, pelo auxílio profissional e amizade.

À Tatiana, “Léo” e Evandro, pela sincera amizade e pelos momentos de descontração.

A todos os amigos do curso de Genética e Melhoramento, que contribuíram para minimizar os momentos difíceis desta caminhada.

Aos amigos do “lado B”, incluindo a turma do “blaco- blaco” e a turma do “J”, pelos conselhos, pelos momentos de descontração e por torcerem tanto pelo meu crescimento profissional e humano.

À galera do “GOU” de Juiz de Fora e à geração “F1” e “F2” do Laboratório de Genética da UFJF, pela amizade e pelas orações.

Ao Reginaldo e sua família, pelo incentivo.

Ao meu grande amigo Fabrício, pelos bons momentos de convívio desde a graduação em Juiz de Fora, pelo incentivo, pela disponibilidade, pelos conselhos, por compartilhar os bons momentos e pela força nos momentos difíceis.

A todos os meus familiares, principalmente Vovó Judite e Tia Daglória, pelo carinho e pelas orações.

Ao meu namorado Vinícius, pelo amor, incentivo e apoio nos momentos decisivos do meu trabalho e à sua família pelo carinho.

Àqueles que constituem a base desta conquista. Meus pais, José Fernandes e Maria, pelo amor incondicional, incentivo, dedicação e pelas lições de vida. Meus irmãos, Fernando Henrique e Taline, pelo carinho, apoio, confiança e amizade.

A Deus, pelo dom da vida e por permitir e iluminar todos os passos desta conquista.

BIOGRAFIA

MILENE MIRANDA PRAÇA, filha de José Fernandes Praça e Maria Libânia Miranda Praça, nasceu no dia 14 de Dezembro de 1979, em Viçosa-Minas Gerais.

Em 1999, ingressou-se na Universidade Federal de Juiz de Fora, graduando-se bióloga em Junho de 2003.

Durante o Curso de Graduação, foi bolsista de Treinamento Profissional no programa de extensão “Escola da Natureza” do laboratório de Ecologia e bolsista PIBIC/CNPq do Departamento de Biologia, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética Vegetal.

Em Agosto de 2003, iniciou o Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em Julho de 2005.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Características gerais do gênero <i>Passiflora</i>	3
2.2. Importância econômica do maracujá.....	4
2.3. Importância da citogenética.....	6
2.3.1. Aspectos citogenéticos do gênero <i>Passiflora</i>	6
2.3.2. Bandeamento cromossômico.....	8
2.3.2.1. Bandeamento Ag-NOR.....	9
2.3.2.2. Coloração com laranja de acridina (L.A.).....	10
2.3.2.3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material.....	14
3.2. Métodos.....	14
3.2.1. Germinação das sementes e pré-tratamento e fixação das raízes.....	14
3.2.2. Preparo das lâminas.....	15
3.2.3. Coloração convencional com Giemsa.....	15
3.2.4. Coloração com laranja de acridina	15
3.2.5. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	16
3.2.5.1. Marcação da sonda.....	16
3.2.5.2. Desnaturação da sonda.....	16
3.2.5.3. Tratamento das preparações cromossômicas com RNase... ..	16
3.2.5.4. Desnaturação do DNA cromossômico.....	17

3.2.5.5. Hibridização.....	17
3.2.5.6. Lavagem das lâminas.....	17
3.2.5.7. Montagem das lâminas.....	18
3.2.6. Análise dos dados.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Germinação, pré-tratamentos e coloração com Giemsa	19
4.2. Coloração com laranja de acridina.....	24
4.3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	26
5. DISCUSSÃO.....	30
5.1. Germinação, pré-tratamentos e coloração com Giemsa.....	30
5.2. Coloração com laranja de acridina.....	33
5.3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	34
6. CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

PRAÇA, Milene Miranda, M.S. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2005.
Caracterização dos cromossomos de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) com Giemsa, laranja de acridina e FISH. Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Conselheiros: Luiz Sérgio Saraiva, Wagner Campos Otoni e Cláudio Horst Bruckner

Passiflora edulis f. *flavicarpa* é considerada a espécie mais importante do gênero *Passiflora*, principalmente pelo seu interesse botânico, comercial e em programas de melhoramento. Análises citogenéticas desta espécie revelaram número cromossômico de $2n=18$, porém, a caracterização de seus cromossomos tem sido apresentada na literatura com dados conflitantes quanto à posição do centrômero, ao número e localização de constrições secundárias e de regiões organizadoras de nucléolo (RONs). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi adaptar metodologias que ampliassem a resolução das análises cromossômicas em *P. edulis* f. *flavicarpa*. Mais especificamente, aplicar técnicas citogenéticas convencionais e moleculares para determinar os aspectos morfológicos dos cromossomos e identificar as RONS. Os meristemas radiculares foram pré-tratados com o bloqueador mitótico Amiprofos metil (APM), 3 μ M, durante um período de 16 horas à 4 °C e fixados. As preparações citogenéticas foram realizadas pela técnica de dissociação celular e secagem ao ar e submetidas à coloração convencional com Giemsa, à coloração com o fluorocromo laranja de acridina e à metodologia de FISH (Fluorescent *in Situ* Hybridization). As figuras cromossômicas foram observadas com objetiva de imersão e capturadas diretamente por uma videocâmera acoplada ao microscópio e a um computador. O bloqueador mitótico utilizado, juntamente com a técnica aplicada, proporcionou acúmulo de células prometáfásicas e metafásicas adequadas para análise. Visualizaram-se nove pares de cromossomos bem espalhados nas lâminas, sem sobreposição e com constrições primárias e

secundárias definidas, facilitando assim a montagem dos cariogramas. As análises do cariótipo revelaram comprimento médio dos cromossomos metafásicos de 3,75 μm (par 1) a 2,20 μm (par 9) e razões de braços indicando que os cromossomos de 2 a 7 são metacêntricos e o 1, 8 e 9 são submetacêntricos. Observou-se a presença de constrição secundária na porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7, sendo que, na literatura, o número dessas constrições variou de um a três em preparações obtidas pela técnica de esmagamento. Com o fluorocromo laranja de acridina, foram observadas regiões emitindo fluorescência verde-amarelada no braço curto do cromossomo 7 e no braço longo do cromossomo 8, evidenciando dois cromossomos que apresentaram constrição secundária. A técnica de FISH, com a utilização de sonda de rDNA 18S, revelou quatro marcações fluorescentes em núcleos interfásicos e marcações fluorescentes nos mesmos pares cromossômicos marcados com laranja de acridina, em metáfase. As marcações obtidas com o fluorocromo correspondem em número e localização dos sítios de rDNA 18S, indicando que somente duas das quatro constrições secundárias encontradas com a coloração de Giemsa estão relacionadas com RON. Assim, considerando que diferenças intraespecíficas e de ecotipos não estejam envolvidas nas diferenças morfológicas pesquisadas, as metodologias aplicadas corroboraram a ampliação da resolução do cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Evidenciou-se, portanto, diferenças na posição do centrômero, número e localização das constrições secundárias e das RONS, quando comparadas aos resultados encontrados na literatura.

ABSTRACT

PRAÇA, Milene Miranda, M.S. Universidade Federal de Viçosa, July, 2005.
Characterization of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) chromosomes using Giemsa, acridine orange and FISH. Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Committee members: Luiz Sérgio Saraiva, Wagner Campos Otoni and Cláudio Horst Bruckner

Passiflora edulis f. *flavicarpa* is considered the most important species from the genus *Passiflora*, mainly because of its botanical and commercial interests, as well as for breeding programs. Cytogenetical analyses of this species have revealed a chromosomic number of $2n=18$, however, its chromosome characterization in the literature has been conflicting concerning the centromere position, the number and localization of secondary constrictions and of nucleolus organizer regions (NORs). In this context, the goal of the present work was to adapt methodologies that would amplify the resolution of the chromosomic analyses in *P. edulis* f. *flavicarpa*. More specifically, to apply conventional and molecular cytogenetical techniques in order to determine the morphological aspects of the chromosomes and identify the NORs. Root meristems were pre-treated with the mitotic blocker Amiprophos-methyl (APM), 3 μ M, for 16 h at 4 °C and then fixated. The cytogenetic preparations were done using the cell dissociation and air-drying technique, followed by the conventional staining with Giemsa, staining with the fluorochrome Acridine Orange and the FISH (Fluorescent *in Situ* Hybridization) methodology. The chromosomic figures were observed with objective of immersion lenses and captured directly by a videocamera connected to the microscope and to a computer. The employed mitotic blocker, associated to the applied technique, provided the accumulation of prometaphase and metaphase cells adequate to analysis. It was possible to visualize nine pairs of chromosomes well-dispersed on the slides, without overlapping and showing well defined primary and secondary constrictions, so enabling the easier assembly of the

karyograms. Analyses of the karyotype revealed a mean metaphasic chromosome length ranging from 3.75 μm (pair 1) to 2.20 μm (pair 9) and arm ratios indicating that the chromosomes from 2 to 7 are metacentric, while 1, 8 and 9 are submetacentric. The presence of secondary constrictions was observed on the subterminal portion of the long arm of chromosomes 1 and 8, and on the subterminal portion of the short arm of chromosomes 2 and 7, while in the literature, the number of these constrictions varied from one to three in preparations obtained with the squash technique. With the fluorochrome Acridine Orange, regions were observed emitting green-yellowish fluorescence on the short arm of chromosome 7 and on the long arm of chromosome 8, this way evidencing two chromosomes which presented secondary constriction. The FISH technique, with use of 18S rDNA probe, revealed four fluorescent marks in interphasic nuclei and fluorescent marks on the same chromosome pairs marked in metaphase with Acridine Orange. The marks obtained with the fluorochrome correspond in number and position of the 18S rDNA sites, thus indicating that only two of the four secondary constrictions identified with the Giemsa coloration are related to NOR. Hence, considering that intraspecific and ecotype differences are not involved in the researched morphological differences, the applied methodologies reasserted the resolution amplification of the *P. edulis* f. *flavicarpa* karyotype. Therefore, differences on the centromere position, number and localization of the secondary constrictions and of the NORs were verified, when compared to results found on the literature.

1- INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é o maior da família Passifloraceae, sendo formado por aproximadamente 530 espécies tropicais e subtropicais (VANDERPLANK, 1996; CERVI, 1997; LUCAS, 2002). Originou-se na América tropical e apresenta mais de 150 espécies nativas do Brasil (LIMA et al., 1999). Dentre as principais espécies do gênero, destaca-se o maracujá-amarelo, *P. edulis* f. *flavicarpa*, em virtude de seu interesse botânico, comercial e em programas de melhoramento. Análises citogenéticas desta espécie revelaram número cromossômico de $2n=18$ (STOREY, 1950; SOARES-SCOTT, 1998); entretanto, a caracterização de seus cromossomos ainda não está bem estabelecida. Os relatos disponíveis na literatura são conflitantes quanto à posição do centrômero, ao número e localização de constrições secundárias e de regiões organizadoras de nucléolo (RONS) (OLIVEIRA, 1996; MAYEDA, 1997; SOARES-SCOTT, 1998; CUCO et al., 2003; MELO e GUERRA, 2003).

Segundo Lopes (1991) e Oliveira (1996), o cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa* é simétrico quanto à posição do centrômero. Entretanto, Soares-Scott (1998) apresentou razões de braços com medidas indicando que os cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 8 e 9 são metacêntricos, enquanto o 4 e o 7 são submetacêntricos.

O número e a localização das constrições secundárias presentes no cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa* também têm apresentado discordância, quando relatados por diferentes autores. Oliveira (1996) encontrou apenas uma constrição secundária no braço longo do cromossomo 8. Mayeda (1997) e Cuco et al. (2003) relataram a presença de constrição secundária no braço longo dos cromossomos 8 e 9, enquanto Soares-Scott (1998) também encontrou duas constrições, porém, no braço longo dos cromossomos 4 e 7. Segundo Soares-Scott et al. (1999), citados por Souza (2002), o cariótipo do maracujá-amarelo apresenta, pelo menos, três

constricções secundárias, porém a autora não especificou a localização de tais constricções.

Em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, as RONS têm sido evidenciadas por diferentes metodologias, porém com diferentes resultados. Com o método de bandeamento Ag-NOR, Mayeda (1997) evidenciou RONS nas constricções secundárias dos cromossomos 8 e 9. Aplicando a técnica de FISH, Melo e Guerra (2003) observaram sítios de rDNA 45S no braço longo dos cromossomos 7 e 9, e rDNA 5S localizado no braço longo do cromossomo 5.

Em virtude desses diferentes relatos, encontrados na caracterização do cariótipo de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, o presente estudo foi conduzido a fim de adaptar metodologias para obtenção de cromossomos de alta qualidade citogenética para análise do cariótipo desta espécie.

Os objetivos específicos foram:

- Tratar os meristemas radiculares com diferentes substâncias antimitóticas, em diferentes concentrações, tempo e temperatura, para obtenção de cromossomos morfológicamente adequados para estudos citogenéticos;
- Aplicar técnicas de dissociação celular e secagem ao ar, que possam ampliar a resolução de estudos concernentes aos aspectos morfológicos do cariótipo;
- Reavaliar o cariótipo, quanto ao número e localização de constricções secundárias;
- Aplicar a coloração com laranja de acridina e a técnica de FISH, para identificação de eventuais RONS.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Características gerais do gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) é formado por 24 subgêneros e aproximadamente 530 espécies, sendo as plantas que produzem o maracujá aquelas de maior importância econômica (CERVI, 1997; SOUSA e MELETTI, 1997).

A planta do maracujazeiro apresenta-se como trepadeira herbácea ou lenhosa de grande porte, podendo atingir uma altura superior a 10 metros. O caule na base é lenhoso e bastante lignificado, sendo que o teor de lignina diminui à medida que se aproxima do ápice da planta. Pode apresentar-se, também, como ervas e arbustos de hastes cilíndricas ou quadrangulares, angulosas, suberificadas, glabras ou pilosas, dependendo da espécie botânica. A partir do caule, surgem as gavinhas, folhas, gemas vegetativas e reprodutivas além das brácteas (TEIXEIRA, 1994; SILVA e SÃO JOSÉ, 1994).

As folhas são simples, alternadas, comumente ovadas, elípticas, lobadas ou digitadas. Em sua base, as folhas apresentam brácteas foliáceas bem desenvolvidas e gavinhas, que sustentam a planta (SILVA e SÃO JOSÉ, 1994; RUGGIERO et al., 1996). As flores do maracujazeiro são hermafroditas e os estames aparecem em número de cinco, presos a um androginóforo colunar bem desenvolvido. As anteras são grandes e apresentam grande número de grãos de pólen amarelos e pesados, dificultando a polinização pelo vento. A parte feminina é representada por um ovário súpero, globoso, ovóide ou cilíndrico, monolocular e multiovalado, estiletos em número de três com estigmas livres. As flores abrem-se uma única vez por volta das 12h, permanecendo assim até o início da noite, devendo ser polinizadas neste período para que haja formação de frutos (MANICA, 1981; RUGGIERO et al., 1996).

Na maioria das espécies de *Passiflora*, a polinização é cruzada e realizada por agentes polinizadores. A polinização é realizada principalmente por insetos, como as mamangavas do gênero *Xylocopa*, nas espécies *Passiflora. alata*, *P. amethystina*, *P. miersii* (KOSCHNITZKE, 1993) e *P. edulis* (COLBERT e WILLMER, 1980), por abelhas do gênero *Ptigliosa*, em *P. foetida* (JANZEN, 1968), por vespas em *P. suberosa* e mariposas em *P. capsularis* (KOSCHNITZKE, 1993). Pode ser realizada, também, por beija-flores em *P. vitifolia* (JANZEN, 1968) e *P. coccinea* (BENSON et al., 1975), assim como por borboletas do gênero *Heliconius*, em *P. kermesina* e *P. coccinea* (JANZEN, 1968). Na ausência de insetos polinizadores, há necessidade de polinização artificial, cujo benefício à frutificação é inquestionável (SOUZA e MELETTI, 1997).

Os frutos do maracujazeiro são do tipo baga, com tamanho e forma variados, geralmente ovais ou subglobulosos com 4-12 cm de comprimento e 4-7 cm de diâmetro. Uma polpa mucilaginosa envolve as sementes, que são ovais e compridas, numerosas, com testa endurecida de aspecto reticulado e arilo sacciforme ou membranoso (MARTIN e NAKAZONE, 1970; SILVA e SÃO JOSÉ, 1994).

2.2- Importância econômica do maracujá

No Brasil, o cultivo do maracujazeiro em escala comercial teve início na década de 1970, com a espécie *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., também conhecida como maracujá-amarelo ou maracujá-azedo (ANDRADE, 2003). Além de seu valor ornamental, esta espécie apresenta valor medicinal, pois as folhas e o fruto contêm passiflorina e maracujina, que são sedativos naturais. O chá preparado com as folhas tem efeito diurético. Seu uso principal, no entanto, está na alimentação humana, em forma de sucos, doces, geléias, sorvetes e licores, sendo rico em vitamina C, cálcio e fósforo (LIMA et al., 1999).

Brasil, Colômbia, Peru e Equador, são os países considerados como principais produtores de maracujá. O mercado internacional de suco concentrado e polpa de maracujá é dominado pelo Equador, Colômbia e Peru, que surgem como grandes exportadores. Os principais países importadores de suco e polpa de maracujá são Alemanha e Holanda. Quanto ao mercado de fruto *in natura*, os países africanos são os maiores produtores dos frutos de cor roxa, enquanto os países sul-americanos são os maiores produtores dos frutos de cor amarela. Os principais países importadores são o Reino Unido, França e Bélgica. O Brasil destaca-se como

o principal produtor e consumidor mundial de maracujá (LUCAS, 2002; ANDRADE, 2003).

A espécie mais cultivada no Brasil é *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, por ser mais vigorosa, mais adaptada aos dias quentes e apresentar frutos de maior tamanho. Em seguida está o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims), cultivado em locais de maior altitude e clima mais frio, e o maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand), utilizado como fruta fresca (LIMA et al., 1999).

Segundo Andrade (2003), o agronegócio do maracujá no Brasil gera, anualmente, R\$ 500 milhões e emprega 250.000 pessoas, gerando de cinco a seis empregos diretos e indiretos por hectare. A cultura é bem aceita pelos pequenos produtores rurais, por ser uma atividade que gera renda em áreas relativamente pequenas, em comparação com outras culturas, além de possibilitar um rápido retorno dos investimentos. A cultura está presente em, praticamente, todas as regiões do país, sendo o Pará, a Bahia, São Paulo, Sergipe, Minas Gerais e Goiás os principais estados produtores (AGRIANUAL, 2004).

Na década de 70, a comercialização do produto baseava-se apenas no mercado *in natura*. Nos anos 80, as indústrias extratoras de suco estimularam a expansão da cultura e o mercado do produto industrializado. De 1990 a 2000, a produtividade do maracujá-azedo no Brasil apresentou queda, passando de 12,5 t/ha para 9,9 t/ha, o que corresponde a uma redução de 21%. A explicação para essa redução na produtividade está relacionada a problemas fitossanitários, como a virose do endurecimento do fruto (*Passion fruit Woodiness Virus*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), ferrugem (*Cladosporium* spp.), morte precoce, fusariose ou murcha (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*), podridão-do-pé (*Fusarium solani*) e outros (ANDRADE, 2003).

A hibridação interespecífica por meio de cruzamentos controlados tem sido uma alternativa na busca de resistência a doenças, principalmente considerando a susceptibilidade a doenças da espécie comercial mais cultivada *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (SOARES-SCOTT, 1998).

Uma técnica também utilizada para obtenção de híbridos interespecíficos é a hibridação somática. O isolamento de protoplasto, o desenvolvimento de cultura e fusão de protoplastos, com regeneração de plantas, foram otimizados em algumas espécies de *Passiflora* (SOARES-SCOTT, 1998). Otoni et al. (1995) obtiveram alopoliplóides via hibridação somática entre *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. incarnata*.

Estas técnicas permitem que sejam ultrapassadas as barreiras genéticas existentes nos maracujazeiros entre espécies sexualmente incompatíveis, aumentando a variabilidade genética, além da possibilidade de manutenção e multiplicação de alguns genótipos desejados.(SOARES-SCOTT, 1998).

2.3- Importância da citogenética

A citogenética fornece informações acerca da organização genômica, sendo indispensável na contagem e observação da morfologia de cromossomos mitóticos e meióticos, bem como no estabelecimento de padrões cariotípicos (SYBENGA, 1992; CZEPULKOWSKI, 2001). O estudo morfológico dos cromossomos permite comparações entre categorias taxonômicas detectando possíveis variações existentes, principalmente no comprimento absoluto, na posição do centrômero, na presença de satélites e constrições secundárias (MAYEDA, 1997). A determinação do número cromossômico de espécies vegetais, a geração de dados cariomorfológicos e os padrões de bandeamentos têm fornecido subsídios importantes para o entendimento dos eventos envolvidos na evolução e na sistemática (ARORA e MADHUSOODANAN, 1981; BERTÃO, 1993). Assim, estudos citogenéticos têm contribuído, significativamente, para os conhecimentos na área de genética, evolução e melhoramento de plantas e animais (SINGH, 1993; BORÉM et al., 2002).

A citogenética compreende o estudo dos cromossomos isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação quanto à sua variação e evolução (GUERRA, 1988). O progresso nesta área foi acompanhado, pelos avanços nos equipamentos de microscopia, como também pela evolução nos procedimentos de pré-tratamento, fixação, coloração, bandeamento e hibridização *in situ*, que possibilitaram detalhar a morfologia e estrutura dos cromossomos (MacGREGOR, 1993; GUERRA, 2004).

2.3.1- Aspectos citogenéticos do gênero *Passiflora*

De acordo com Melo e Guerra (2001), as espécies de *Passiflora* podem ser divididas em quatro grupos considerando o número básico de cromossomos: $x=6$, $x=9$, $x=10$ e $x=12$. Segundo este autor, muitas são diplóides, com $2n=12$, $2n=18$ ou

$2n=20$, embora alguns tetraplóides ($2n=24$), hexaplóides ($2n=36$) e octaplóides ($2n=72$) sejam encontrados.

O número básico de cromossomos é representado pelo menor número haplóide de uma série poliplóide, conforme Sinoto e Sato (1940), citados por Rieger et al. (1991). Porém, diferentes números básicos têm sido propostos para o gênero *Passiflora* sem um claro entendimento da variação e relação filogenética entre as espécies (SNOW e MacDOUGAL, 1993). Melo e Guerra (2001), revisando a citotaxonomia do grupo, considerou $x=6$ o número básico principal e $x=9$, $x=10$ e $x=12$ números básicos secundários. O menor número haplóide, $x=6$, sugere a ocorrência de poliploidia durante a evolução do gênero (MELO e GUERRA, 2003). Uma possível triploidia foi sugerida para a origem das espécies com $2n=18$, que representam as espécies horticulturalmente importantes, inclusive *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (STOREY, 1950; LOPES, 1994, citados por SOARES-SCOTT, 1998). Entretanto, Melo e Guerra (2001), sugeriram que o número $x=9$ seria derivado de $x=6$ por poliploidia (de $x=6$ a $x=12$) seguida de disploidia reducional ($x=12$ a $x=9$), considerando, dessa forma, as espécies com $2n=18$ diplóides.

Em *Passiflora*, a análise de cariótipos tem possibilitado a observação de diferenças na morfologia dos cromossomos entre subgêneros e seções, baseada em número e posições de satélites, constrições secundárias, número e comprimento de cromossomos e posição do centrômero (MAYEDA, 1997). Os estudos cariotípicos têm revelado que as espécies possuem cromossomos, basicamente, metacêntricos e submetacêntricos, com simetria variável (BEAL, 1972; VIEIRA et al., 1997). Mayeda (1997) considerou o subgênero *Plectostemma* como o mais derivado do gênero *Passiflora* por apresentar o cariótipo mais assimétrico. Estudos envolvendo bandeamento Ag-NOR, realizados por essa autora, revelaram que, em algumas espécies, há mais de um par de cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos, como observado em *P. coccínea*. Neste caso, os números de constrições secundárias, satélites e nucléolos não apresentam correspondência por meio de coloração convencional.

Melo e Guerra (2001) realizaram bandeamento CMA-DAPI em oito espécies de *Passiflora*, e observaram de um a três pares de blocos CMA positivos, mas não encontraram heterocromatina DAPI positiva. Esses autores investigaram ainda, a variabilidade dos sítios de rDNA 5S e 45S em 19 espécies de *Passiflora*, e observaram que as espécies diplóides com $x=6$ geralmente apresentam apenas um

par de sítios de rDNA 45S e 5S, enquanto aquelas com $x=9$ e $x=10$ frequentemente apresentam mais de um par de sítios de rDNA 45S e apenas um par de rDNA 5S.

Em *P. edulis* f. *flavicarpa* ($2n=18$), análises do cariótipo revelaram valores médios de comprimento dos cromossomos metafásicos variando de 3,33 μm (par 1) a 1,67 μm (par 9), totalizando um comprimento para o complemento haplóide de 21,59 μm (SOARES-SCOTT, 1998). Segundo essa autora, as razões de braços indicaram que os cromossomos de número 1, 2, 3, 5, 6, 8 e 9 são metacêntricos, enquanto que os de número 4 e 7 são submetacêntricos.

Variações no número e localização de constrições secundárias presentes no cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa* vêm sendo também encontradas por diferentes autores. Oliveira (1996) encontrou uma constrição secundária no cromossomo 8 da espécie; Mayeda (1997) e Cuco et al. (2003) relataram a presença de constrições secundárias nos cromossomos 8 e 9, enquanto Soares-Scott (1998) identificou estas constrições nos braços longo dos pares cromossômicos 4 e 7. Melo e Guerra (2003) observaram sítios de rDNA 45S nos cromossomos 7 e 9, e rDNA 5S localizado no braço longo do par cromossômico de número 5. Segundo Mayeda (1997), tais diferenças podem ocorrer em virtude da qualidade de preparação das amostras, o que impossibilita a revelação clara da morfologia dos cromossomos.

2.3.2- Bandeamento cromossômico

O bandeamento cromossômico é uma ferramenta utilizada na diferenciação longitudinal e identificação dos pares de homólogos e segmentos cromossômicos (RICHER e DROUIN, 1990; SHARMA e SHARMA, 1999). Esta metodologia vem sendo aplicada, principalmente, pelo fato de as técnicas convencionais de coloração não permitirem a diferenciação dos cromossomos com morfologia semelhante (JAUHAR, 1996).

Desde a primeira demonstração de bandeamento diferencial em cromossomos de plantas, muitas variações têm surgido (MURRAY, 1994). Estas incluem tratamentos com ácidos, álcalis e uma variedade de tampões e temperaturas, que contribuirão para a identificação de uma região específica do cromossomo (SUMNER, 2003).

Os bandeamentos formam padrões distintos, que permitem a identificação de pares individuais de cromossomos, sendo aplicados a estudos evolutivos, à citogenética clínica e ao mapeamento genético. Certos tipos de bandeamento

dependem de reagentes de alta especificidade, tais como enzimas e seqüências de ácidos nucléicos, a fim de marcar especificamente proteínas e seqüências de DNA (SUMNER, 1990; BICKMORE e CRAIG, 1997).

Em plantas, o bandeamento cromossômico é particularmente importante na análise de cariótipos de híbridos interespecíficos, em que é possível reconhecer, na célula híbrida, os cromossomos de cada espécie parental. Torna-se importante também, por contribuir para uma melhor compreensão sobre as alterações cromossômicas que se estabelecem no cariótipo das espécies estudadas (JAUHAR, 1996; GUERRA, 1988).

2.3.2.1- Bandeamento Ag-NOR

O bandeamento com nitrato de prata (bandeamento Ag-NOR) detecta nucléolos em núcleos interfásicos e regiões organizadoras nucleolares (RONs) em cromossomos metafásicos (HIZUME et al., 1980, citados por BRASILEIRO-VIDAL et al., 2003). Sendo um método clássico, é adotado comumente para identificação dessas regiões (KAVALCO e PAZZA, 2004).

As RONs estão em regiões cromossômicas de sequências de DNA repetidas, que codificam para rRNA 18S-5.8S-26S (18S-26S) (BESENDORFER et al., 2002). Esses rRNAs são processados a partir de um transcrito primário, produzido pela RNA polimerase I, e 100 a 1000 cópias estão presentes em longas repetições em *tandem*, sendo as plantas portadoras dos maiores números de cópias, em comparação a outros eucariotos (PEDROSA et al., 1997, citados por SUMNER, 2003).

Citologicamente, estas regiões estão localizadas em constrições secundárias nos cromossomos metafásicos e na fase de telófase-intérfase são responsáveis pela formação do nucléolo (SATO et al., 1980; LANGER e KOUL, 1983). As RONs são geralmente, flanqueadas por heterocromatina constitutiva de vários tamanhos e podem ser detectadas e caracterizadas por técnicas de bandeamento diferencial (von KALM e SMYTH, 1984; BESENDORFER et al., 2002).

A outra estrutura evidenciada pela prata é o nucléolo, que consiste de três componentes principais - centro fibrilar, componente fibrilar denso e um componente granular – e, em adição, encontra-se um esqueleto com proteínas específicas ao redor do córtex (SUMNER, 2003).

A técnica de bandeamento Ag-NOR consiste na impregnação do nitrato de prata às proteínas nucleolares (GOESSENS, 1984, citado por KAVALCO e PAZZA., 2004). Na região organizadora do nucléolo, a prata reage com proteínas ácidas que se ligam ao rRNA recém-sintetizado de tal modo que, apenas, as RONS ativas são especificamente detectadas por esta coloração (HOWELL, 1977; SCHMID et al., 1977; SATO et al., 1980; SCHWARZARCHER et al.; 1980). Segundo Sumner (2003), seis proteínas impregnadas pela prata são retidas nos cromossomos, as quais incluem uma ou mais subunidades da RNA polimerase I e fatores de transcrição.

As RONS são os locos genéticos mais estudados na citogenética, em função de suas peculiaridades e estrutura. São observadas em, pelo menos, um dos cromossomos do conjunto haplóide das espécies e podem apresentar grande variação em números, tamanhos e localização (GUERRA, 1988).

A identificação e localização das regiões organizadoras nucleolares é uma importante ferramenta em estudos evolutivos, pois auxilia a diferenciação de cariótipos intraespecíficos e interespecíficos (GALETTI Jr., 1998), bem como os estudos de rearranjos cromossômicos, além de análises de funcionamento e organização dos genes rDNA (DOVER, 1982, citado por HABERER et al., 1996). Segundo esses autores, as RONS constituem um sistema útil em pesquisas com fins evolutivos em plantas superiores, porque as regiões codificadoras presentes no rDNA repetitivo são altamente conservadas entre as espécies, e as regiões espaçadoras também são conhecidas por permanecerem homogêneas ao longo da evolução.

Embora o método de coloração com nitrato de prata tenha sido amplamente utilizado, a introdução da técnica de FISH (hibridização *in situ* fluorescente) com o advento da era molecular, passou a ser considerada como o método mais específico para identificação de RONS (SUMNER, 2003).

2.3.2.2- Coloração com laranja de acridina (L.A.)

Laranja de acridina é um fluorocromo catiônico, que se liga ao DNA por intercalação entre os pares de bases adjacentes e por interação eletrostática com os grupos fosfatos deste ácido nucléico (SAKODA et al., 1971, citados por SATO, 1988). Em condições controladas, esse fluorocromo é capaz de diferenciar fitas simples e duplas presentes. Isto ocorre pelas diferentes cores emitidas, pois, quando

se liga à fita simples, emite fluorescência vermelho-alaranjada e, quando se liga à fita dupla, emite fluorescência verde-amarelada (SATO, 1988).

A coloração com laranja de acridina é bem estabelecida na citogenética humana e tem evidenciado um padrão de bandeamento reverso (RFA) aos bandeamentos Q e G (VERMA e LUBS, 1975, 1976). O bandeamento RFA produz variações na intensidade de coloração ao longo dos cromossomos (Hsu, 1974, citado por SUMNER, 1990), destacando-se pela marcação evidente das regiões teloméricas (CLARK e WALL, 1996).

Segundo Almeida e Carvalho (2004), a técnica de RFA aplicada em cromossomos de pimentão e milho evidenciou um padrão de bandeamento diferente daqueles já bem consolidados na citogenética humana. Nessas plantas, as bandas foram localizadas na região de constrição secundária, o que demonstra não tratar-se de bandas reversas. Neste caso, a nomenclatura RFA foi substituída por Hsc-FA (bandeamento fluorescente da heterocromatina associada à constrição secundária com o uso de laranja de acridina). Nessa pesquisa, foi interpretado que o padrão de bandeamento Hsc-FA, obtido em duas constrições secundárias em pimentão, está associado à RON, considerando-se que essa região apresentou, analogamente, a banda Hsc-FA positiva na constrição secundária no braço curto do cromossomo 6 de milho, utilizado como padrão. A presença dessas bandas nos cromossomos 5 e 11 de *Capsicum*, indicou que o bandeamento com laranja de acridina não diferenciou a RON ativa da inativa, pois, segundo esses autores, apenas o cromossomo de número 11 apresenta RON ativa. Portanto, este bandeamento possui características diferentes do bandeamento realizado com nitrato de prata, que evidencia apenas RON ativa (SATO et al., 1980).

A resposta diferenciada de fluorescência do laranja de acridina foi utilizada também em outras espécies vegetais, conforme relatado por Sato (1988). Esse autor associou a coloração desse fluorocromo ao pré-tratamento com bandeamento-C em cromossomos de *Vicia faba*, *Allium fistulosum*, *Chrysanthemum coronarium*, *Lycoris aurea* e *Nothoscordum fragrans*. Os resultados encontrados evidenciaram a heterocromatina associada às constrições secundárias presentes nos cromossomos dessas plantas. Segundo o autor, essas regiões foram facilmente distinguidas dos outros segmentos cromossômicos, pois, apresentaram coloração verde-amarelada, em contraste com a coloração laranja a laranja amarelada dos segmentos eucromáticos de algumas espécies e vermelho-alaranjado de outras.

O fluorocromo laranja de acridina também tem sido utilizado para outras finalidades como, por exemplo, na identificação de reticulócitos e eritrócitos de ratos infectados com parasita *Plasmodium yoelii* (XU e CHAUDHURI, 2005). Nesse trabalho, a maturidade das células infectadas foi avaliada pela diferenciação de cores emitidas pelo DNA e RNA, nos diferentes estágios de anemia causada pelo parasita.

2.3.2.3- Hibridização *in situ* fluorescente

Segundo Guerra (2004), a técnica de hibridização *in situ* consiste no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma seqüência de nucleotídeos complementar situada dentro da célula. O objetivo é verificar se a célula possui esta seqüência e qual sua exata localização. Para visualizar o segmento de DNA ou RNA de interesse, é necessário que ele esteja identificado com uma sonda para detectar a seqüência complementar de nucleotídeo. A técnica baseia-se no fato que o DNA é formado por duas fitas complementares, as quais podem ser separadas em fitas simples, ou desnaturadas e, posteriormente, renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Durante a renaturação do DNA cromossômico, caso haja sonda disponível no meio em torno do cromossomo, as cópias da sonda competirão com as fitas do DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas *in situ*, isto é, no sítio exato onde aquela seqüência ocorre naturalmente.

Esta técnica foi utilizada pela primeira vez por Gall e Pardue (1969), para análises cromossômicas e por Buongiorno-Nardelli e Amaldi (1969) em cortes histológicos. A alta especificidade e o aprimoramento das técnicas utilizadas nos anos posteriores permitiram modificar a técnica inicial em algo mais informativo, sendo aplicada na área da biologia do desenvolvimento, citotaxonomia, citogenética clínica e melhoramento genético (GUERRA, 2004).

A técnica de FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) tem ampliado, consideravelmente, o nível de análise e o campo de atuação da citogenética vegetal (PEDROSA-HARAND e GUERRA, 2004). Segundo esses autores, a maioria das espécies vegetais tem cromossomos de tamanho e morfologia muito semelhantes, o que dificulta a identificação de cada cromossomo com coloração convencional.

A localização de seqüências específicas de DNA por FISH tem sido utilizada como parâmetro, em diferentes estudos em espécies vegetais. A utilização de sondas de rDNA, por exemplo, tem sido útil em estudos evolutivos e taxonômicos

(MELO e GUERRA, 2003), em programas de melhoramento (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2003), além da identificação do nível de ploidia (D' HONT et al., 1998). Sondas construídas com três tipos de rDNA têm sido comumente utilizadas, com esses objetivos, em diferentes espécies. Com sondas 18S, Montijn et al. (1998) identificaram essa região nos cromossomos de *Petunia hybrida*, em estudos de diferentes fases do ciclo celular. Com sondas de rDNA 45S e 5S, Brasileiro-Vidal et al. (2003) identificaram essas regiões em cromossomos de *Thinopyrum ponticum*. Esses dados, juntamente com o padrão de hibridização de seqüências complementares a sondas pAs1 e pSc1, auxiliaram a identificação de grupos cromossômicos inteiros ou segmentos cromossômicos, em linhagens melhoradas de trigo comum X *Th.ponticum*. Sondas de rDNA 45S foram utilizadas, também, por Marcon et al. (2005), juntamente com fluorocromos base específicos, como a cromomicina A3, a distamicina e DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol), em estudos visando ao acompanhamento de mudanças evolutivas no cariótipo de espécies do gênero *Selaginella*.

Melo e Guerra (2001), realizaram estudos de ploidia em espécies silvestres e cultivadas de *Passiflora*, nas quais predominam os números cromossômicos básicos $x=6$ e $x=9$, ambos aparentemente diplóides com uma variação devida à disploidia. Nesse trabalho, foi sugerido que o número $x=9$ seria derivado de $x=6$ por poliploidia (de $x=6$ a $x=12$) seguida de disploidia reducional (de $x=12$ a $x=9$) e não diretamente por disploidia ascendente de $x=6$ a $x=9$. A análise dos sítios de rDNA 5S e 45S em 19 espécies mostrou que, em média, o número de sítios ribossomais é mais alto no grupo com $x=9$, reforçando a hipótese da origem deste grupo por poliploidia.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

As sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* foram adquiridas, comercialmente, da empresa ISLA PAK. As análises citogenéticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, localizado no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A marcação da sonda por meio da técnica de FISH foi realizada no Laboratório de Seqüenciamento e Análise de Fragmentos de DNA, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO)- UFV.

3.2- Métodos

3.2.1- Germinação das sementes e pré-tratamento e fixação das raízes

Sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* foram colocadas para germinar em placas de Petri com filtro de papel úmido e em vermiculita, à temperatura ambiente e à temperatura controlada de 20 a 30 °C em estufa, durante uma semana. As raízes com aproximadamente 1 cm de comprimento foram submetidas a testes com pré-tratamentos, utilizando-se bloqueadores do fuso mitótico como Orizalina (Dow AgroSciences[®]), Trifluralina (Nortox[®]) e Amiprofos metil (APM) (Bayer[®]), nas concentrações de 2 µM, 2,5 µM e 3 µM, durante períodos de 15, 16 e 17 horas em geladeira (4 °C) e 2, 3 e 4 horas a 28 °C. Em seguida, as raízes foram lavadas, durante 20 minutos, em água destilada e fixadas em metanol/ácido acético na proporção 3:1. O fixador foi trocado quatro vezes em intervalos de 10 minutos e, após a quarta troca, o material foi armazenado a -20 °C, até o momento de uso.

3.2.2- Preparo das lâminas

As raízes do maracujá foram lavadas em água destilada e, em seguida, digeridas com Flaxzyme[®] (NOVO) (10 µL da enzima em 300 µL de água destilada) a 34 °C, durante 1 hora e 30 minutos. As raízes foram, então, lavadas durante 20 minutos em água destilada, fixadas em metanol/ácido acético (3:1) e armazenadas a -20 °C. As lâminas foram preparadas, aplicando-se a técnica de dissociação celular do meristema apical com subsequente secagem ao ar e em placa aquecedora (50 °C) por 20 minutos (CARVALHO e SARAIVA, 1993, 1997).

3.2.3- Coloração convencional com Giemsa

Após o preparo, algumas lâminas foram imediatamente coradas em solução de Giemsa (Merck[®]) a 5%, em tampão fosfato (pH 6,8) durante 4 minutos, lavadas duas vezes em água destilada e secadas ao ar, para posterior análise da morfologia dos cromossomos.

3.2.4- Coloração com laranja de acridina

As preparações citogenéticas foram pré-tratadas, conforme o bandeamento RFA (bandeamento-R por fluorescência com laranja de acridina) descrito por Verma et al. (1977), para cromossomos humanos, e por Almeida e Carvalho (2004) para cromossomos de pimentão e milho. As lâminas foram envelhecidas durante um período de 15 a 30 dias em estufa a 35 °C. Cubetas contendo tampão fosfato, pH=6,5 (constituído por 68% de KH₂PO₄ e 32% de Na₂HPO₄.2H₂O) foram colocadas em banho-maria para que a temperatura da solução elevasse até 85 °C. Após fixada a temperatura do tampão, as lâminas foram colocadas em cubetas, onde permaneceram durante 15 a 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram retiradas e, rapidamente, foram gotejadas com solução de laranja de acridina (Sigma[®]) gelada durante 15 a 20 minutos, em câmara úmida.

Após o período de coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada durante 1 minuto, água destilada durante 2 minutos e tampão fosfato durante 3 minutos. A montagem foi feita, gotejando-se três gotas de tampão fosfato sobre as lâminas, cobrindo com lamínulas e selando com esmalte incolor.

3.2.5- Hibridização *in situ* fluorescente

O procedimento de hibridização *in situ* foi realizado, conforme com Osuji et al. (1998), com modificações.

3.2.5.1- Marcação da sonda

Sondas de rDNA 18S com 1100 pb obtidas de milho (*Zea mays*) e clonadas em vetor pGEM[®]-T Vector (Promega[®]) foram utilizadas. A sonda foi marcada com Flúor-12-dUTP por meio do método de *random primers* e com auxílio do kit Prime It[™] (Stratagene[®]), conforme recomendações do fabricante. Aproximadamente 50 ng do plamídio e 10 µL de *random primers*, em um volume final de 39 µL, foram desnaturados a 100 °C durante cinco minutos e, imediatamente, resfriados a 0 °C. Em seguida, foram adicionados 10 µL do tampão de reação (8 µL flúor-12-dUTP e 92 µL tampão de nucleotídeo – 100 µM de dATP, dGTP e dCTP e 20 µM de dTTP - 5X) e 2 µL da enzima Klenow (5 unidades/µL), sendo a reação conduzida a 37 °C, durante 30 minutos. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 2 µL “Stop Mix” e a solução foi incubada a -20 °C por 12 horas.

3.2.5.2- Desnaturação da sonda

A sonda marcada foi centrifugada em tampão de hibridização do Kit Chromosomal *in situ* hybridization, da Stratagene[®], conforme recomendações do fabricante, em uma concentração de 1ng/µL, durante 15 minutos a 14.000 rpm em centrífuga refrigerada a 5 °C e, então, ressuspensa com o tampão. Em seguida, a solução com a sonda foi incubada durante 40 minutos, em banho-maria a 42 °C, com agitação, seguida de desnaturação a 75 °C durante cinco minutos e resfriamento em gelo durante 10 minutos. Passado esse tempo, a solução com a sonda foi novamente incubada a 42 °C, durante 30 minutos.

3.2.5.3- Tratamento das preparações cromossômicas com RNase

Sobre cada lâmina, foram colocados 150 µL da solução total de RNase (100 µL de solução de RNase - 2 mg/mL de RNase A e 4000U/mL de RNase de *Aspergillus oryzae* – e 2,0 mL de SSC 2X – 0,2 mL de SSC 20X + 1,8 mL de água

deionizada) sendo, então, coberta com lamínula. Em seguida, as lâminas foram incubadas a 37 °C durante aproximadamente 1 hora. Após esse tempo, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em SSC 2X, para retirada da lamínula e seguiu-se uma série alcoólica de 70%, 80% e 100%, durante 2 minutos cada. As lâminas foram secadas à temperatura ambiente.

3.2.5.4- Desnaturação do DNA cromossômico

Sobre cada lâmina, foram gotejados 90 µL de solução de desnaturação (35 mL de formamida 100%, 5 mL de SSC 20X e 10 mL de água deionizada) aquecida a 70 °C. Essas lâminas foram cobertas com lamínulas e desnaturadas em banho-maria a 60 °C, durante quatro minutos. Passado esse tempo, as lâminas foram mergulhadas em etanol 70%, a -20 °C, durante cinco minutos. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram submetidas a uma série alcoólica, com soluções a 70%, 80% e 100%, inseridas no gelo, durante dois minutos cada e, posteriormente, secadas ao ar.

3.2.5.5- Hibridização

Adicionaram-se 15 µL da sonda marcada e desnaturada sobre cada uma das lâminas, que foram cobertas com lamínulas e seladas com cola de borracha do kit Chromosomal *in situ* hybridization, da Stratagene®. Após a secagem da cola, as lâminas foram incubadas em câmara úmida à temperatura de 37 °C, durante 18 horas.

3.2.5.6- Lavagem das lâminas

No dia seguinte, o selante foi retirado e as lâminas foram mergulhadas em solução de formamida 50% (50 mL de formamida 100%, 10 mL de SSC 20X e 40 mL de água) a 45 °C, durante cinco minutos. Esse procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução de SSC (0,5 mL de SSC 20X e 95,5 mL de água), em banho-maria a 60 °C, por três vezes e em SSC4X /0,05% Tween 20 (Reagen®) por cinco minutos, com agitação.

3.2.5.7- Montagem das lâminas

As lâminas foram desidratadas em série alcoólica (70%, 90% e 100%) à temperatura ambiente, com agitação e montadas com 25 µL de solução de iodeto de propídeo (Sigma®) e vectashield (Vector®) sob lamínula.

3.2.6- Análise dos dados

A avaliação dos bloqueadores, cujo teste é apresentado no item 3.2.1, foi feita segundo parâmetros visuais, como a quantidade e qualidade morfológica dos cromossomos nas lâminas. Aproximadamente 150 lâminas foram analisadas, sendo selecionadas aquelas que apresentaram as melhores figuras cromossômicas. Essas figuras foram, então, capturadas com objetiva de 100X, em fotomicroscópio Olympus™ BX60, equipado com sistema de epifluorescência (filtros WB para análises de fluorescência com laranja de acridina e WG para análises de FISH) acoplado à uma vídeo-câmera e com o Kit de análise de imagem Cool SNAP™. As imagens foram processadas em um computador Macintosh™ (G4) e as análises da morfologia dos cromossomos foram realizadas, utilizando-se o Programa Image SXM de domínio público (BARRETT, 2002), o qual pode ser obtido via internet (<http://reg.ssci.liv.ac.uk>). Para montagem dos kariogramas, foram analisadas 10 prometáfases e 10 metáfases. As medidas de cada cromossomo foram realizadas em pixels e convertidas em escala de micrômetros (CARVALHO e SARAIVA, 1993; CARVALHO, 1995; CAIXETA, 1998). A razão entre os braços longo/curto foi determinada, segundo o critério de classificação morfológica dos cromossomos, descrito por Levan et al. (1964) e revisado por Guerra (1986).

4- RESULTADOS

4.1- Germinação, pré-tratamentos e coloração com Giemsa

As sementes do maracujá adquiridas comercialmente, germinaram tanto em vermiculita quanto em placa de Petri contendo papel-filtro umedecido. Após seis dias à temperatura de 29 °C, controlada em estufa, até 95% germinaram. Notou-se maior eficiência quando uma fina lâmina de água foi adicionada.

Os testes realizados com os pré-tratamentos aplicados nas raízes, considerando-se o agente bloqueador, a concentração, a temperatura e o tempo, citados no item 3.2.1, foram avaliados visualmente de acordo com a quantidade de células em divisão nas lâminas e morfologia cromossômica adequada para estudos citogenéticos. Verificou-se que o Amiprofos-metil (APM), na concentração de 3 µM, apresentou melhor desempenho em relação aos outros bloqueadores utilizados. Aproximadamente 40 células em prometáfase e metáfase, com morfologia definida, foram observadas em cada lâmina avaliada. O tempo mais adequado foi de 16 horas e 25 minutos, a 4 °C. O herbicida Orizalina também foi eficiente para obtenção de morfologia dos cromossomos quando aplicado na concentração de 3 µM, durante um período de 15 horas, a 3 °C, porém a quantidade encontrada de células em divisão foi inferior à encontrada com o APM. A Trifluralina não proporcionou resultados satisfatórios, em nenhuma das concentrações e tempos testados, observando-se pouca quantidade de metáfase nas lâminas com morfologia inadequada para análises.

As preparações citogenéticas realizadas em meristemas pré-tratados com APM, com a aplicação da técnica de maceração enzimática, dissociação celular e secagem ao ar, juntamente com a metodologia de coloração convencional com Giemsa, proporcionaram a obtenção de cromossomos prometafásicos e metafásicos

morfologicamente preservados. Visualizaram-se figuras completas com 18 cromossomos individualizados, sem sobreposição, no mesmo plano de foco da lâmina e com constrições primárias e secundárias definidas (Fig. 1), facilitando a montagem dos kariogramas e a classificação dos pares cromossômicos.

A montagem dos kariogramas em ordem decrescente de tamanho (Fig. 2) possibilitou a classificação dos cromossomos quanto à posição do centrômero, sendo observados seis pares metacêntricos (2 a 7) e três pares submetacêntricos (1, 8 e 9). Observou-se a presença de constrição secundária na porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7, apresentando-se consistente nos dez kariogramas analisados.

A identificação dos cromossomos foi realizada, utilizando-se medidas de comprimento total e razão de braços (Tabelas 1 e 2). Nas Tabelas 1 e 2, foi possível verificar, também, que o comprimento médio dos cromossomos prometafásicos foi de 6,10 μm (par 1) a 3,85 μm (par 9) e dos cromossomos metafásicos de 3,75 μm (par 1) a 2,20 μm (par 9).

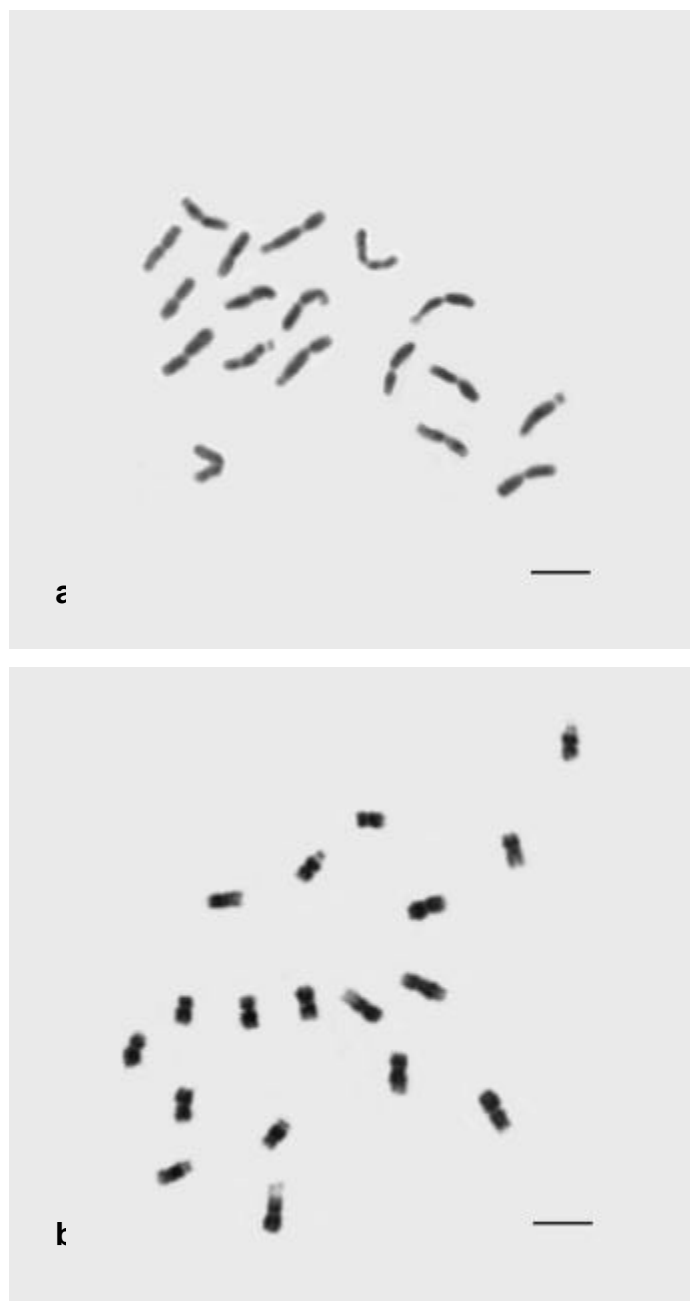


Figura 1 - Cromossomos prometafásicos (a) e metafásicos (b) obtidos de células meristemáticas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, pré- tratadas com APM 3 µM, durante 16 horas e 25 minutos a 4 °C e corados com Giemsa 5%. Barra = 5 µm.

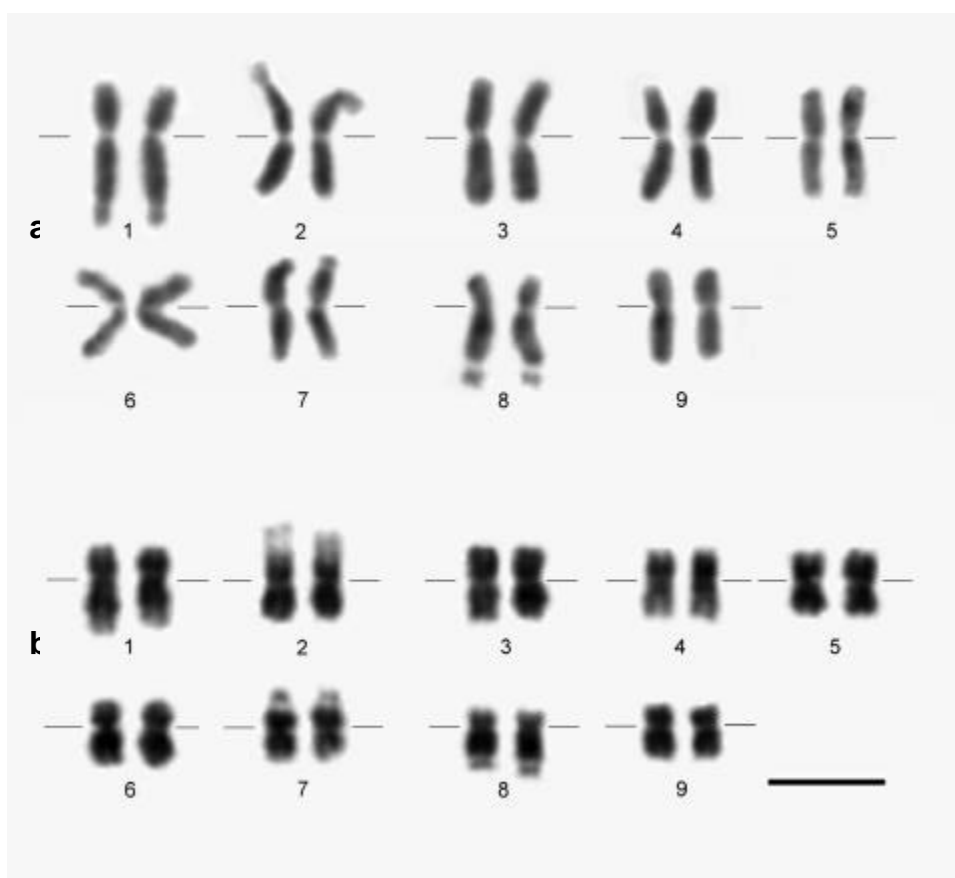


Figura 2 - Cariogramas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* ($2n=18$ cromossomos) montados a partir de cromossomos prometáfasicos (a) e metafásicos (b) tratados com APM $3 \mu\text{M}$, durante 16 horas e 25 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e corados com Giemsa 5%. Observar as constrições primárias definidas e as constrições secundárias presentes na porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7 nos dois kariogramas. Barra = $5 \mu\text{m}$.

Tabela 1 – Morfometria dos cromossomos prometafásicos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Cromossomo	Total (μm)	Braço (μm)		r	Classe	Comprimento relativo(%)	
		Curto	Longo				
1	6,10	2,15	3,95	1,84	SM	13,56	
2	5,80	2,70	3,10	1,15	M	12,89	
3	5,30	2,60	2,70	1,04	M	11,78	
4	4,95	2,20	2,75	1,25	M	11,00	
5	4,85	2,20	2,65	1,20	M	10,78	
6	4,75	2,30	2,45	1,07	M	10,56	
7	4,70	2,20	2,50	1,14	M	10,44	
8	4,70	1,35	3,35	2,48	SM	10,44	
9	3,85	1,50	2,35	1,57	SM	8,56	
						45,00	100,00

r – razão entre braços longo e curto

M - Metacêntrico

SM – Submetacêntrico

Tabela 2 – Morfometria dos cromossomos metafásicos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Cromossomo	Total (μm)	Braço (μm)		r	Classe	Comprimento relativo(%)	
		Curto	Longo				
1	3,75	1,45	2,30	1,59	SM	14,07	
2	3,60	1,80	1,80	1,00	M	13,51	
3	3,15	1,50	1,65	1,10	M	11,82	
4	3,10	1,50	1,60	1,07	M	11,63	
5	2,85	1,35	1,50	1,11	M	10,69	
6	2,75	1,20	1,55	1,29	M	10,32	
7	2,75	1,35	1,40	1,04	M	10,32	
8	2,50	0,70	1,80	2,57	SM	9,38	
9	2,20	0,80	1,40	1,75	SM	8,26	
						26,65	100,00

r – razão entre braços longo e curto

M - metacêntrico

SM – Submetacêntrico

4.2- Coloração com laranja de acridina

A coloração com laranja de acridina, em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, revelou quatro regiões de fluorescência verde-amarelada em cromossomos metafásicos pré-tratados com APM, 3 μ M, durante 16 horas e 25 minutos, a 4 °C (Fig. 3a). A preservação morfológica dos cromossomos, mesmo após serem submetidos a tratamentos em tampão fosfato a 85 °C, possibilitou a montagem dos kariogramas e identificação dos pares marcados por este fluorocromo. As regiões fluorescentes foram localizadas na porção terminal do braço curto do cromossomo 7 e na porção terminal do braço longo do cromossomo 8 (Fig. 3b). Essas marcações coincidiram com a localização de duas das quatro constrições secundárias encontradas nos cromossomos, quando submetidos à coloração com Giemsa. As outras regiões cromossômicas apresentaram coloração fluorescente vermelho-alaranjada (Figs. 3a e 3b).

Considerou-se que os melhores resultados foram obtidos com lâminas envelhecidas durante um período de 15 a 20 dias, em estufa a 35 °C, com tempos de incubação em tampão fosfato de 18 minutos e coloração de 15 minutos. O pH da solução tampão foi alterado de 6,5 para 4,7. O material submetido a tampões com pH inferior ou superior a este valor não apresentou nenhuma marcação.

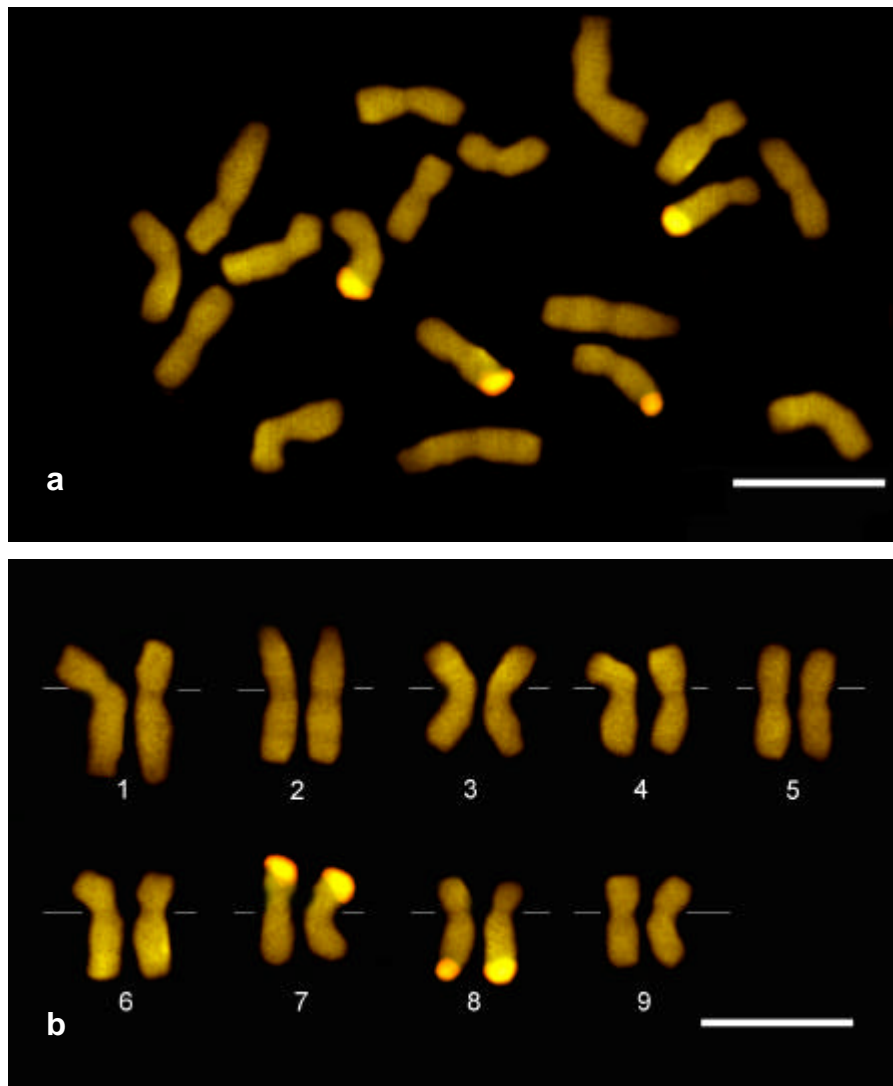


Figura 3 - Cromossomos metáfasicos (a) e cariograma montado a partir dos cromossomos em 3a (b) obtidos de células meristemáticas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, pré- tratadas com APM 3 μ M, durante 16 horas e 25 minutos a 4 $^{\circ}$ C e corados com laranja de acridina a 0,01%. Observar as marcações de fluorescência verde-amarelada na porção terminal do braço curto do cromossomo 7 e na porção terminal do braço longo do cromossomo 8, evidenciando dois pares de cromossomos com constrição secundária. Barra = 5 μ m.

4.3- Hibridização *in situ* fluorescente

Com o uso de sondas de rDNA 18S pela técnica de FISH, foi possível identificar essa seqüência em dois pares cromossômicos de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Visualizaram-se quatro marcações fluorescentes em núcleos interfásicos (Fig. 4a) e quatro marcações fluorescentes em cromossomos metafásicos (Fig. 4b).

Como observado na metodologia de coloração com o fluorocromo laranja de acridina, os cromossomos tratados por meio da técnica de FISH também permaneceram preservados, facilitando a montagem dos cariogramas. A análise do cariótipo revelou marcações fluorescentes nos mesmos pares cromossômicos evidenciados com o laranja de acridina, apresentando-se na porção terminal do braço curto do cromossomo 7 e porção terminal do braço longo do cromossomo 8 (Fig. 5). Assim, das constrições secundárias presentes nos cromossomos 1, 2, 7 e 8, identificadas com a coloração convencional com Giemsa, apenas aquelas localizadas nos cromossomos 7 e 8 foram marcadas com o fluorocromo laranja de acridina e com a sonda de rDNA 18S.

Na Figura 6, os cromossomos 7 e 8 foram selecionados, permitindo observar as constrições secundárias com a coloração convencional com Giemsa e as marcações fluorescentes obtidas com o fluorocromo laranja de acridina e com a aplicação da técnica de FISH.

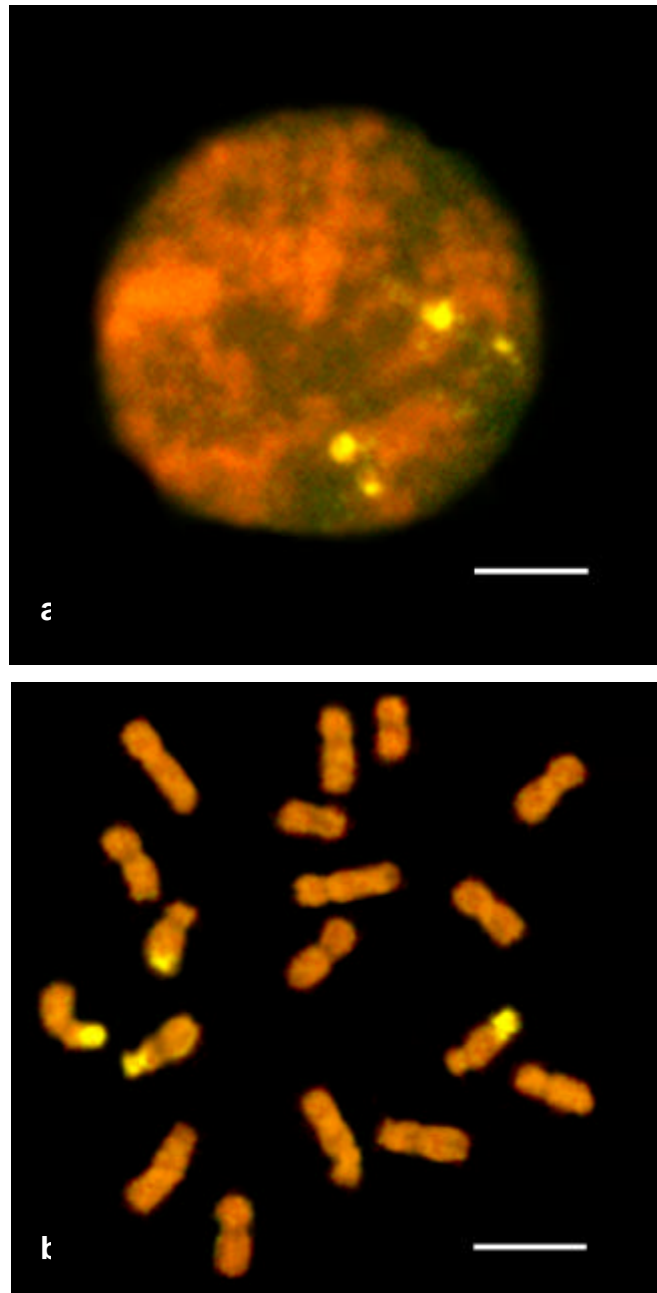


Figura 4 - Núcleo interfásico (a) e cromossomos metafásicos (b) obtidos de células meristemáticas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, pré-tratadas com APM 3 μM , durante 16 horas e 25 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ e submetidos à metodologia de FISH, com o uso de sonda de rDNA 18S. Observar os quatro sítios de marcação fluorescente nas duas figuras. Barra = 5 μm .

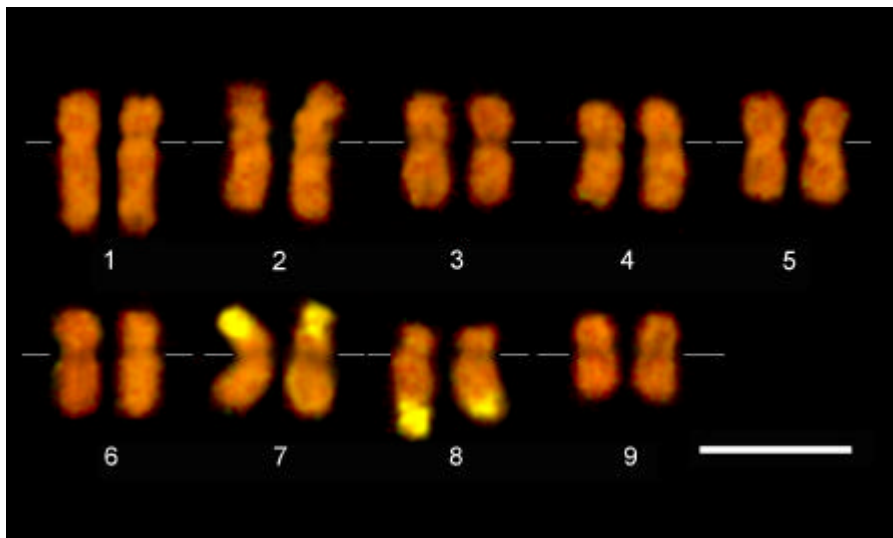


Figura 5 - Cariograma montado a partir dos cromossomos da figura 4b. Observar as marcações fluorescentes na porção terminal do braço curto do cromossomo 7 e na porção terminal do braço longo do cromossomo 8. Barra = 5 μ m.

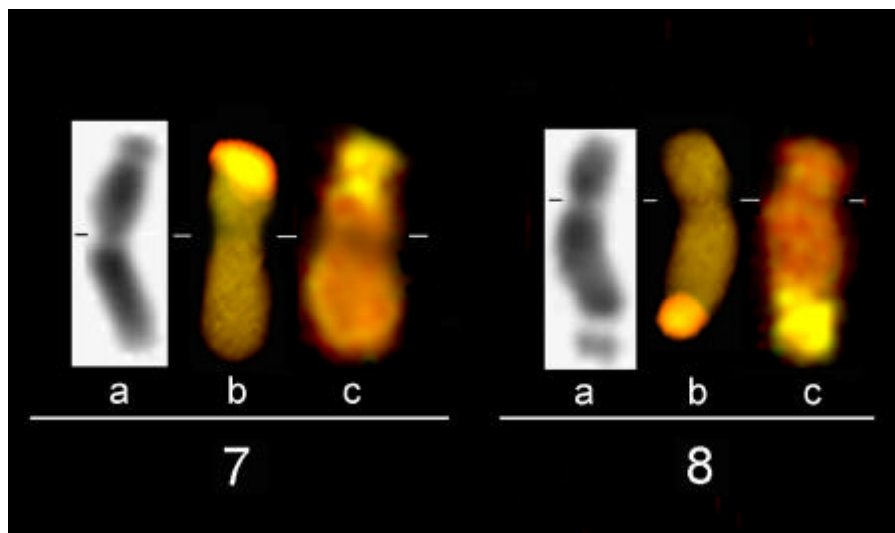


Figura 6 - Cromossomos 7 e 8 de *P. edulis* f. *flavicarpa* corados com Giemsa (a) laranja de acridina (b) e marcados com sondas de rDNA 18S por meio da técnica de FISH (c). Observar a presença de constrição secundária no braço curto do cromossomo 7 e braço longo no cromossomo 8 e as marcações fluorescentes, terminais, nos dois cromossomos.

5- DISCUSSÃO

5.1- Germinação, pré-tratamentos e coloração com Giemsa

No presente estudo, obteve-se grande quantidade de raízes para aplicação das técnicas citogenéticas. As sementes colocadas para germinar em vermiculita, ou em placa de Petri contendo papel-filtro úmido, apresentaram até 95% de germinação à temperatura de 29 °C. Outra metodologia foi descrita por Cuco et al. (2003) para obtenção de raízes de maracujá-amarelo, como o cultivo de estacas de plantas matrizes, sendo considerado pelos autores como um método também eficaz.

As raízes pré-tratadas com o bloqueador mitótico APM apresentaram número maior de células em divisão, em comparação com outros herbicidas utilizados. Em cada lâmina analisada foram obtidas, aproximadamente, 40 células em prometáfase e metáfase, em contraste com números inferiores a 10, obtidos com trifluralina ou orizalina. Segundo Lucretti e Dolezel (1995), Hansen e Andersen (1996), Dolezel et al. (1999) e Planchais et al. (2000), o APM possui alta afinidade de ligação pelas tubulinas vegetais e apresenta elevada atividade de despolimerização dos microtúbulos, impedindo assim, que as células atinjam a anáfase. Outros bloqueadores têm sido utilizados em *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo relatados por diferentes autores. Mayeda (1997) e Soares-Scott (1998) submeteram os meristemas radiculares a tratamentos com colchicina, enquanto Cuco et al. (2003) aplicaram 8-Hidroxiquinoleína em conjunto com o inibidor de síntese protéica ciclohexamida, a fim de obter preparações citológicas com grande quantidade de metáfases. Em outras espécies de plantas, como *Pisum sativum* (NEUMANN et al., 1998), *Allium commutatum* (BESENDORFER et al., 2002), *Crotalaria* (CUCO et al., 2003), *Capsicum annuum* (ALMEIDA e CARVALHO, 2004), bloqueadores como trifluralina, orizalina e colchicina têm sido também utilizados. Segundo Hansen et al.

(1996) e Planchais et al. (2000), os herbicidas orizalina e trifluralina, assim como o APM, utilizados no presente trabalho, são mais recomendados para uso em espécies vegetais, pois, são eficazes quando aplicados em doses baixas, em nível micromolar. Já a colchicina é aplicada em nível milimolar, podendo causar anormalidades nos processos mitóticos e formação de micronúcleos, além de ser mais tóxica para quem manipula.

Para obtenção de metáfases morfologicamente adequadas a análises, raízes pré-tratadas com bloqueadores mitóticos foram colocadas em uma tela com poros de dois milímetros de diâmetro, a fim de impedir que as sementes ficassem submersas na solução de tratamento. As lâminas preparadas a partir das raízes dessas sementes não apresentaram bons resultados. Isso mostra que, como as sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* germinam em condições de umidade, tais condições devem ser mantidas, também, na etapa de pré-tratamento.

No presente trabalho, o fixador utilizado na proporção de 3:1 (3 metanol: 1 ácido acético) mostrou-se adequado para manter a integridade dos cromossomos, assim como observado por Carvalho (1995) em *Zea mays*, Almeida e Carvalho (2004) em *Capsicum annuum* e Clarindo (2004) em *Coffea* spp. Outra etapa considerada importante refere-se à maceração enzimática das raízes. Com a enzima Flaxzyme, na proporção de 1: 30 (10 µL da enzima em 300 µL de água destilada), à temperatura de 34 °C, durante 1 hora e 30 minutos, foi possível eliminar a parede celular das células sem interferir na morfologia dos cromossomos.

A remoção da parede celular, associada à técnica de dissociação celular e secagem ao ar, possibilitou a visualização de cromossomos íntegros e espalhados sobre as lâminas (Fig. 1). A qualidade dos cromossomos foi observada, em função da ausência de sobreposição e por estarem no mesmo plano focal. Tais características são pouco observadas em preparações citogenéticas, realizadas com a técnica convencional de esmagamento, devido à presença de fragmentos celulares que envolvem núcleos e cromossomos. Esta técnica vem sendo aplicada por diferentes autores em *P. edulis* f. *flavicarpa* (MAYEDA, 1997; SOARES-SCOTT, 1998; SOUZA, 2002; CUCO et al., 2003; MELO e GUERRA, 2001, 2003).

A análise do cariótipo do maracujá-amarelo revelou número cromossômico de $2n=18$, evidenciando o mesmo resultado obtido em estudos anteriores (STOREY, 1950; OLIVEIRA, 1996; MAYEDA, 1997; SOARES-SCOTT, 1998; SOUZA, 2002; CUCO et al., 2003; MELO e GUERRA, 2001, 2003). Quanto à classificação centromérica, os resultados encontrados (seis pares metacêntricos e três pares

submetacêntricos) (Fig. 2) foram diferentes dos resultados observados por Soares-Scott (1998), que descreveu dois pares de cromossomos submetacêntricos (pares 4 e 7) e sete pares metacêntricos (1, 2, 3, 5, 6, 8, 9). As análises morfométricas apresentaram resultados próximos aos observados pela autora, porém os valores encontrados para o complemento haplóide, em cromossomos metafásicos, foram de 21,59 μm . No presente estudo, o comprimento médio dos cromossomos prometafásicos totaliza 45 μm e dos cromossomos metafásicos 26,65 μm (Tabs 1 e 2). Esta diferença pode ser justificada, em parte, pelo grau de compactação dos cromossomos e por diferenças metodológicas.

O número de constrições secundárias presentes no cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa* vem sendo descrito com diferentes classificações. Oliveira (1996) encontrou, apenas, uma constrição secundária no cromossomo 8, enquanto Mayeda (1997) relatou a presença de dois pares de cromossomos com satélites. Soares-Scott (1998) apresentou um cariótipo para a espécie com a presença de duas constrições secundárias, uma no cromossomo 4 e outra no cromossomo 7, ambas no braço longo. Em trabalhos posteriores, essa autora relatou a presença de, pelo menos, três constrições secundárias, porém não especificou a posição. Cuco et al. (2003) observaram a presença de constrições secundárias nos cromossomos 8 e 9, os menores da espécie. Todos esses autores utilizaram a técnica de esmagamento nas preparações citogenéticas. No presente trabalho, ao contrário, com o auxílio da técnica de dissociação celular e secagem ao ar, foi possível identificar quatro constrições secundárias, localizadas na porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7 (Fig. 2). Segundo Mayeda (1997), diferenças como estas podem ocorrer em virtude da qualidade da preparação da amostra, ou por tratar-se de variação genética entre as populações. Neste caso, variações cariotípicas intra-específicas são geradas em consequência de rearranjos estruturais, conforme relatado em espécies, nas quais diferenças cariotípicas são encontradas entre diferentes populações (CID e PALOMINO, 1996; MOSCONE, 1990). Adicionalmente, essas diferenças podem significar a resposta desses genomas aos diferentes ambientes, conforme observado em espécies de *Crotalaria* (PALOMINI e VAZQUEZ, 1991, citados por SOUZA, 2002).

5.2- Coloração com laranja de acridina

A coloração com laranja de acridina em cromossomos de *P. edulis* f. *flavicarpa*, de acordo com o protocolo utilizado por Almeida e Carvalho (2004), revelou padrão de marcação semelhante ao observado pelos autores em cromossomos de pimentão e milho. Nessas espécies, porém, foram visualizadas marcações de fluorescência verde-amarelada flanqueando as regiões de constrição secundária dos cromossomos, enquanto, no maracujá, as marcações foram visualizadas na porção terminal. Essas diferenças podem ter ocorrido em virtude do grau de empacotamento dos cromossomos, impossibilitando que as marcações fossem individualizadas.

Segundo Almeida e Carvalho (2004), as regiões evidenciadas pelo fluorocromo laranja de acridina são pontos de heterocromatina associada a regiões organizadoras nucleolares. No caso do maracujá, essas regiões foram associadas a dois cromossomos apenas (cromossomos 7 e 8) (Fig. 3b), concordando, em quantidade, com o relato de vários autores que aplicaram outras técnicas para detectar RONs (MAYEDA, 1997; CUCO et al., 2003; MELO e GUERRA, 2003).

Os resultados encontrados no presente trabalho foram similares aos relatados por Sato (1988) para outras espécies de plantas. O autor observou a presença de segmentos heterocromáticos associados à RON pela emissão de fluorescência verde-amarelada em cromossomos de *Vicia faba*, *Allium fistulosum*, *Chrysanthemum coronarium*, *Lycoris aurea* e *Nothoscordum fragrans*, após serem submetidos ao pré-tratamento de bandeamento-C, seguido de coloração com laranja de acridina.

Além de evidenciar segmentos heterocromáticos associados a RON, em cromossomos de plantas (SATO, 1988; CUÉLLAR et al., 1999; ALMEIDA e CARVALHO, 2004), o fluorocromo laranja de acridina tem sido utilizado, também, para identificação de bandas teloméricas (GENDEL e FOSKET, 1978) e regiões de heterocromatina pericentromérica (PEREIRA e SOUZA, 2000). Dessa forma, os pré-tratamentos para desnaturação dos cromossomos determinam a marcação da região de interesse. Para identificar especificamente os pares cromossômicos, que apresentaram constrição secundária associada a RON no cariótipo do maracujá, o pH da solução-tampão, utilizado de acordo com o bandeamento RFA adaptado por Almeida e Carvalho (2004), foi alterado de 6,5 para 4,7. Os materiais submetidos a tratamentos em tampões com pHs inferiores ou superiores a este valor não evidenciaram nenhuma marcação.

Segundo Almeida e Carvalho (2004), a heterocromatina que flanqueia a constrição secundária possivelmente é diferente, em estrutura ou composição, daquela que flanqueia a região centromérica. Enquanto na região do centrômero são encontradas heterocromatinas do tipo α , nas constrições secundárias encontra-se heterocromatina do tipo β , sendo diferenciadas pelo tipo de condições desnaturantes da técnica. Esta característica pode justificar a ausência de marcações na região centromérica nos cromossomos de maracujá, conforme observado por esses autores em milho e pimentão.

Outros fluorocromos têm sido utilizados para identificar heterocromatina associada à RON em cromossomos de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Com os fluorocromos base-específicos Cromomicina A3 e Distamicina, Cuco et al. (2002) identificaram sinais fluorescentes nos cromossomos 8 e 9, afirmando que as RONs devem ser preferencialmente ricas em GC. Esses resultados concordam, em parte, com os encontrados no presente trabalho, em que a fluorescência verde-amarelada foi identificada nos cromossomos 7 e 8.

5.3- Hibridização *in situ* fluorescente

Dentre as quatro constrições secundárias encontradas no cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa*, apenas duas apresentaram marcação por FISH (Fig. 5). Estes resultados estão de acordo com trabalhos realizados anteriormente por diferentes autores. No entanto, todos os relatos disponíveis na literatura envolvem o uso de sondas de rDNA 45S e 5S, ao invés da sonda de rDNA 18S, utilizada no presente estudo. Quanto à localização dessas regiões, os resultados concordam em parte com Cuco et al. (2001), que identificaram esses sítios nos cromossomos 8 e 9, porém não especificando o braço; concordaram ainda com Melo e Guerra (2003), que identificaram sítios de rDNA 45S no braço longo dos cromossomos 7 e 9, e rDNA 5S no braço longo do cromossomo 5. No presente trabalho, as marcações foram evidentes no braço curto do cromossomo 7 e no braço longo do cromossomo 8, discordando dos dados obtidos pelos referidos autores quanto à presença de marcação no cromossomo 9. Segundo Souza (2002), essas diferenças podem ser encontradas em função do pequeno tamanho dos cromossomos ou por diferenças no grau de compactação. Essas diferenças podem ser atribuídas, ainda, à qualidade morfológica dos cromossomos, que foram obtidos pela técnica de dissociação celular e secagem ao ar.

As RONS estão em pontos cromossômicos de seqüências de DNA repetidas que codificam para rRNA 18S, 5.8S e 26S (18S-26S) (BESENDORFER et al., 2002), sendo que, citologicamente, estas regiões estão localizadas em constrições secundárias nos cromossomos metafásicos (SATO et al., 1980; LANGER e KOUL, 1983). Segundo Sumner (2003), tais genes são transcritos como uma única unidade (45S). Portanto, a utilização de apenas uma dessas seqüências, como a de rDNA 18S utilizada como sonda no presente trabalho, não impossibilitou a identificação das constrições secundárias que contêm os genes. Outra seqüência que codifica para rRNA é a 5S, porém não está localizada em estruturas distintas, encontrando-se espalhadas pelo genoma (SUMNER, 2003).

Segundo Battistin et al. (1999), todas as RONS estão localizadas em constrições secundárias, mas nem todas as constrições secundárias são sítios de RON. Pelo menos três dessas constrições foram encontradas, nos cromossomos do maracujá, por Soares-Scott (1999), citada por Souza (2002), e um ou dois sítios de RON foram relatados por diferentes autores (OLIVEIRA, 1996, CUCO et al., 2003, MELO e GUERRA, 2003). No presente trabalho, entretanto, com auxílio das técnicas utilizadas, foi possível identificar quatro constrições secundárias e dois sítios de RONS no cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Com a coloração com Giemsa, foram identificados o número e a posição dessas constrições (porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7). Com a aplicação da coloração com laranja de acridina e da técnica de FISH, pode-se observar que apenas as constrições dos cromossomos 7 e 8 estão associadas à RONS.

6- CONCLUSÕES

As preparações citogenéticas realizadas em meristemas radiculares de *P. edulis* f. *flavicarpa* pré-tratados com APM, 3 μ M, durante 16 horas e 25 minutos, a 3 °C, juntamente com a aplicação da técnica de dissociação celular e secagem ao ar, resultaram em cromossomos prometáfásicos e metafásicos espalhados, no mesmo plano de foco da lâmina e com morfologia adequada para montagem dos cariogramas. Os resultados permitiram a caracterização morfológica dos 9 pares cromossômicos, sendo seis metacêntricos (2-7) e três submetacêntricos (1, 8 e 9). Observou-se a presença de constrição secundária na porção subterminal do braço longo dos cromossomos 1 e 8 e porção subterminal do braço curto dos cromossomos 2 e 7, sendo que, conforme os dados disponíveis na literatura, o número destas constrições variou de um a três, quando observadas em preparações obtidas por meio da técnica de esmagamento.

Com o fluorocromo laranja de acridina, foram identificadas regiões de fluorescência verde-amarelada na porção terminal do braço curto do cromossomo 7 e do braço longo do cromossomo 8. De acordo com os dados disponíveis na literatura, essas regiões são, possivelmente, heterocromatina associada às RONS, estando, portanto, localizadas em apenas dois cromossomos que apresentaram constrição secundária.

A técnica de FISH, com a utilização de sonda de rDNA 18S, revelou quatro marcações fluorescentes em núcleos interfásicos e marcações fluorescentes nos mesmos pares cromossômicos marcados com laranja de acridina, em metáfase. As marcações obtidas com o fluorocromo correspondem em número e localização dos sítios de rDNA 18S, confirmando, dessa forma, que somente duas das quatro constrições secundárias encontradas com a coloração de Giemsa estão relacionadas com RON.

Assim, considerando que diferenças intraespecíficas e de ecotipos não estejam envolvidas nas diferenças morfológicas pesquisadas, as metodologias aplicadas corroboraram a ampliação da resolução do cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Evidenciou-se, portanto, diferenças na posição do centrômero, número e localização das constrições secundárias e das RONS, em comparação com os resultados encontrados na literatura.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. FNP Consultoria e Agroinformativos., 2004. 496p.
- ALMEIDA, P.M.; CARVALHO, C.R. NOR-associated heterochromatin of pepper chromosomes stained with acridine orange. **Caryologia**, 57: 172-176, 2004.
- ANDRADE, S.R.M. **O maracujá deve passar por um processo de limpeza clonal?** 2003. Disponível em: <http://www.boletimpecuario.com.br/artigos>. Acesso em: 10. out. 2004.
- ARORA, O.P.; MADHUSOODANAN, K.J. Nature of tetraploidy *Matricaria inodora* L. **Cytologia**, 46: 773-779, 1981.
- BARRETT, S.D. Software for scanning microscopy. **Proceedings of the Royal Microscopy Society**, 37: 7-14, 2002.
- BATTISTIN, A.; BIONDO, E.; COELHO, L.G.M. Chromosomal characterization of three native and one cultivated species of *Lathyrus* L. in southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 22(4): 557-563, 1999.
- BEAL, P.R. Cytology of the native Australian and several exotic *Passiflora* species.3. morphology of satellited chromosomes. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, 30: 19-24, 1972.

- BENSON, W.W.; BROWN, K.S.; GILBERT, L.E. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, 29: 659-680, 1975.
- BERTÃO, M.R. **Evolução cariotípica no gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. Piracicaba- SP: ESALQ, 1993. 148 p. (Dissertação M.S.).
- BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M.E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 139: 99-108, 2002.
- BICKMORE, W.; CRAIG, J. **Chromosome Bands: Patterns in the genome**. [S. l.]: Springer Verlag, 1997. 185p.
- BORÉM, A.; GUIMARÃES, E.P.; FEDERIZZI, L.C.; TOLEDO, J.F.F. From Mendel to genomics, plant breeding milestones: a review. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, 2: 649-658, 2002.
- BRASILEIRO-VIDAL, A.C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S.P.; ZANATTA, A.C.; PRESTES, A.M.; MORAES-FERNANDES, M.I.B.; GUERRA, M. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, 26: 505-510, 2003.
- BUONGIORNO-NARDELLI, M.; AMALDI, F. Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. **Nature**, 225: 946-947, 1969.
- CAIXETA, E.T. **Estudo citogenético dos cromômeros de cromossomos meióticos de milho (*Zea mays*)**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 96p. (Dissertação M.S.).
- CARVALHO, C.R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 127p. (Tese D.S.).

- CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S.A. New heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, 70: 515-519, 1993.
- CARVALHO, C.R., SARAIVA, L.S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research**, 110: 417-420, 1997.
- CERVI, A.C. Passifloraceae do Brasil. Estudos do gênero *Passiflora* L. subgêneros *Passiflora*. **Fontqueria**, 45: 1-92, 1997.
- CID, R.; PALOMINO, G. Cytotypes and meiotic behavior in Mexican populations of *Myrtillocactus geometrizans* var. *geometrizans* (Cactaceae). **Cytologia**, 61: 343-348, 1996.
- CLARINDO, W.R. **Avaliação de agregados celulares de café (*Coffea* spp.) por técnicas citométricas e citogenéticas**. Viçosa-MG: UFV, 2004. 83p. (Dissertação M.S.).
- CLARK, M.S., WALL, W.J. **Chromosomes: the complex code**. London: Chapman & Hall, 1996. 345p.
- COLBERT, S.A.; WILLMER, P.G. *Passiflora* and *Xylocopa*: economic and evolutionary considerations. **Acta Botanica Neerlandica**, 29: 55, 1980.
- CUCO, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Localização de sítios de rDNA em híbridos somáticos e espécies parentais de *Passiflora*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47., 2001, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).
- CUCO, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Análise de cromossomos satelitados em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* através de métodos de coloração com nitrato de prata, cromomicina A3/distamicina e FISH com sonda de rDNA 45S. CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).

- CUCO, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasilica**, 17(3): 1-7, 2003.
- CUÉLLAR, T., ORELLANA, J., VELASEN, E., BELLA, J.L. Chromosomal characterization and physical mapping of the 5S and the 18S-5.8S-25S ribosomal DNA in *Helianthus argophyllus*, with new data from *Helianthus annuus*. **Genome**, 42: 110-115, 1999.
- CZEPULKOWSKI, B. **Analysing chromosomes**. The basics from background to bench. [S. l.]: Springer Verlag, 2001. 205p.
- D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J.C. Determination of basic chromosome numbers in genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, 41: 221-225, 1998.
- DOLEZEL, J.; CIHALIKOVA, J.; WEISEROVA, J.; LUCRETTI, S. Cell cycle synchronization in plant root meristems. **Methods in Cell Science**, 21: 95-107, 1999.
- DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVEIRA, J.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, 15: 106-110, 1995.
- GALL, J.; PARDUE, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrids molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 63: 378-383, 1969.
- GALETTI Jr, P.M. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. **Italian Journal of Zoology**, 65: 53-56, 1998.
- GENDEL, S.; FOSKET, D.E. Differential rates of DNA denaturation and renaturation *in situ* in relation to the C-banding of *Allium cepa* chromosomes. **Cytobios**, 21: 91-101, 1978.

- GUERRA, M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, 9: 741-743, 1986.
- GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. [S. l.]: Guanabara, 1988. 142p.
- GUERRA, M. **FISH (fluorescent *in situ* hybridization)- Conceitos e aplicações na citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética,.2004. 176p.
- HABERER, G.; FISCHER, T.C.; TORRES-RUIZ, R.A. Mapping of the nucleolus organizer region on chromosome 4 in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular General Genetics**, 250: 123-128, 1996.
- HANSEN, N.J.P.; ANDERSEN, S.B. In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. **Euphytica**, 88: 159-164, 1996.
- HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal gene activity: Silver stain proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, 62: 361-367, 1977.
- JANZEN, D.H. Reproductive behavior in the Passifloraceae and some of its pollinators in Central America. **Behavior**, 32: 33-48, 1968.
- JAUHAR, P.P. **Methods of genome analysis in plants**. [S. l.]: CRC Press, 1996. 386p.
- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R. A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, 27(2): 196-198, 2004.
- KOSCHNITZKE, C. **Morfologia e biologia floral de cinco espécies de *Passiflora L.* (Passifloraceae)**. Campinas-SP: UNICAMP, 1993. 81p. (Dissertação M.S.).
- LANGER, A.; KOUL, A.K. Studies on nucleolus and nucleolar chromosomes in angiosperms IX. *Lilium* Linn. **Cytologia**, 48: 519-526, 1983.

- LEVAN, A., FREDGA, A., SANDERBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position in chromosome. **Hereditas**, 52: 201-220, 1964.
- LIMA, A.A.; BORGES, A.L.; CARDOSO, C.E.L.; BARBOSA, C.J.; COSTA, D.C.; FILHO, H.P.S.; FANCELLI, M.; SANCHES, N.F. **Coleção Plantar- Maracujá**. Embrapa, 1999. 109p.
- LOPES, S.C. Citogenética do maracujazeiro- *Passiflora* spp. In: **A cultura do maracujá no Brasil**. SÃO JOSÉ, A. R., FERREIRA, F.R., VAZ, R.L. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 201-209.
- LUCAS, A.A.T. **Resposta do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa* Deg.) a lâminas de irrigação e doses de adubação potássica**. Piracicaba-SP: ESALQ, 2002. 105p. (Dissertação M.S.).
- LUCRETTI, S.; DOLEZEL, J. Cell cycle synchronization, chromosome isolation, and flow-sorting in plants. **Methods en Cell Biology**, 50: 61-83, 1995.
- MacGREGOR, H.C. Chromosome research-look forward to 2001. **Chromosome Research**, 1: 5-7, 1993.
- MANICA, I. **Fruticultura tropical: Maracujá**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 151p.
- MARCON, A.B.; BARROS, I.C.L.; GUERRA, M. Variation in chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* (Pteridophyta). **Annals of Botany**, 95: 271-276, 2005.
- MARTIN, F.W.; NAKAZONE, H.Y. The edible species of *Passiflora*. **Economic Botany**, 24(3): 333-343, 1970.
- MAYEDA, L.Y. **Estudo citogenético em dez táxons do gênero *Passiflora* L.** (Passifloraceae). Piracicaba-SP: ESALQ, 1997. 89p. (Dissertação M.S.).

- MELO, N.F.; GUERRA, M. Karyology and citotaxonomy of the genus *Passiflora* L. **Plant Systematics and Evolution**, 226: 69-84, 2001.
- MELO, N.F.; GUERRA, M. Variability of 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, 92: 309-316, 2003.
- MONTIJN, M.B.; HOOPEN, R.T.; FRANSZ, P.F.; NANNINGA, O.N. Characterisation of the nucleolar organizing regions during the cell cycle in two varieties of *Petunia hybrida* as visualized by fluorescence in situ hybridization and silver staining. **Chromosoma**, 107: 80-86, 1998.
- MOSCONE, E.A. Chromosome studies on *Capsicum* (Solanaceae) I. Karyotype analysis in *C. chacoense*. **Brittonia**, 42: 147-154, 1990.
- MURRAY, B.G. Heterochromatin and silver banding of rye (*Secale cereale*, Gramineae) chromosomes. **Plant Systematics and Evolution**, 193: 243-248, 1994.
- NEUMANN, P.; LYSÁK, M.; DOLEZEL, J.; MACAS, J. Isolation of chromosomes from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. **Plant Science**, 137: 205-215, 1998.
- OLIVEIRA, A.M.A. **Reprodução e citogenética de espécies de *Passiflora***. São José do Rio Preto-SP: UNESP, 1996. 148p. (Tese D.S.).
- OSUJI, J.O.; CROUCH, J.; HARRISON, G.; HESLOP-HARRISON, J.S. Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: location of 18S-5.8S-25S and 5S and telomere-like sequences. **Annals of Botany**, 82: 243-248, 1998.
- OTONI, W.C.; BLACKHALL, N.W.; d'ULTRA VAZ, F.B.; CASALI, V.W.D.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Somatic hybridization of *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. incarnate* L. **Journal of Experimental Botany**, 46(288): 777-785, 1995.

- PEDROSA-HARAND, A.; GUERRA, M. Contribuições da FISH para a citogenética de plantas. In: **FISH (fluorescent *in situ* hybridization)- Conceitos e aplicações na citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 176p.
- PEREIRA, L.G.; SOUZA, M.J. Nature and distribution of constitutive heterochromatin and NOR location in the grasshopper *Phaeoparia magacephala* (Romaleidae: Orthoptera). **Cytobios**, 103(403): 111-119, 2000.
- PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, 476: 78-83, 2000.
- RICHER, C.L.; DROUIN, R. Advances in mutagenesis research 2. In: Dynamic banding for high-resolution analysis of chromosomes and assignment of DNAs replication times. **Germany**. [S. I.]:Springer Verlag, 1990. p. 55-71.
- RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M.M. **Glossary of Genetics Classical and Molecular**. [S. I.]: Springer Verlag, 1991. 553p.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A. et al. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA-SPI. Publicações técnicas FRUPEX19, 1996. 64p.
- SATO, S.; HIMUZE, M.; KAWAMURA, S. Relationship between secondary constrictions and nucleolus organizing regions in *Allium sativum* chromosomes. **Protoplasma**, 105: 77-85, 1980.
- SATO, S. Color differential staining of NOR- associated heterochromatic segments using acridine orange. **Stain Technology**, 63(4): 235-240, 1988.
- SCHMID, M.; HOFGARTNER, F.J.; ZENSES, M.T.; ENGEL, W. Evidence for postmeiotic expression of ribosomal RNA genes during male gametogenesis. **Human Genetics**, 38: 279-281, 1977.

- SCHWARZARCHER, H.G.; MIKELSAAR, A.V.; SCHNEDL, W. The nature of Ag-staining of nucleolus organizer regions. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 20: 24-39, 1980.
- SHARMA, A.K.; SHARMA, A. **Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering**. The Netherlands: Harwood Academic Publishers, 1999. 371p.
- SILVA, A.C.; SÃO JOSÉ, A.R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. C. **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da Conquista, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 1994. 255p.
- SINGH, R.J. **Plant Cytogenetics**. [S. l.]: CRC Press, 1993. p285-304.
- SNOW, N.; MacDOUGAL, J.M. New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany**, 18: 261-273, 1993.
- SOARES-SCOTT, M.D. **Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora***. Campinas-SP: UNICAMP, 1998, 89p. (Dissertação M.S.).
- SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 179p., 1997.
- SOUZA, M.M. **Estudos genômico e reprodutivo em espécies de *Passiflora***. Campos dos Goytacazes-RJ: UENF, 2002. 162p. (Tese D.S.).
- STOREY, W.B. Chromosomes numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. **Pacific Science**, 4: 37-42, 1950.
- SUMNER, A.T. **Chromosome Banding**. London: Unwin Hyman, 1990. 419p.
- SUMNER, A.T. **Chromosomes Organization and Function**. [S. l]: BlackWell Publising, 2003. 287p.
- SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer Verlag, 1992. 469p.

- TEIXEIRA, C.G. Maracujá: cultura. In: Instituto de tecnologia de alimentos. **Maracujá: cultura, matéria- prima, processamento e aspectos econômicos**. 2 ed. Campinas: Secretaria de Agricultura e Abastecimento/ ITAL., 1994. p3-131.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 2 ed. The MIT, Cambridge, 1996.
- VERMA, R.S.; DOSIK, H.; LUBS, H.A. Demonstration of color and size polymorphisms in human acrocentric chromosomes by acridine orange reverse banding. **The Journal of Heredity**, 68: 262-263, 1977.
- VERMA, R.S.; LUBS, H.A. A simple R banding technique. **American Journal of Human Genetics**, 27: 110-117, 1975.
- VERMA, R.S.; LUBS, H.A. Additional observations on the preparations of R-banded human chromosomes with acridine orange. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, 18: 45-50, 1976.
- VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, C.A.; MAYEDA, L.Y.; DORNELAS, M.C.; FUNGARO, M.H.P. Estudo do cariótipo e da variabilidade genética detectada por RAPD em espécies de maracujazeiros (*Passiflora* L.). **Revista Brasileira de Genética**, 20:88 (Suplemento), 1997.
- von KALM, L.; SMYTH, D. R. Ribosomal RNA genes and the substructure of nucleolar organizing regions in *Lilium*. **Canadian Journal Genetics Cytology**, 26: 158-166, 1984.
- XU, L.; CHAUDHURI, A.; *Plasmodium yoelii*: A differential fluorescent technique using Acridine Orange to identify infected erythrocytes end reticulocytes in duffy knockout mouse. **Experimental Parasitology**, 110: 80-87, 2005.