

Citogenética vegetal: da era clássica à molecular

Imagem: Sandra Brammer



Sandra Patussi Brammer¹
Maira Zanotto²
Andréia Caverzan³



Histórico da Citogenética

As primeiras atividades envolvendo a citologia datam de 1591-1608 em que Sachariassen e Jansen desenvolveram o primeiro microscópio composto (aumento de 10 vezes). Contudo, o marco inicial foi quando em 1663 Hooke, matemático e microscopista, estudando cortiça em microscópio com aumento de apenas 100 a 200 vezes, observou que esta era constituída por inúmeras pequenas caixas que chamou de **células**. Seguiram-se dois séculos de observações e experimentações para que fosse formulada a Teoria Celular, ou seja: “a célula é a unidade da organização biológica; todos os seres vivos são constituídos por células, as menores unidades capazes de vida independente”. Muitos anos posteriores de pesquisa foram necessários para o conhecimento exato dos mecanismos celulares e a compreensão da hereditariedade.

Desde a época de Mendel, a **Citologia** e a **Genética** passaram a colocar seus conhecimentos numa área comum, mais tarde denominada **citogenética**. A partir disso, a citogenética expandiu-se enormemente, se inserindo em vários outros campos da Biologia, como a Taxonomia, a Bioquímica, a Medicina Clínica e o Melhoramento Animal e Vegetal (Guerra, 1988). Além do mencionado, as observações sobre o comportamento dos cromossomos na mitose, meiose e fertilização, principalmente na Alemanha, no período de 1870 a 1890, forneceram um quadro geral quanto à

¹ Pesquisadora Embrapa Trigo, caixa postal 451, CEP 99001-970 Passo Fundo RS, sandra@cnpt.embrapa.br. Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno - Área de Citogenética e Genética Molecular.

² Bióloga – Universidade de Passo Fundo, UPF

³ Bióloga, UPF. Mestranda em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia da UFRGS.

transmissão, de geração à geração, das estruturas fundamentais responsáveis pela herança.

Sendo a citogenética o estudo da genética por meio da citologia, esta área da ciência engloba todo e qualquer estudo relacionado com o cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução. É uma das fontes geradoras de questionamentos que impulsionaram a genética molecular, embasando a tecnologia de ponta, como a biotecnologia e a engenharia genética, permanecendo junto às mesmas, como um dos recursos de avaliação em várias pesquisas dessa natureza (Sacchet, 1999). A **citogenética clássica** desenvolveu-se principalmente a partir do início do século passado e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia.

A análise cromossômica sempre foi um dos campos estimulantes da Citologia e da Genética, tendo relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma. Apesar da revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, diferenciados em sub-unidades e manipulados de diferentes formas, pois de nenhuma outra forma o material genético é tão claramente observado.

Com a introdução das técnicas moleculares, os então chamados “corpos corados” da Citologia estão cada vez mais “brilantemente corados”, em cores e pseudo-cores das mais variadas. A obtenção de bons resultados depende do perfeito domínio de diferentes técnicas de coloração. Sendo assim, a citogenética reúne informações obtidas sobre o material genético, estampada em uma simples foto, a uma estética própria da área, capaz de impressionar iniciantes e profissionais experientes (Guerra & Souza, 2002).

Na **citogenética molecular**, a análise cromossômica tem sido de grande importância para o entendimento da evolução, genética e estabilidade cariotípica dos materiais estudados. Por muito tempo, a caracterização cromossômica foi baseada especialmente em parâmetros morfológicos, como o tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias. Com a implantação de técnicas de bandeamento, que permitem a visualização de blocos de coloração diferenciada (bandas), a caracterização cromossômica foi melhorada significativamente (Brasileiro-Vidal & Guerra, 2002).

Estrutura celular e seus componentes fundamentais

A **célula** é a unidade da organização biológica capaz de usar substâncias obtidas do meio para manter e produzir o estado vivo. A palavra **núcleo** vem do latim *nucleus* que significa caroço. Esta estrutura foi descrita no século passado por Robert Brown. O núcleo é o centro de controle das atividades celulares. A presença do núcleo é a principal característica que distingue uma célula eucariótica de uma procariótica. A maior parte da informação genética está acumulada no DNA do núcleo. Esta estrutura, além de conter a informação genética da célula, também controla o metabolismo celular por meio da transcrição do DNA nos diferentes tipos de RNA (Mesquita, 1981; Junqueira & Carneiro, 2000).

Nas últimas décadas, estudos celulares têm produzido verdadeiras revoluções nas tecnologias e no conhecimento biológico. Atualmente, acredita-se que o núcleo é o componente celular que mais desperta interesse na comunidade científica mundial. Essa organela só pode ser visualizada com seus componentes – carioteca, cromatina

e nucléolo – íntegros durante a interfase, mas células muito ativas apresentam núcleos volumosos e envoltório com grande quantidade de poros (Paiva, 2005).

Durante a interfase, fase em que o núcleo não está se dividindo, há presença no seu interior de um ou mais corpos bem evidenciáveis (nucléolos), de um componente filamentososo ou granuloso (cromatina), onde se situa o DNA, e de um componente fibroso ou de aparência amorfa (matriz nuclear). Durante a divisão celular, a cromatina aparece sob a forma de unidades individualizadas, que são então denominadas **cromossomos** (Mello, 2001).

As primeiras idéias sobre cromossomos surgiram no final do século XIX, quando estudos sobre mitose foram realizados. Em 1866, Heckel propôs que o núcleo celular era o principal agente responsável pela divisão das células. O primeiro cientista, entretanto, a descrever o processo da divisão celular mitótica de forma clara e objetiva foi o zoólogo alemão Anton Schneider, em 1873 (Kavalko, 2003).

Os cromossomos são estruturas complexas, localizadas no núcleo das células, compostos por DNA, histonas e outras proteínas, RNA e polissacarídeos. Eles contêm, portanto, os fatores genéticos ou genes das células. Emprega-se, geralmente, o termo cromossomo mitótico para os cromossomos durante a mitose, e o termo cromossomo interfásico para os cromossomos durante a interfase. Os cromossomos têm forma e número definido para cada espécie, sendo estes constituídos de um número variável de filamentos de DNA ligados a proteínas (Mesquita, 1981).

O **nucléolo** compreende uma estrutura de forma esférica que existe no núcleo das células eucarióticas. Geralmente, cada núcleo possui um só nucléolo, mas existem núcleos com dois ou mais nucléolos, como por exemplo, as células vegetais. Esta estrutura é composta de uma porção granular e uma porção fibrilar, ambas as partes são constituídas de RNA, proteínas e fosfolipídios. Em geral, os nucléolos estão associados a um cromossomo que é chamado cromossomo organizador do nucléolo. Especificamente neste cromossomo destaca-se uma constrição secundária em que está associada à Região Organizadora do Nucléolo (“RON” ou do inglês “NOR”). Nesta região, estão localizados os genes responsáveis pela produção de rRNAs (RNA ribossômico), os quais constituem parte do nucléolo. A sua importância está em produzir e processar os rRNAs necessários para sintetizar todas as proteínas da célula. Os genes ribossômicos estão presentes em múltiplas cópias no genoma, ou seja, é um tipo de DNA repetitivo (Mesquita, 1981).

O tamanho e forma do nucléolo dependem do estado funcional celular, variando conforme a espécie e, dentro de uma espécie, de tecido para tecido e mesmo de célula para célula e também durante o ciclo celular. Segundo descrições clássicas, o nucléolo desaparece no fim da prófase reaparecendo na telófase, junto aos sítios NORs. A reformulação pós-mitótica dos nucléolos vai depender da interação de duas entidades diferentes como as regiões NORs e os corpos pré-nucleolares, que aparecem na telófase (Mello, 2001).

Cromossomos e Morfologia Cromossômica

Segundo Walker e Rapley (1999), por ocasião do início do século 20, o estudo microscópico de células em divisão mostrava que o número de cromossomos era constante no interior de células de mesma espécie, mas variava em número, geralmente entre as espécies. Em uma célula, os cromossomos variavam em tamanho e forma, com duas cópias de cada tipo presentes em cada célula somática. Também, observou-se que seu número dobrava (para dois pares) antes da divisão celular, e que cada célula filha recebia um dos pares (mantendo o número normal de cromossomos).

Em preparações coradas, vistas à microscopia ótica, os cromossomos aparentam possuir poucas características morfológicas definidas, pelas quais pode-se diferenciar os membros de um conjunto, uns dos outros. Assim, as características mais importantes são: comprimento, posição do centrômero e tamanho relativo dos braços, presença de satélites (caso haja), destacados pelas constrições secundárias (Burns, 1986).

De acordo com Mesquita (1981), no núcleo interfásico os cromossomos estão desespiralizados, mas apresentam regiões condensadas que correspondem a heterocromatina. Quando a célula vai se dividir, os cromossomos se condensam existindo assim constrições. Uma das regiões estranguladas, que existe em todos os cromossomos, constitui o centrômero ou cinetócoro, sendo também chamada de estrangulamento primário.

Conforme revisão em Mesquita (1981), os centrômeros apresentam localizações diferentes nos cromossomos, sendo que esta particularidade é usada para a classificação dos mesmos. Os cromossomos telocêntricos são aqueles que o centrômero está localizado em uma extremidade. Os submetacêntricos apresentam o centrômero localizado na região próxima ao centro, dividindo os cromossomos em duas partes desiguais. E, no caso dos cromossomos metacêntricos, o centrômero está localizado no centro, dividindo o cromossomo em duas partes iguais. Além desta característica, os cromossomos têm em geral, o aspecto de bastonetes de 0,2 a 2 μ m de diâmetro por 0,2 a 50 μ m de comprimento, sendo separados por dois braços através do centrômero. Conforme o tamanho relativo dos braços e a posição do centrômero diferenciam-se vários tipos de cromossomos: cromossomo em bastão retilíneo, cromossomo em V de braços iguais, cromossomo em V de braços desiguais, cromossomos de braços muito curtos (cromossomo puntiforme). Na extremidade de um dos braços, em alguns cromossomos, pode-se ver uma pequena esfera presa por uma fina trabécula que é o satélite (Berkaloff et al., 1975).

Conforme Berkaloff et al. (1975), o estudo morfológico dos cromossomos, mostra que existem no núcleo dois exemplares idênticos de cada cromossomo onde se apresentam em pares chamados cromossomos homólogos. O número "n" de cromossomos é característico da espécie, apresentando cada núcleo "2n" cromossomos, ou, mais precisamente, dois conjuntos idênticos de n cromossomos. Portanto, chama-se haplóide o número "n", enquanto que diplóide o número "2n" de cromossomos.

Em poucos cromossomos, do conjunto cromossômico de cada espécie, aparece outra constrição da cromátide, denominada de constrição secundária, situando-se em mais de 80% no braço curto do cromossomo. O satélite é o segmento cromossômico entre a constrição secundária e o telômero, correspondendo a cerca de 10% da extensão cromossômica, cujo tamanho é inferior a 1 μ m. Porém, em alguns casos, ele pode medir vários micrômetros de extensão e compreender 40% ou mais do tamanho do cromossomo. Já do ponto de vista funcional, as três regiões cromossômicas que merecem maior destaque são o centrômero, a constrição secundária e o telômero. No centrômero, tanto a constrição primária como a secundária são regiões parcialmente descondensadas com baixa densidade de DNA. A constrição secundária é geralmente observada em ao menos um dos cromossomos do conjunto haplóide da cada espécie. Os cromossomos que contêm essa constrição são geralmente vistos, durante a prófase, associados ao nucléolo, ou seja na região organizadora do nucléolo. Ao contrário das outras duas regiões, o telômero não se distingue morfológicamente do restante do braço cromossômico, não sendo possível determinar seu limite proximal ou a sua extensão, embora se saiba que essa região possui propriedades especiais importantes para o funcionamento cromossômico (Guerra, 1988).

Bandeamento Cromossômico

O progresso na identificação positiva dos cromossomos se originou de uma rápida série de estudos que iniciaram em 1968 e 1969, com o trabalho de Caspersson e colaboradores na Suécia. Em síntese, a base desta mudança foi o fato de que muitos corantes que têm uma afinidade pelo DNA, fluorescem sob a luz ultravioleta. Após tratamento adequado com esses corantes, cada cromossomo mostra zonas brilhantes e escuras, ou bandas, que são específicas em tamanho e localização para este cromossomo. Esta característica é melhor visualizada na metáfase.

O descobrimento das técnicas de bandeamento cromossômico permitiu um significativo progresso na citogenética geral, com a obtenção das imagens reproduzidas das bandas cromossômicas de diferentes tamanhos, posição, bem como um importante número de outros organismos tanto animais como vegetais (Drets, 2002). Segundo Guerra (1988), as técnicas de bandeamento cromossômico ampliaram os horizontes da citogenética, pois a primeira aplicação foi no pareamento cromossômico e montagem de cariótipos, em que cada par cromossômico apresenta um padrão distinto e bem característico de bandas.

Exemplo disso foi o sucesso considerável obtido com a quinacrina mostarda, que produziu bandas fluorescentes de vários graus de brilho, as quais foram denominadas de bandas Q. No entanto, há algumas limitações nesta técnica, principalmente a não permanência da fluorescência, mas esta dificuldade pode ser superada pela coloração com Giemsa, seguidas do tratamento com tripsina ou tampão fosfato, que produz um tipo único de bandas, conhecidas como bandas G (Burns, 1986).

Contudo, a variação no método de Giemsa produz padrões de bandas que são o reverso das bandas G, isto é, as bandas G escuras são as bandas R claras e vice-versa. Na modificação do método de Giemsa, o tratamento com álcalis proporciona às células uma coloração densa da região do centrômero, e isto produz o bandeamento C, que é específico para heterocromatina constitutiva. A região centromérica que inclui o DNA repetitivo, responde apenas à técnica de bandeamento C, assim como qualquer região intercalar que contenha DNA repetitivo (Burns, 1986). Especificamente para as bandas C, estas aparecem após o tratamento com soluções ácidas ou alcalinas, seguindo o tratamento com solução salina 2SSC (solução salina concentrada) e coloração com Giemsa (Carvalho & Recco-Pimentel, 2001).

Os bandeamentos Q, G e C são especialmente importantes para a citogenética, porque permitem identificar pequenas variações estruturais, como deleções, duplicações, inversões, geralmente relacionadas com determinadas anomalias do desenvolvimento. Além disso, é possível localizar exatamente a região do cromossomo diretamente afetada, que seria impossível com a coloração convencional. Semelhante em outras espécies, essas técnicas têm possibilitado compreender melhor as alterações cromossômicas que se estabeleceram em cada cariótipo (Guerra, 1988), uma vez que as bandas aparecem por diferenças na distribuição de componentes cromatínicos ou mesmo por diferença na composição química da cromatina ao longo do cromossomo.

Hibridização *in situ*

Os marcadores citogenéticos, como os marcadores de DNA, têm sua expressão independente das variações ambientais ou da ativação gênica, tornando-os caracteres muito confiáveis. Atualmente, grande ênfase está sendo dada para a técnica de Hibridização In Situ (HIS) ou In Situ Hybridization (ISH), sendo que seu

desenvolvimento marcou a transição da era da citogenética clássica para a era da citogenética molecular, uma vez que esta técnica proporciona a interação entre conhecimento da biologia celular, citogenética clássica e genética molecular. Baseia-se no fato do DNA ser formado por duas fitas complementares, as quais podem ser facilmente desnaturadas e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Se no momento da renaturação das fitas de DNA houver fragmentos de DNA marcados (sonda) disponíveis, os mesmos hibridizarão na região de homologia dentro da célula, permitindo a sua localização precisa, tanto em cromossomos, como em núcleos interfásicos. Com a utilização dos fluorocromos, a técnica de HIS começou a ser chamada também por FISH - Fluorescent In Situ Hybridization (Revisão em Moraes, 2007).

Esta técnica foi descrita por Pardue & Gall (1969) na qual utilizavam primeiramente sondas marcadas radioativamente. Atualmente, os protocolos usam sondas não radioativas que apresentam vantagens como a alta resolução, menor tempo de processamento, estabilidade e riscos menores na manipulação. A marcação isotópica adiciona enzimas, haptenos ou fluorocromos. Os protocolos baseados na hibridação *in situ* não isotópica auxiliam na detecção de diferentes alvos na mesma célula por meio do uso de duas ou mais sondas marcadas diferencialmente. Atualmente a detecção é realizada por fluorocromos (moléculas que fluorescem quando excitadas por um comprimento de onda de luz ultravioleta específico) (Rogatto & Rainho, 2000).

O desenvolvimento da técnica de hibridização *in situ* tem possibilitado a identificação de seqüências de DNA em cromossomos mitóticos ou meióticos, em núcleos interfásicos e em fibras de cromatina estendidas. Essa técnica envolve a preparação de lâminas, o isolamento e a marcação da seqüência de DNA que se deseja localizar *in situ* e a sua hibridização nos cromossomos. O DNA marcado funciona como uma sonda para encontrar as seqüências do DNA cromossomal complementar a ela, chamada de DNA alvo. Para visualizar as regiões hibridizadas com sonda, é preciso associar um corante à sonda e um outro corante ao restante dos cromossomos (Brasileiro-Vidal & Guerra, 2002).

A detecção dessas seqüências de DNA tem originado grandes avanços na citogenética de plantas, destacando-se a construção de mapas físicos, a investigação detalhada da estrutura cromossômica, o acompanhamento da quantidade de cromatina introgridida em cruzamentos interespecíficos e a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas. Através da hibridização *in situ*, muitas seqüências de DNA têm sido visualizadas, desde cópias únicas ou com baixo número de cópias até aquelas altamente repetitivas. As primeiras seqüências detectadas foram as de DNA repetitivo, que as unidades de repetição podem estar distribuídas em tandem ou dispersas ao longo do genoma. As seqüências em tandem acontecem em blocos de centenas a milhares de cópias, localizadas em um ou mais sítios de um dado genoma. Essa categoria inclui DNA codificante, como genes para rRNA, e não-codificante, como DNA telomérico, centromérico e outros. A localização desses sítios tem fornecido importantes informações sobre a estrutura e a evolução dos genomas, além de permitir a detecção de alterações cromossômicas estruturais (Brasileiro-Vidal & Guerra, 2002).

Segundo Guerra (1988), essa técnica envolve três etapas principais. Na primeira etapa, o DNA satélite de um indivíduo é isolado e o restante do DNA é colocado num meio contendo timidina tritiada para replicação. O DNA sintetizado é uma cópia perfeita do satélite original que é radioativo. Como o DNA é uma cadeia dupla, após a replicação somente a cadeia recém sintetizada é marcada. A mesma é isolada, para ser utilizada posteriormente como indicador dos locais onde existe DNA satélite. A segunda etapa, consiste na preparação de lâminas com cromossomos do mesmo indivíduo que foi utilizado para a extração do DNA satélite. Ao preparar a lâmina sem corar, os cromossomos são tratados com soluções básicas, ou com temperaturas elevadas, que induzem a separação das duas cadeias de todo o DNA dos

cromossomos. A terceira etapa, consiste na exposição desses cromossomos com as cadeias separadas à solução contendo as cadeias simples de DNA satélite marcado. Esse DNA se parecia com o DNA satélite marcado dos cromossomos com seqüências de nucleotídeos complementares à sua, revelando a localização exata desse tipo de DNA, sendo assim, a heterocromatina constitutiva do cromossomo.

A HIS pode também utilizar como sonda o DNA genômico total de uma espécie, proporcionando a marcação de todos os seus cromossomos. Esse tipo de hibridização é denominado de GISH - Genomic In Situ Hybridization. Neste caso, pode-se distinguir os cromossomos oriundos de diferentes parentais, em híbridos interespecíficos ou em espécies aloploplóides*, bem como em estudos de similaridade genômica (Brasileiro-Vidal & Guerra, 2002). Destaca-se que as bibliotecas de DNA genômico representam uma importante fonte de seqüências para o mapeamento físico, análise estrutural do genoma, genômica comparativa e seqüenciamento do genoma, além de ser uma fonte de seqüências únicas para o mapeamento cromossômico (Hasterok et al., 2006).

As várias abordagens de hibridização *in situ* impostas por muitos laboratórios individuais demonstram a natureza do alvo de amostras a serem analisadas. Todos os protocolos de ensaio, devem levar em conta diversos fatores cruciais, como sua sensibilidade, poder de discriminação, precisão e confiança. As células ou tecidos devem ser pré-tratados de forma que mantenham a morfologia celular, a integridade e a posição do alvo. O tratamento deve tornar as células permeáveis o suficiente, para que seja possível a entrada da sonda do ácido nucléico e a remoção de qualquer sonda não ligada. Devem ser utilizados o tipo de seqüência e o comprimento apropriados de sonda de ácido nucléico (DNA/RNA em fita simples ou dupla), determinando a especificidade e sensibilidade do método. Além do mencionado, o tipo de marcação e o sistema de detecção devem ser cuidadosamente selecionados, pois determinam o grau de sensibilidade, facilidade de detecção e acurácia da quantificação do alvo que podem ser alcançados. Portanto, as condições de hibridização devem ser escolhidas cuidadosamente, de acordo com a natureza da sonda e aplicação desejada (Walker & Rapley, 1999).

Referências Bibliográficas

BERKALOFF, A.; BOURGUET, J.; FAVARD, P.; GUINNEBAULT, M. **Biologia e fisiologia celular**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1975, 287p.

BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

BURNS, G. W. **Genética uma introdução à hereditariedade**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1986, 558p.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula 2001**. São Paulo: Ed. Manole, 2001, 287p.

DRETS, M. Una saga citogenética: el descubrimiento de los métodos de bandedo cromosómico. Significado y proyección bio-médica. **Revista Médica del Uruguay**, v. 18, p. 107-121, 2002.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**. Ribeirão Preto: Ed. Funpec, 2002, 131p.

* Aloploplóide = um poliplóide que tem todos os conjuntos cromossômicos de espécies diferentes (Burns, 1986).

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1988, 142p.

HASTEROK, R.; MARASEK, A.; DONNISON, I. S.; ARMSTEAD, I.; THOMAS, A.; KING, I. P.; WOLNY, E.; IDZIAK, D.; DRAPER, J.; JENKINS, G. Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence in situ hybridization. **Genetics**. v.173, p.349-362, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2000, 352p.

KAVALCO, K. **A citogenética**. Disponível em: <http://www.biociencia.org.com.br> Acesso em 20 de mar. 2004.

MELLO, M. L. S. Nucléolo. In: CARVALHO, H. F; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula 2001**. Campinas: Ed. Manole 2001.p 101-110.

MESQUITA, E. C. **Citologia, histologia e embriologia**. São Paulo: Ed. E.P.U., 1981, 134p. (Coleção: Série Currículo de Estudos de Biologia).

MORAES, A. P. Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus*. 2007. 143 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PAIVA, H. **Núcleo – A central de inteligência da célula**. Disponível em: <http://www.caradebiologia.com.br> Acesso em: 26 de abr. 2005.

PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Molecular Hybridization to radioactive DNA to the DNA of cytological preparations . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 61, p. 600-604, 1969.

ROGATTO, S. R.; RAINHO, C. A. Citogenética molecular. In: ROGATTO, S. R. (Org). **Citogenética sem risco: Biossegurança e garantia de qualidade**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Funpec, 2000. p. 133-152.

SACCHET, A. M. O. F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. O. F. (Org.). **Genética para que te quero?** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p. 99-104.

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999, 334p.



Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: **Leandro Vargas**

Ana Lúcia V. Bonato, José A. Portella, Leila M. Costamilan, Márcia S. Chaves, Maria Imaculada P. M. Lima, Paulo Roberto V. da S. Pereira, Rita Maria A. de Moraes

Expediente

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins

Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; ANDRÉIA CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal:** da era clássica à molecular. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 9 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Disponível em:
<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm>.