



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

THAINÁ FERREIRA SILVA

Hibridização *in situ* por fluorescência: análise histórica, inovações e perspectivas

GOIÂNIA, GO

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Thainá Ferreira Silva

3. Título do trabalho

Hibridização in situ por fluorescência: análise histórica, inovações e perspectivas

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Thannya Nascimento Soares, Professora do Magistério Superior**, em 03/10/2022, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do



art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **THAINA FERREIRA SILVA, Discente**, em 03/10/2022, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3231842** e o código CRC **C4362BE9**.

THAINÁ FERREIRA SILVA

Hibridização *in situ* por fluorescência: análise histórica, inovações e perspectivas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares

Coorientador: Dr. Rafael Barbosa Pinto

GOIÂNIA, GO

Setembro de 2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Thainá Ferreira

Hibridização in situ por fluorescência: análise histórica, inovações e perspectivas [manuscrito] / Thainá Ferreira Silva. - 2022.
vii, 84 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares; co orientador Dr. Rafael Barbosa Pinto.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2022.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas.

1. FISH. 2. citogenética molecular. 3. genética vegetal. 4. revisão sistemática. I. Soares, Thannya Nascimento, orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **108** da sessão de Defesa de Dissertação de **Thainá Ferreira Silva**, que confere o título de Mestre(a) em **Genética e Biologia Molecular**, na área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**.

Ao/s **cinco dias do mês de setembro de dois mil e vinte e dois**, a partir da(s) **08h**, por Webconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**Hibridização in situ por fluorescência: análise histórica, inovações e perspectivas**”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **Thannya Nascimento Soares (ICB/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) **Raquel Moura Machado (INPA)**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **Rhewter Nunes (ICB/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **Thannya Nascimento Soares**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **cinco dias do mês de setembro de dois mil e vinte e dois**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Thannya Nascimento Soares, Professora do Magistério Superior**, em 05/09/2022, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Moura Machado, Usuário Externo**, em 05/09/2022, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **RHEWTER NUNES, Usuário Externo**, em 05/09/2022, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3163712** e o código CRC **13E3E00B**.

Agradecimentos

Agradeço ao apoio financeiro do PRONEM “Identificação de barreiras entre populações e espécies de plantas do Cerrado: uma abordagem integrada” e também o apoio do INCT “Instituto Nacional de Ciência & Tecnologia” em Ecologia, Evolução e Conservação da Biodiversidade (EECBio). Agradeço também a CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos. Vale ressaltar que o apoio financeiro foi fundamental para do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao PPGGBM e à UFG pelo seu corpo docente, administração e toda a estrutura que possibilitaram a realização da minha formação acadêmica, e aos colegas do laboratório pela troca de experiência e conversas durante as reuniões.

Agradeço à Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares pela orientação e toda a paciência no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por aceitar o desafio lá no início de trabalharmos juntas, ainda mais sobre citogenética, e por sempre me ajudar, principalmente nesses dois anos que incluíram os desafios dessa pandemia. Agradeço também ao coorientador Dr. Rafael Barbosa Pinto pelo apoio, conversas e ideias que me ajudaram ao longo desse estudo.

Às pessoas especiais que perpassaram durante minha vida, meus queridos amigos, que me ajudaram muito durante esses anos, através de conversas, troca de experiência, apoio emocional e psicológico, ideias novas que contribuíram para esta pesquisa. Sou grata por tê-los em minha vida.

Agradeço à minha família, especialmente minha mãe, pelo amor e apoio incondicional, desde minha trajetória da infância, as turbulências da adolescência, até os sonhos realizados recentemente. Todas essas conquistas são por causa de vocês e por vocês.

Sumário

| | |
|---|----|
| Resumo | iv |
| Abstract | vi |
| Introdução Geral | 8 |
| | |
| Capítulo 1 – Versatilidade da hibridização <i>in situ</i> por fluorescência - FISH | 12 |
| Resumo | 13 |
| Cromossomos, DNA e a FISH | 14 |
| Quais tipos de materiais biológicos podem ser utilizados para FISH | 16 |
| Obtenção das sondas de FISH | 18 |
| Tipos de sondas e as variações da FISH | 22 |
| Sondas <i>locus-específicas</i> | 22 |
| Sondas de DNA repetitivo | 23 |
| Sondas de pintura cromossômica | 25 |
| Sondas de genoma inteiro | 27 |
| Sondas baseadas em oligonucleotídeos sintéticos | 28 |
| Impactos da FISH para a saúde e a segurança alimentar | 30 |
| aCGH como método de diagnóstico em humanos | 30 |
| GISH no melhoramento vegetal | 32 |
| Considerações Finais | 35 |
| Glossário | 35 |
| Para saber mais | 37 |
| | |
| Capítulo 2 - Panorama geral da técnica FISH em plantas com ênfase às questões evolutivas | 38 |
| Resumo | 39 |
| Introdução | 41 |
| Material e Métodos | 43 |
| Resultados | 47 |
| <i>Análise temporal e principais países que publicaram artigos com a técnica de FISH em plantas</i> | 47 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Classificação dos artigos por famílias botânicas</i> | 50 |
| <i>Variações da FISH, tipos de sondas e marcações utilizadas nos artigos</i> | 51 |
| <i>Tipos de estudos realizados com a técnica de FISH em plantas</i> | 53 |
| <i>Quais questões evolutivas em plantas a técnica FISH pode ajudar a responder?</i> | 55 |
| Discussão..... | 58 |
| Conclusões | 67 |
| Agradecimentos..... | 69 |
| Referências | 70 |
| Material suplementar..... | 76 |
| Considerações Finais | 77 |
| Referências | 78 |

Resumo

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica de citogenética molecular que se baseia no uso de sondas marcadas com fluorescência para a identificação de diferentes regiões no genoma. A partir do aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas tecnologias, variações da técnica original surgiram tornando possível aplicá-la para diversas questões, desde identificar cromossomos através da citogenética descritiva até realizar inferências evolutivas ou conduzir pesquisas aplicadas de biotecnologia e melhoramento genético. Considerando a grande possibilidade de aplicações da técnica de FISH e suas variações, o presente trabalho tem como objetivo detalhar os princípios metodológicos e aplicações, com ênfase nas plantas, e investigar seu uso em estudos evolutivos. Para isso, o primeiro capítulo é um manuscrito de divulgação e popularização da ciência que tem como objetivo discutir as diversas possibilidades de uso da técnica FISH, abrangendo desde os seus princípios metodológicos até as aplicações em diferentes áreas. A partir desse estudo foi verificado que a FISH pode ser aplicada em diferentes materiais biológicos e regiões do genoma e, apesar de ser uma técnica desenvolvida há mais de três décadas, pode gerar impactos e contribuições através da sua vasta utilização até os dias de hoje. Já o segundo capítulo é uma revisão sistemática, cujo objetivo principal é sumarizar e analisar de forma crítica os dados disponíveis na literatura sobre as aplicações da FISH para o estudo citogenético em plantas, além de detalhar e discutir as aplicações dessa técnica para estudos evolutivos em plantas. Este estudo foi conduzido utilizando as diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). A busca foi realizada na base de dados *Scopus* e as palavras-chave foram direcionadas para capturar a amplitude da utilização da técnica FISH voltada para o estudo citogenético das plantas. Com o objetivo de investigar as aplicações dessa técnica, os artigos encontrados foram agrupados em diferentes categorias, denominados

como “Biotecnologia vegetal”, “Estudos evolutivos”, “Descritivo”, “Técnicas/metodológico” e “Expressão gênica”. Foram selecionados 4006 artigos que apresentaram uma tendência de crescimento de número de publicações entre os anos 1975 – 2020. A China e os EUA concentraram a maior quantidade de artigos e o Brasil se encontrou na 8ª posição. A análise das palavras-chave mais utilizadas nos artigos possibilitou traçar um pequeno histórico da técnica, abrangendo desde o início da marcação indireta em espécies de plantas, perpassando pelos avanços da FISH e suas variações, até a utilização de sondas oligo-sintéticas nos dias atuais. As categorias “Biotecnologia vegetal” e “Estudos evolutivos” representaram mais de 60% do total de trabalhos, com destaque para o uso das técnicas GISH e FISH com sondas de DNA repetitivo e da marcação indireta. A família Poaceae se destacou nos estudos de “Biotecnologia vegetal” e Leguminosae e Asteraceae se encontraram majoritariamente na categoria de “Estudos evolutivos”. Os 1.197 artigos classificados como “Estudos evolutivos” trataram questões evolutivas principalmente relacionadas à “Evolução do genoma”, “Citogenética comparativa” e “Sistemática e citotaxonomia”. Sendo assim, o entendimento da técnica, a síntese e mensuração de dados e o traçado evolutivo elaborado neste estudo possibilitaram o embasamento teórico a cerca da versatilidade da técnica e da sua utilização nos dias atuais. Também permitiu demonstrar as principais contribuições da FISH direcionada aos estudos com plantas, evidenciando as regiões de concentração de pesquisa, variações da técnica, principais tipos de estudos e famílias botânicas, assim como, contribuiu para responder a diferentes questões evolutivas.

Palavras-chave: FISH; citogenética molecular; genética vegetal; revisão sistemática

Abstract

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is a molecular cytogenetic technique that is based on the use of fluorescence-labeled probes to identify different regions in the genome. From the improvement and development of new technologies, variations of the original technique emerged making it possible to apply it to various issues, from identifying chromosomes through descriptive cytogenetics to making evolutionary inferences or conducting applied research in biotechnology and genetic improvement. Considering the great possibility of applications of the FISH technique and its variations, the present work aims to detail the methodological principles and applications, with emphasis on plants, and to investigate its use in evolutionary studies. For this, the first chapter is a manuscript for the dissemination and popularization of science that aims to discuss the various possibilities of using the FISH technique, ranging from its methodological principles to applications in different areas. From this study, it was verified that FISH can be applied to different biological materials and regions of the genome and, despite being a technique developed for more than three decades, it can generate impacts and contributions through its wide use until today. The second chapter is a systematic review, whose main objective is to summarize and critically analyze the data available in the literature on the applications of FISH for the cytogenetic study in plants, in addition to detailing and discussing the applications of this technique for evolutionary studies in plants. This study was conducted using the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines. The search was carried out in the Scopus database and the keywords were directed to capture the breadth of the use of the FISH technique aimed at the cytogenetic study of plants. In order to investigate the applications of this technique, the articles found were grouped into different categories, called “Plant Biotechnology”, “Evolutionary Studies”, “Descriptive”, “Techniques/Methodological” and “Gene Expression”. A total of 4006 articles were selected that showed a trend of growth in the

number of publications between the years 1975 - 2020. China and the USA concentrated the largest number of articles and Brazil was in 8th position. The analysis of the most used keywords in the articles made it possible to trace a small history of the technique, ranging from the beginning of indirect labeling in plant species, passing through the advances of FISH and its variations, to the use of oligo-synthetic probes today. The categories “Plant Biotechnology” and “Evolutionary Studies” represented more than 60% of the total works, with emphasis on the use of GISH and FISH techniques with repetitive DNA probes and indirect labeling. The Poaceae family stood out in the studies of "Plant Biotechnology" and Leguminosae and Asteraceae were mostly found in the category of "Evolutionary Studies"; “Comparative analysis” and “Systems and cytotaxonomy.” Thus, the understanding of the technique, the synthesis and measurement of data and the evolutionary path elaborated in this study allowed the theoretical basis about the versatility of the technique and its use today. demonstrate the main contributions of FISH directed to studies with plants, highlighting the regions of research concentration, variations of the technique, main types of studies and botanical families, as well as contributing to answering different evolutionary questions.

Keywords: FISH; molecular cytogenetics; plant genetics; systematic review

Introdução Geral

O estudo dos cromossomos, abrangendo sua estrutura, organização, função e comportamento patológico, é realizado através da citogenética, ciência que reúne a citologia e a genética. A citogenética molecular permitiu superar as limitações da citogenética clássica, relacionadas à baixa resolução e incluir a possibilidade do estudo do material genético em diferentes níveis de condensação, desde o nível de fibras de cromatina e interfase até a fase de metáfase (LIEHR, 2021). A Citogenética Molecular aliada aos avanços da bioinformática, microscopia, análises de imagens (BHAT; WANI, 2017), aperfeiçoamento de técnicas como a da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de nova geração (NGS), como também através dos avanços no campo do design de sondas e estratégias de marcação, se tornou mais específica e capaz de ser aplicada em diversas áreas do conhecimento (HUBER; VOITH VON VOITHENBERG; KAIGALA, 2018).

A partir do crescente desenvolvimento da citogenética molecular foi desenvolvida a técnica denominada Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH, sigla em inglês de *Fluorescence In Situ Hybridization*), que se baseia no uso de sondas marcadas com fluorescência para a identificação de regiões específicas (alvos) no genoma, ou seja, essas sondas, que são sequências conhecidas de material genético (DNA), são ligadas ao alvo, de forma complementar, a partir da capacidade de desnaturação e hibridização do material genético (LIEHR, 2016). A FISH é aplicada em diversos tipos de materiais biológicos (linfócitos de sangue periférico, tecidos de plantas, células germinativas) e em diferentes regiões do genoma dependendo do tipo de sonda/alvo escolhido. As sondas podem ser de DNA repetitivo, *Locus*-específicas, de genoma inteiro, pintura cromossômica (BHAT; WANI, 2017; LIEHR, 2016).

A disponibilidade de técnicas utilizadas para a marcação das sondas e o desenvolvimento de novos softwares que possibilitam novos designs de sondas contribuiu para o aumento da sensibilidade e especificidade da FISH (HUBER; VOITH VON VOITHENBERG; KAIGALA, 2018). A partir disso, diversas aplicações em diferentes tipos de organismos estão sendo realizadas. Um dos exemplos são os mapeamentos citogenéticos comparativos para estudos evolutivos e a possibilidade de identificação de novas sequências em espécies não modelo. Permite também obter genes de interesse (ex. de resistência a patógenos) como contribuição para o melhoramento vegetal, assim como é possível observar alterações estruturais (inversões, translocações, duplicações, deleções) e/ou numéricas, que podem estar relacionadas a determinadas alterações clínicas (BHAT; WANI, 2017), como também relacionadas a diferentes estudos, como estudos evolutivos e descritivos, com animais e vegetais.

A técnica FISH é muito utilizada para gerar informações complementares e substanciais em relação aos processos e/ou mecanismos que levam a evolução dos conjuntos cromossômicos das espécies vegetais (RUPRECHT et al., 2017), realizar mapeamentos citogenéticos comparativos (BIELSKI et al., 2020), contribuir para análise filogenética (JIANG; GILL, 2006), entre outras atribuições. As diferentes aplicações na citogenética vegetal devido a essa técnica teve seu início por volta de 1985, em um estudo que utilizou sondas de DNA marcadas em cromossomos de trigo (RAYBURN; GILL, 1985, 1986). Houve também a hibridização *in situ* simultânea de duas sondas fluorescentes em *Secale cereale* L. cv. Petkus Spring (LEITCH; LEITCH; HESLOP-HARRISON, 1991), de sequências de DNA repetitivo em espécies de Triticeae (ANAMTHAWAT-JÓNSSON; HESLOP-HARRISON, 1993; JIANG; GILL, 1994) e em *Brassicaceae* (MALUSZYNSKA, J.; HESLOP-HARRISON, 1991). Para que fosse possível detectar cromossomos de plantas hibridizadas,

segmentos do genoma transferidos de uma espécie para outra e determinar a constituição cromossômica e inferir relações entre genótipos (CORRÊA et al., 2020), em 1989, foi proposta a técnica de Hibridização Genômica *in situ* (GISH, sigla em inglês de *Genomic In Situ Hybridization*), utilizando o genoma total como sonda (SCHWARZACHER et al., 1989). Desde seu desenvolvimento, a técnica GISH é uma das mais utilizadas na citogenética vegetal.

A revisão sistemática é uma ferramenta de estudo que envolve um plano detalhado para reunir todas as evidências empíricas que se encaixam em critérios determinados para responder a uma questão de pesquisa específica, buscando uma sistematização dos métodos, abordagens, áreas etc. (UMAN, 2011). Em consequência da vasta aplicação da FISH, a revisão sistemática permite mensurar e sintetizar a imensidão de dados que são gerados constantemente, podendo assim, direcionar novas pesquisas, tecnologias e investimentos em áreas ainda pouco estudadas. As etapas essenciais para o desenvolvimento das revisões sistemáticas são: formular a pergunta, desenvolver estratégias de busca, definir critérios de inclusão e exclusão dos artigos, avaliação, análise dos dados, interpretação e divulgação (UMAN, 2011). Uma das plataformas mais utilizadas para direcionar as etapas a serem realizadas é a *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), que apresenta um conjunto de itens, baseado em evidências, para relato em revisões sistemáticas e meta-análises (MOHER et al., 2009). O PRISMA busca reportar os efeitos das intervenções adotadas em cada etapa empregada para a realização do estudo, como por exemplo, número de artigos filtrados a partir de palavras-chave e duplicatas.

Diante disso, os objetivos deste estudo foram: permitir o amplo entendimento da FISH e discutir as diversas possibilidades de uso dessa técnica, abrangendo desde os seus princípios metodológicos até as aplicações em diferentes áreas; Sumarizar e analisar de forma crítica os

dados disponíveis na literatura sobre as aplicações da técnica FISH para o estudo citogenético em plantas, além de detalhar e discutir quais são os tipos de perguntas/questões evolutivas que podem ser respondidas pelo uso da FISH em plantas.

Capítulo 1

VERSATILIDADE DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA - FISH

Manuscrito a ser submetido à publicação na revista *Genética na Escola*

Seção: *Genética e Sociedade*

Thainá Ferreira Silva

Ana Flávia Lopes Morais

Nádia Aparecida Bérghamo

Rafael Barbosa Pinto

Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito

Thannya Nascimento Soares

Thainá Ferreira Silva, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: thaina.ferreira@discente.ufg.br. Ana Flávia Lopes Morais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: morais.anaflavia1996@gmail.com. Nádia Aparecida Bérghamo, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: nabergamo@ufg.br. Rafael Barbosa Pinto, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: rafaelbpinto@gmail.com. Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: cincintia@ufg.br. Thannya Nascimento Soares, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: tnsoares@ufg.br

Resumo

O estudo dos cromossomos, abrangendo sua função, estrutura e comportamento patológico, é realizado através da citogenética, ciência que reúne a citologia e a genética. A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica da citogenética molecular que tem como princípio básico a identificação de sequências-alvo do genoma a partir da hibridização com sondas específicas. O avanço das técnicas de biologia molecular que permitem o acesso do DNA de diferentes tipos de material biológico, aliado aos avanços da genômica, proporcionou o surgimento de novas variações da técnica original. Sendo assim, é possível localizar genes, regiões repetitivas do genoma, alterações cromossômicas estruturais e numéricas e mapear genes. A partir dessas aplicações é possível realizar inferências evolutivas, atrelar com a biotecnologia e melhoramento genético e ainda, contribuir para os avanços nos diagnósticos na área da saúde. O presente trabalho discute as diversas possibilidades de uso dessa técnica, abrangendo desde os seus princípios metodológicos até as aplicações da FISH em diferentes áreas.

Cromossomos, DNA e a FISH

Os cromossomos (*chroma*: cor; *soma*: corpo) são estruturas organizadas de uma célula que contém o material genético (DNA) de forma condensada. Em procariotos, esse material genético está organizado em uma única molécula circular chamada de cromossomo bacteriano, localizado no nucleóide da célula que não é delimitado por um envoltório nuclear. Já nos eucariotos, a maior parte do DNA do genoma é encontrada no núcleo das células de forma linear e que é possível de ser observado durante as etapas do ciclo celular em que os cromossomos estão mais condensados. Neste caso, os cromossomos são formados durante os processos de divisão celular, meiose ou mitose, que ocorrem nas células gaméticas e nas células somáticas, respectivamente.

Durante a divisão celular, a subdivisão de maior grau de condensação cromossômica é denominada metáfase, na qual os cromossomos são mais facilmente visualizados em microscópio. É nessa etapa que normalmente ocorrem o estudo dos cromossomos, abrangendo sua organização, morfologia, função e comportamento patológico, ciência definida como citogenética. As análises citogenéticas clássicas se baseiam em técnicas de coloração que atuam no destaque de regiões específicas dos cromossomos dependendo da escolha do corante e da associação com outros reagentes, podendo formar padrões de bandas distintas, promovendo assim análises estruturais e numéricas dos cromossomos metafásicos. Entretanto, há uma limitação quanto a resolução da análise, sendo possível a observação no nível de banda cromossômica que contém cerca de 5-10 megabases (o que equivale a 5-10.000.000 pares de bases) de DNA, dificultando análises mais detalhadas.

Para refinar essas análises a citogenética molecular se apresentou como uma complementação da citogenética clássica e possibilitou analisar diferentes amostras biológicas e diferentes regiões do genoma e, a partir disso, foi possível identificar de forma molecular

genes, pontos de quebra, duplicações e deleções, dentre outras regiões que demandam maior especificidade. Também foi possível analisar o material genético durante a intérfase, além de apenas na metáfase, conforme os protocolos clássicos. Nesse contexto, em meados da década de 1970 foi desenvolvida a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), que se baseia no uso de sondas para a identificação de regiões específicas (alvos) no genoma e na visualização desses alvos pelo uso de rótulos de fluorocromos com espectros de detecção luminosa distintos para cada sonda.

A técnica de FISH se desenvolveu a partir de duas propriedades básicas do DNA que são: a capacidade de desnaturação e de hibridização (Figura 1). O processo de desnaturação da fita dupla do DNA consiste na separação das duas fitas da molécula, por meio da dissociação da ligação de hidrogênio entre as bases nitrogenadas (A::T; C::G). A partir disto, é possível a hibridização de um fragmento de DNA (sonda) contendo uma sequência complementar à região alvo do DNA em estudo. A hibridização ocorre devido à propriedade que o material genético tem de se renaturar, ou seja, realizar o pareamento entre as bases da região alvo e da sonda, que faz com que a estrutura da molécula de dupla fita seja restabelecida.

A FISH é uma técnica da citogenética molecular aplicada diretamente ao DNA, sendo assim, diversos tipos de materiais biológicos podem ser utilizados para a sua aplicação, tais como linfócitos colhidos por meio de sangue periférico, tecidos de plantas com alto índice mitótico, células germinativas, entre outras partes dos organismos que apresentam células com alta frequência de divisão celular. Além disso, a FISH pode ser aplicada em diferentes regiões do genoma, a depender do tipo de sonda/alvo escolhido. Nesse sentido, podem ser realizados estudos com detecção de sequências codificantes e/ou não-codificantes, como genes e sequências de baixa cópia em *locus*-específicos, DNA repetitivo (famílias

multigênicas; repetições em tandem, como DNAs satélite (satDNA), minissatélites e microssatélites; sequências que apresentam repetições dispersas ao longo do genoma, como transposons e retrotransposons), assim como regiões maiores ou até mesmo um cromossomo inteiro utilizando um conjunto de sondas. Diante deste fato, é possível observar que o que promove essa versatilidade da FISH é a possibilidade de se trabalhar diretamente com o DNA, independente do organismo.

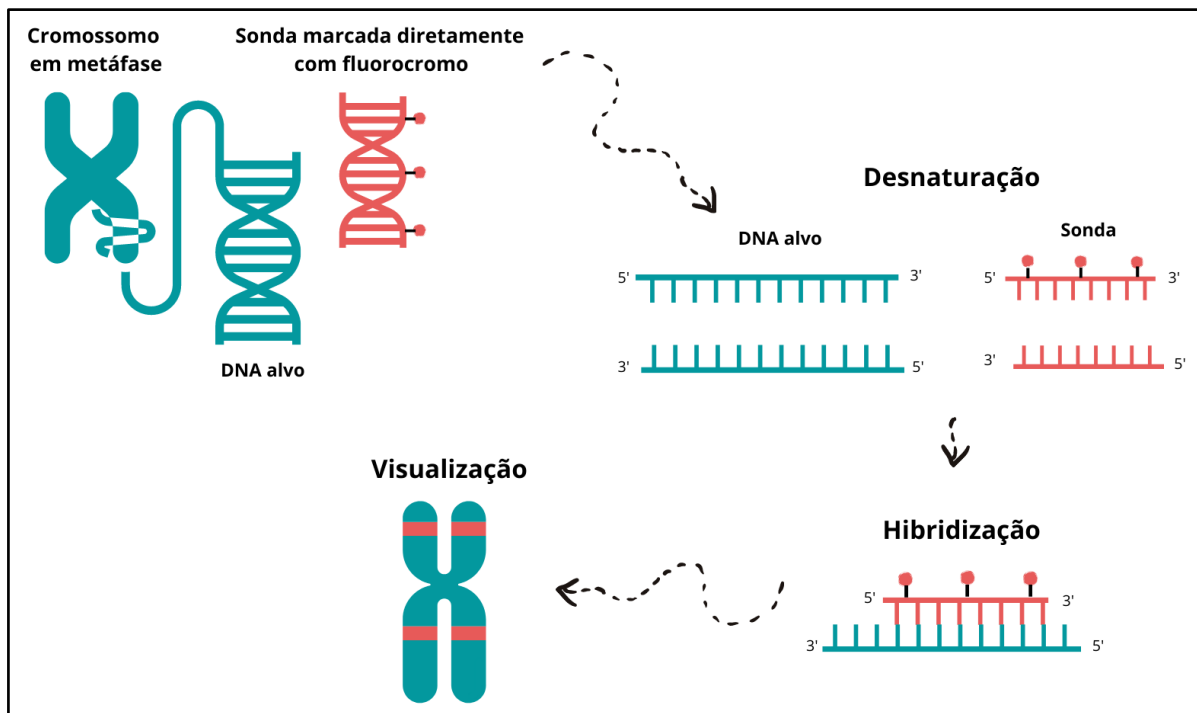


Figura 1. Processo de desnaturalização e posterior hibridização do DNA alvo e da sonda marcada com fluorocromo.

Quais tipos de materiais biológicos podem ser utilizados para FISH?

Para a realização da FISH são necessários alguns itens como o material biológico, sondas, reagentes e equipamentos. Resumidamente, o material biológico precisa ser fixado em lâminas e as sondas precisam ser marcadas e serem complementares à região desse material que se deseja estudar. Reagentes e equipamentos, que são necessários para o tratamento e fixação do material biológico na lâmina de microscopia, precisam ser ajustados para

desnaturação e hibridização e para lavagens pós-hibridização e também para as análises em microscópio fluorescente.

Como a FISH possibilita a análise do genoma de diferentes organismos, para responder a diferentes objetivos, há a necessidade de acessar o material genético a partir de diferentes abordagens. Para estudos em humanos, é possível acessar células para o diagnóstico pré-natal, como amniócitos e células de vilosidades coriônicas, células para exames de rotina de sangue periférico como linfócitos e células para diagnóstico de doenças como o câncer como linfócitos de medula óssea e células de tumores sólidos.

Sabe-se também que a FISH possibilita a visualização de células interfásicas e, assim, permite a avaliação de núcleos interfásicos de preparações não cultivadas, culminando em uma triagem rápida para o diagnóstico pré-natal, estudos de recém-nascidos ou para estudos de câncer. Pode-se também analisar células meióticas, como espermatozoides para estudos de infertilidade, aneuploidias, padrões de segregação de rearranjos cromossômicos, como também oócitos para análise de alterações cromossômicas de origem materna.

Em estudos com diferentes organismos animais, o acesso aos cromossomos é possível a partir de diferentes tecidos. Para peixes, por exemplo, os cromossomos mitóticos podem ser obtidos a partir de tecidos de diferentes órgãos, como rim, baço e brânquias, e cromossomos meióticos a partir de tecidos gonadais. Há também a possibilidade de se analisar cromossomos gigantes lampbrush (LBCs), conhecidos também como plumosos. Esses cromossomos são encontrados nos oócitos em desenvolvimento, típicos do estágio diplóteno da prófase I da meiose de alguns grupos de animais, como anfíbios e aves, e possibilitam uma investigação dos processos nucleares celulares (como transcrição e regulação gênica) e mapeamento físico de alta resolução. Já cromossomos politênicos podem ser obtidos de glândulas salivares de *Drosophila melanogaster*.

Na citogenética vegetal, tratamentos de tecidos com alto índice mitótico são comumente realizados para obter cromossomos em diferentes subdivisões da fase de mitose do ciclo celular, possibilitando a análise de células metafásicas que são prioridade nos estudos, mesmo apresentando limitações quanto a obtenção de cromossomos íntegros para uma boa análise. Desta forma, análises de células interfásicas também são realizadas. Sabendo disso, as análises de FISH são realizadas em preparações de pontas de raízes mitóticas de plantas jovens e células-mãe dos grãos de pólen na meiose, como também podem ser utilizados cromossomos mitóticos de brotos, botões e espigas jovens. As raízes também podem ser retiradas de plantas adultas, desde que seja estimulado a produção de raízes jovens com regiões meristemáticas claras.

Obtenção das sondas de FISH

A escolha da sonda reflete diretamente em quais perguntas o pesquisador tem o intuito de responder. Para acessar a região ou regiões genômicas de interesse, é necessário a confecção de sondas complementares às mesmas. Porém, as estratégias de desenvolvimento das sondas vão variar conforme a disponibilidade de informações sobre o genoma da espécie de interesse e da disponibilidade do material. Dentre as opções é possível realizar técnicas de microdissecção cromossômica que possibilita o isolamento de cromossomos ou regiões de interesse diretamente de placas metafásicas por meio da micromanipulação. Pode-se realizar o isolamento da região de interesse por meio de clonagem utilizando diferentes vetores. A escolha do vetor depende do tamanho da região de interesse podendo ser desde plasmídeos (transportam de 5 a 25 kb) até vetores maiores como cromossomos artificiais de leveduras (YAC, transportam de 150-350 kb), cromossomos artificiais bacterianos (BAC, transportam de 80 kb a 1 Mb), bacteriófago P-1 (PAC, transportam de 100-300 kb).

Para espécies que tenham o genoma total ou parcial sequenciado é possível identificar regiões alvo e desenvolver sondas a partir do desenho de primers (iniciadores) e amplificação das sondas de interesse por Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* - PCR). Por último, existem também as sondas comerciais, para as quais a maioria disponível se concentra no estudo em humanos e são voltadas tanto para pesquisa básica quanto para diversas aplicações na medicina.

Para a aplicação da técnica de FISH, as sondas desenvolvidas devem ser marcadas com fluoróforos para que seja possível a visualização da região alvo. A marcação da sonda pode ser realizada de forma direta ou indireta. Na marcação direta, os fluorocromos estão ligados diretamente a um dos quatro nucleotídeos de DNA da sonda (Figura 2 - primeira coluna). Já na marcação indireta, são utilizados nucleotídeos acoplados a uma molécula marcadora denominada hapteno (Figura 2 – segunda coluna). Sendo assim, uma etapa a mais é necessária para que ocorra a detecção desse hapteno, normalmente utilizando técnicas de imuno-histoquímica (Figura 2E) ou por detecção enzimática.

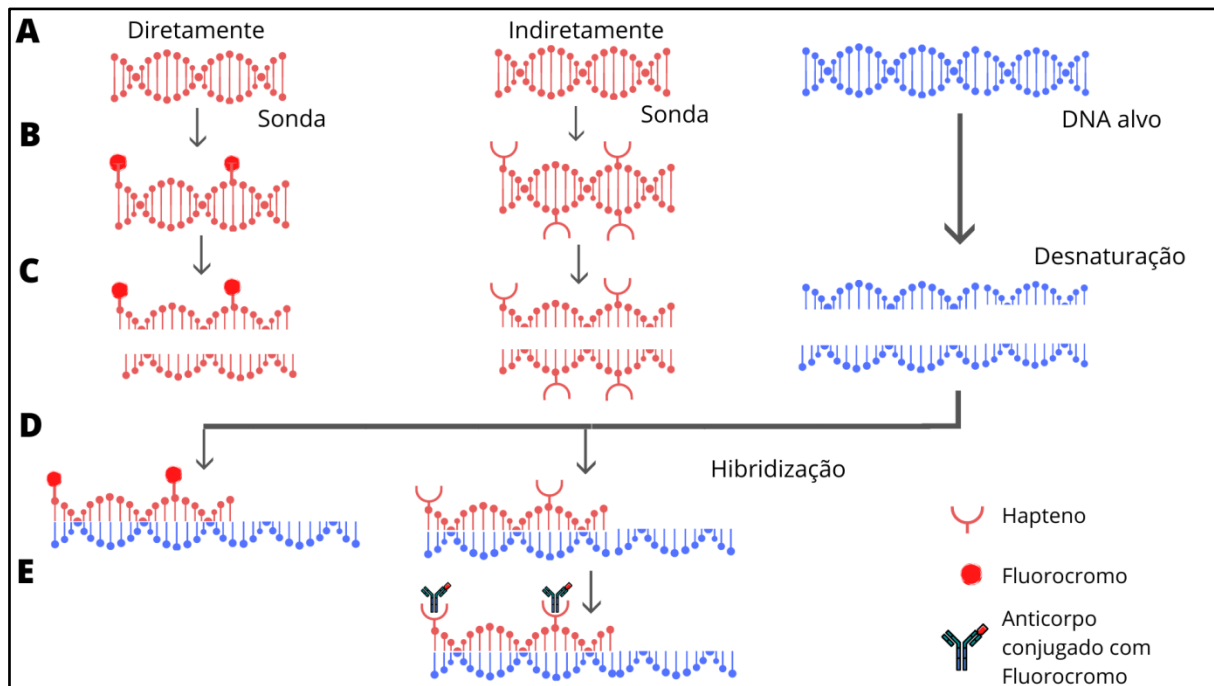


Figura 2. Marcação direta e indireta da FISH. A) Elementos básicos: sonda e DNA alvo. B) Sonda de DNA é marcada por meio da incorporação de um fluorocromo ou hapteno. C) As sondas marcadas e o DNA alvo são desnaturados para formarem fita simples. D) Hibridização, ou seja, anelamento da sonda com o DNA alvo de forma complementar. E) Se a sonda foi marcada indiretamente, uma etapa extra é necessária para a visualização do hapteno, no qual o anticorpo conjugado com a molécula fluorescente é ligado a esse hapteno garantindo a sua detecção.

Uma das técnicas para a marcação tanto direta quanto indireta das sondas é a técnica enzimática de *Nick translation*, desenvolvida em 1977 por Peter Rigby e Paul Berg. A técnica *Nick translation* (Figura 3) é assim denominada pois o DNA a ser processado é tratado com a enzima de restrição DNase I para produzir "nicks", ou seja, cortes no filamento de DNA. Desta forma, em sítios aleatórios são gerados uma hidroxila na extremidade 3' (3'-OH) e um fosfato na extremidade 5' (5'-P). Em seguida, a enzima DNA polimerase I remove nucleotídeos da região 5'-P terminal gerada pela clivagem (atividade de exonuclease) (Figura 3C), enquanto substitui por precursores desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) marcados e não marcados, ao terminal 3'-OH (atividade de polimerase 5'→3') (Figura 3D e 3E). Na reação, são disponibilizados nucleotídeos, sendo quatro desoxinucleotídeos trifosfatos não marcados (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) e mais um marcado (dUTP ou dATP). A

disponibilidade dos nucleotídeos marcados deve ser mais alta do que dos não marcados, ou seja, se o dUTP estiver marcado, sua concentração não marcada deve ser menor, de modo a compensar sua menor acessibilidade pela DNA-polimerase.

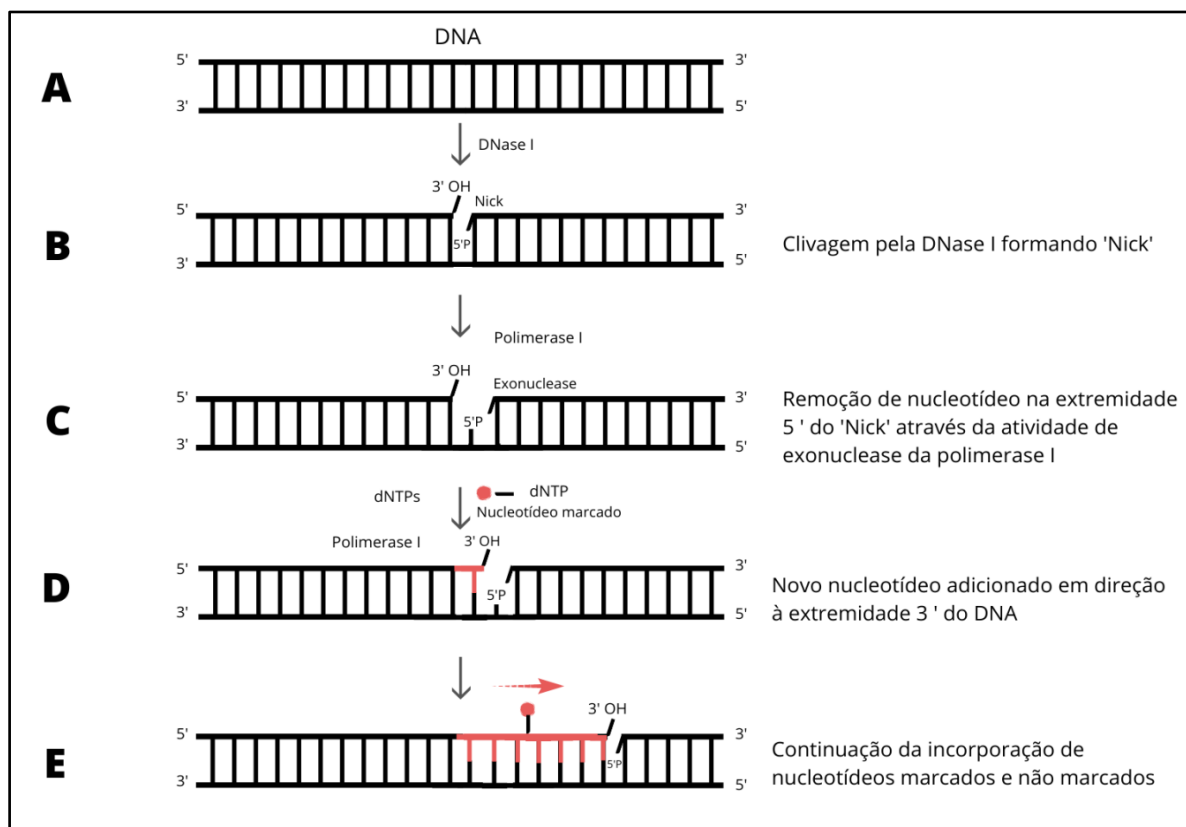


Figura 3. Marcação por *Nick translation*. A clivagem do DNA pela DNase I forma 'Nicks', permitindo a remoção de nucleotídeos na extremidade 5' do Nick e adição em direção à extremidade 3' do DNA, possibilitando a inserção de nucleotídeos marcados e não marcados.

Outra opção para a marcação das sondas é por amplificação via PCR. Para essa amplificação são necessários primers que anelam no início e no fim da sequência alvo e que permitem que a enzima polimerase incorpore nucleotídeos marcados e não marcados ao produto amplificado e produza as sondas. Existe a possibilidade também dos próprios primers estarem marcados, retirando a necessidade da polimerização com os precursores de nucleotídeos marcados. Devido a essas simplificações, essa técnica como forma de rotular as sondas é considerada versátil, rápida, eficiente e é amplamente utilizada nos laboratórios.

Tipos de sondas e as variações da FISH

Sondas *locus*-específicas

As sondas *locus*-específicas permitem o mapeamento citogenético de regiões particulares do genoma. Dessa forma, podem ser utilizadas em estudos comparativos, determinam pontos de quebra e alterações estruturais e localizam genes específicos já que têm como alvo sequências presentes em apenas uma cópia em um cromossomo. Sabe-se que para o diagnóstico de síndromes de microdeleções conhecidas e mais frequentes existem sondas comerciais disponíveis.

Dentre os diversos exemplos de aplicação das sondas *locus*-específicas pode-se citar a Leucemia Mielóide Crônica que apresenta um cromossomo Philadelphia (Ph) formado a partir da translocação entre os cromossomos 9 e 22, ou seja, parte do braço longo (q) do cromossomo 9 vai para o 22 e parte do braço longo (q) do 22 passa para o 9, dando origem a um cromossomo 22 que é mais curto que o normal. Este cromossomo mais curto é denominado como Philadelphia e apresenta a fusão entre os genes BCR (originado do cromossomo 22) e ABL (originado do cromossomo 9), formando o oncogene que produz a proteína BCR-ABL, denominada tirosina quinase, induzindo ao crescimento celular fora do controle. Utilizando sondas de dupla-fusão é possível observar um sinal correspondente ao ABL (vermelho) e um correspondente ao BCR (verde) que se encontram juntos na fusão dos genes BCR-ABL (amarelo) no cromossomo 22, e um outro sinal amarelo no cromossomo 9 devido à sinais extras tanto do 9q quanto do 22q, e por fim, um sinal vermelho e um verde nos cromossomos sem alteração 9 e 22, respectivamente (Figura 4).

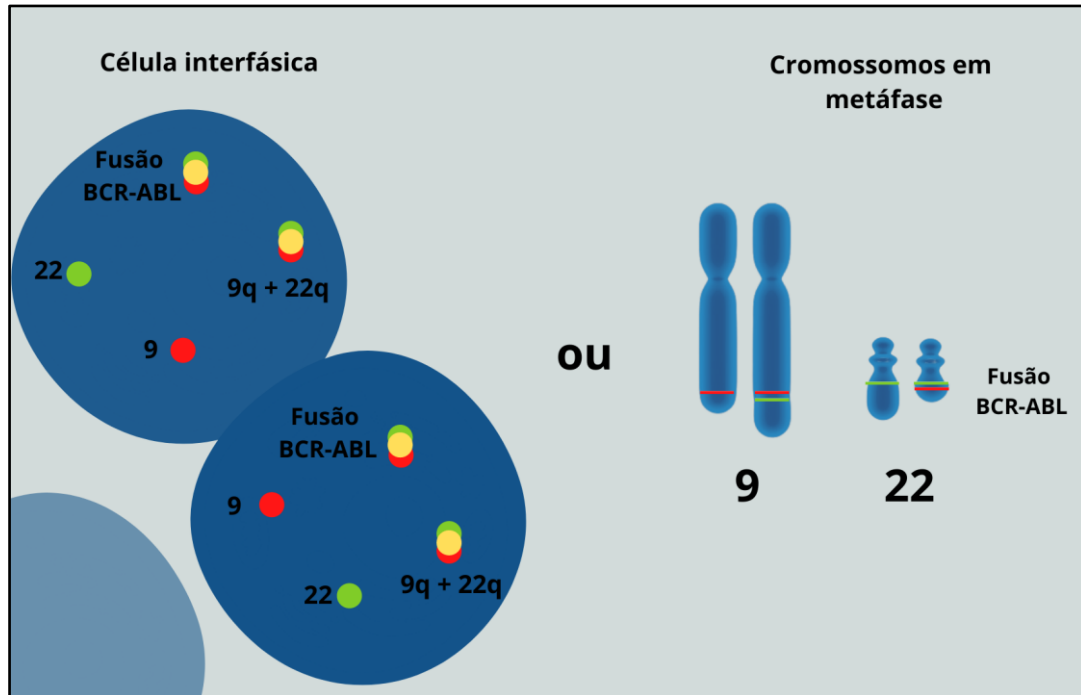


Figura 4. Sinal da FISH usando sondas para pontos de interrupção 9q34.12 (vermelho) e 22q11.21 (verde), mostrando uma fusão BCR-ABL (amarelo) originado da união desses pontos, um sinal extra dos segmentos 9q e 22q (amarelo), e sinais nos cromossomos não alterados 9 (vermelho) e 22 (verde), em células interfásicas (lado esquerdo) e metafásicas (lado direito).

Sondas de DNA repetitivo

Os genomas dos eucariotos contêm uma quantidade significativa de DNA repetitivo, como famílias gênicas, DNA repetitivos em tandem e DNA repetitivo dispersos no genoma. Dentre os tipos de DNA repetitivo, o DNA satélite (satDNA) é bastante utilizado em estudos citogenéticos com FISH. O satDNA é normalmente localizado em regiões heterocromáticas (regiões centroméricas e subteloiméricas), já os microssatélites e minissatélites podem estar dispostos ao longo do genoma. O DNA alfa-satélite está presente nos centrômeros e pode ser utilizado como sonda centromérica. Cada centrômero apresenta uma sequência repetida em tandem que diverge se comparado aos centrômeros de outros cromossomos, possibilitando que seja desenvolvido sondas específicas para cada cromossomo.

Um exemplo do uso de DNAs satélites é o estudo realizado em 2021 por Ferro e colaboradores, no qual estudaram citogeneticamente quatro espécies do grupo de anfíbios *Physalaemus gracilis*: *P. carrizorum*, *P. gracilis*, *P. lisei*, e uma espécie do Uruguai referida como *Physalaemus* sp. (aff. *gracilis*). Neste trabalho, foram realizados bandeamentos Ag-NORs e bandas C, e a localização cromossômica da sequência repetitiva Pcp190 satDNA, discutindo hipóteses taxonômicas e filogenéticas. O DNA satélite foi encontrado em posições centroméricas e pericentroméricas coincidentes com bandas C, nos pares 2 e 9 em *P. gracilis* e *Physalaemus* sp. (aff. *gracilis*), par 3 em *P. carrizorum* e par 7 em *P. lisei*. A ocorrência desta sequência repetitiva no par 3 também foi encontrada em 7 das 11 espécies já estudadas do gênero e em 6 das 8 espécies estudadas em *Engystomops*, e pode ser considerado um marcador informativo promissor para estabelecer a homeologia entre esses gêneros. Esses dados contribuem com informações para a citogenética deste grupo e incentivam mais estudos sobre essa região em outros gêneros para estabelecer melhores os processos envolvidos na evolução cromossômica desse grupo (Figura 5).

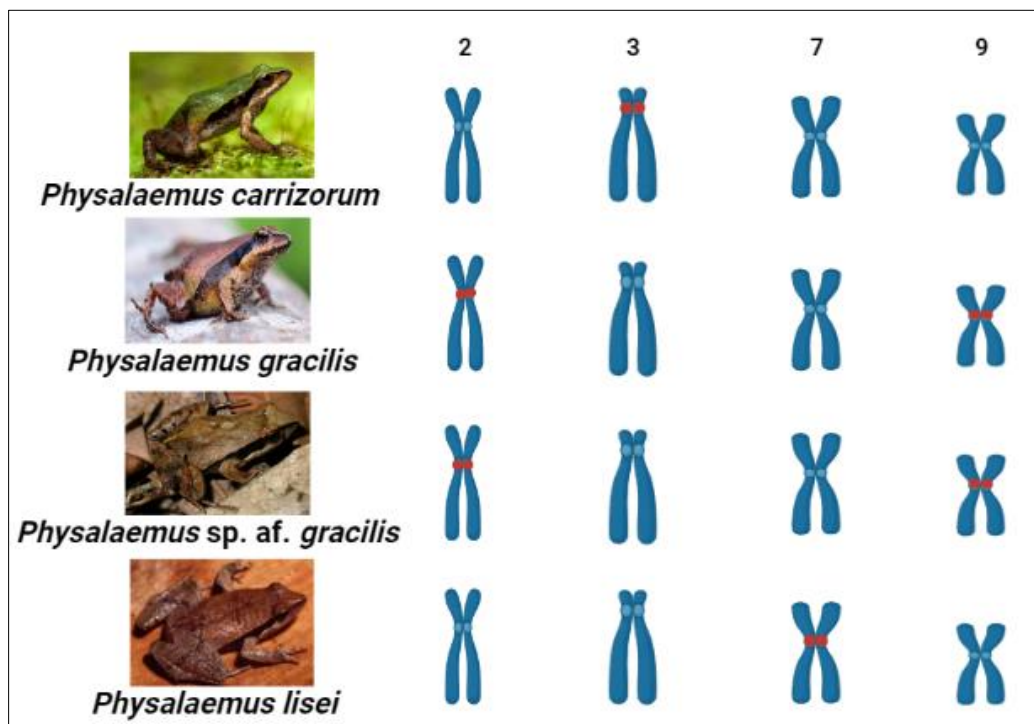


Figura 5. Adaptada de Ferro et al. (2021). FISH com sonda satDNA Pcp190 em *P. carrizorum*, *P. gracilis*, *P. sp. aff. gracilis* e *P. lisei*. Adaptado de “Icons - Nucleic Acids - DNA”, de BioRender.com (2020). Recuperado de <https://app.biorender.com/illustrations/62d4cc22b05eabfe945ca533>. Imagens dos anfíbios recuperados de: <https://www.biodiversity4all.org/>; <https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/>; <https://amphibiaweb.org/species/3405>.

Sondas de pintura cromossômica

Para esclarecer rearranjos cromossômicos estruturais ou numéricos na metáfase são utilizadas as sondas de pintura de cromossomos que são derivadas de um grande conjunto de sequências gênicas ou não-gênicas localizadas em determinado cromossomo e que, quando reunidas, conseguem “pintar” o cromossomo ou parte dele (sondas de pintura de cromossomos parciais) ao longo de seu comprimento. Por essa técnica também é possível realizar uma análise comparada entre espécies distintas e visualizar cromossomos no núcleo interfásico. Existem as sondas de pintura de cromossomos inteiros que utilizam de sondas

derivadas de um único tipo de cromossomo para marcar de forma homogênea todo o cromossomo.

As variações da técnica de FISH denominadas de Multiplex (M-FISH), SKY e Zoo-FISH utilizam sondas de pintura cromossômica. Multiplex (M-FISH) e SKY foram originalmente usadas para detecção simultânea dos 24 cromossomos humanos e Zoo-FISH utiliza de sondas desenvolvidas para uma espécie animal e compara com outras espécies próximas. Na técnica SKY, a emissão de cor dos cromossomos é determinada pela combinação de sondas de pintura e corantes fluorescentes, em que novas cores podem ser desenvolvidas a partir da mistura de duas cores entre cinco tipos de fluorocromos fluorescentes. Para sua visualização, um sistema de espectroscopia de imagem bidimensional é necessário para processar as imagens espectrais para que possam ser criadas 24 cores distinguíveis (Figura 6). Essa técnica é de fácil interpretação visual, é capaz de esclarecer cromossomos de origem desconhecida, como um cromossomo marcador extra, e pode revelar se um dos pais é portador de uma anormalidade estrutural equilibrada. No entanto, não é possível avaliar anormalidades como inversão, deleção, inserção e duplicação no mesmo cromossomo, já que requer uma análise mais detalhada.

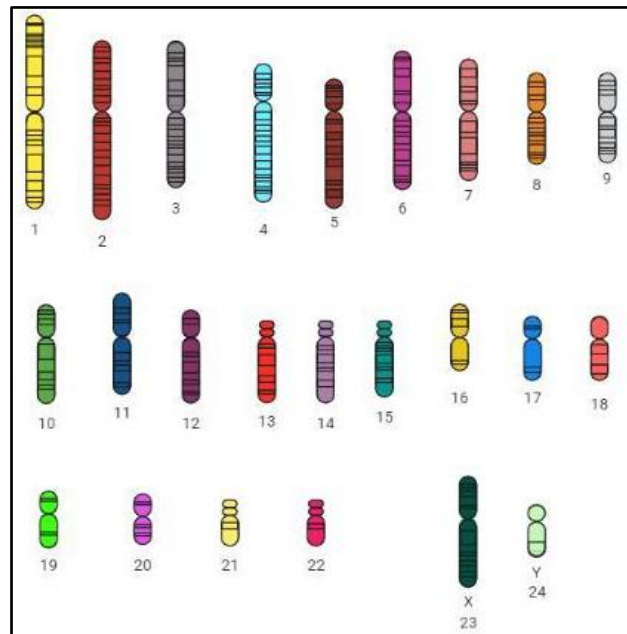


Figura 6. Técnica SKY para a visualização dos 24 cromossomos humanos a partir de sondas com combinações de fluorocromos espectralmente distintos. Adaptado de “Icons - Nucleic Acids - DNA”, de BioRender.com (2020). Recuperado de <https://app.biorender.com/illustrations/60edab39e45d2d00a956d75f>

Sondas de genoma inteiro

Utilizando o genoma total de uma espécie marcado como sonda, a técnica de Hibridização Genômica *in situ* (GISH) é uma das variações da FISH mais encontradas em estudos de citogenética vegetal, aplicada na detecção de cromossomos em híbridos artificiais ou segmentos transferidos de uma espécie para outra, no melhoramento genético e em estudos de evolução genômica (ver mais detalhes no tópico: GISH no estudo de híbridos e poliplóides para o melhoramento vegetal). Ainda utilizando genomas inteiros como sondas, a técnica Hibridização Genômica Comparativa em microarranjos (aCGH) é baseada na comparação de, pelo menos, dois genomas diferentes e identifica ganhos e perdas cromossômicas de um genoma em relação ao outro. O DNA do paciente (verde) e de controle (vermelho) são

rotulados, ambas as amostras são misturadas, co-hibridizados em um microarray e as imagens são tiradas dos fragmentos de DNA fluorescentes ligados. As intensidades de fluorescência são calculadas de acordo com a diferença no número de cópias de DNA, ou seja, se tanto o teste quanto o DNA controle tiverem números de cópias iguais para os alvos de DNA representados na matriz, as intensidades de sinal serão iguais (amarelo). Se uma deleção (vermelho) ou duplicação (verde) estiver presente no DNA de teste, as taxas de intensidade de fluorescência serão desiguais (ver mais detalhes no tópico: aCGH como método de diagnóstico em humanos).

Sondas baseadas em oligonucleotídeos sintéticos

Atualmente, há um aumento no uso de sondas de oligonucleotídeos (oligos) sintéticos projetados a partir de DNA repetitivo ou de sequências de DNA de cópia única, trazendo novas perspectivas para o uso dessa técnica, além da melhoria na qualidade, redução de tempo e custo para a preparação das sondas. As sondas oligo sintéticas direcionadas para uma região específica ou um cromossomo inteiro podem ser sintetizadas e amplificadas em conjunto. Possibilitando a identificação de cromossomos contendo essas regiões e segmentos específicos. As sondas baseadas em cópia única permitem a hibridização com alvos bem estabelecidos, mas que demandam de requisitos para sua eficiência, como especificidade, para que as sondas se liguem somente no alvo pretendido, comprimento do oligonucleotídeo e propriedades termodinâmicas (ex. temperatura de fusão), assim como requerem um método de amplificação de sinal para serem detectadas (devido a resolução do microscópio).

Algumas das ferramentas mais recentes utilizadas para projetar as sondas oligo sintéticas são o software Chorus e a plataforma interativa PaintSHOP. Chorus é preferido para

plantas e apresenta várias funções que possibilitam projetar sondas de oligonucleotídeos para espécies geneticamente relacionadas e para aquelas que não apresentam um genoma de referência. Já o PaintSHOP fornece um pipeline completo que abrange desde o design de sonda até a sua síntese e é utilizado para o design de oligonucleotídeos em escala genômica para experimentos FISH.

O trabalho de 2020 de Liu e colaboradores apresenta um exemplo claro e eficaz de se utilizar a técnica Oligo-FISH com sondas contendo sequências de cópia única para estudar variações cromossômicas e evolução em espécies de arroz (Figura 7). Foram projetados e desenvolvidos dois conjuntos 25.717 (verde) e 25.215 (vermelho) de 50.932 oligos (cada oligo com 45 nucleotídeos) contendo sequências de cópia única localizadas em 26 regiões cromossômicas específicas no genoma do arroz (*Oryza sativa*). As espécies analisadas incluíram *O. rufipogon* (AA), *O. longistaminata* (AA), *O. barthii* (AA), *O. punctata* (BB), *O. officinalis* (CC), *O. australiensis* (EE) e *O. brachyantha* (FF), no qual as que apresentavam genomas AA, BB ou CC geraram sinais mais específicos e intensos, o que pode estar relacionado à uma maior proximidade ao arroz, enquanto que as que geraram sinais menos específicos, genoma EE, ou não geraram sinal, genoma FF, tendem a apresentar uma maior distância filogenética se relacionada aos outros.

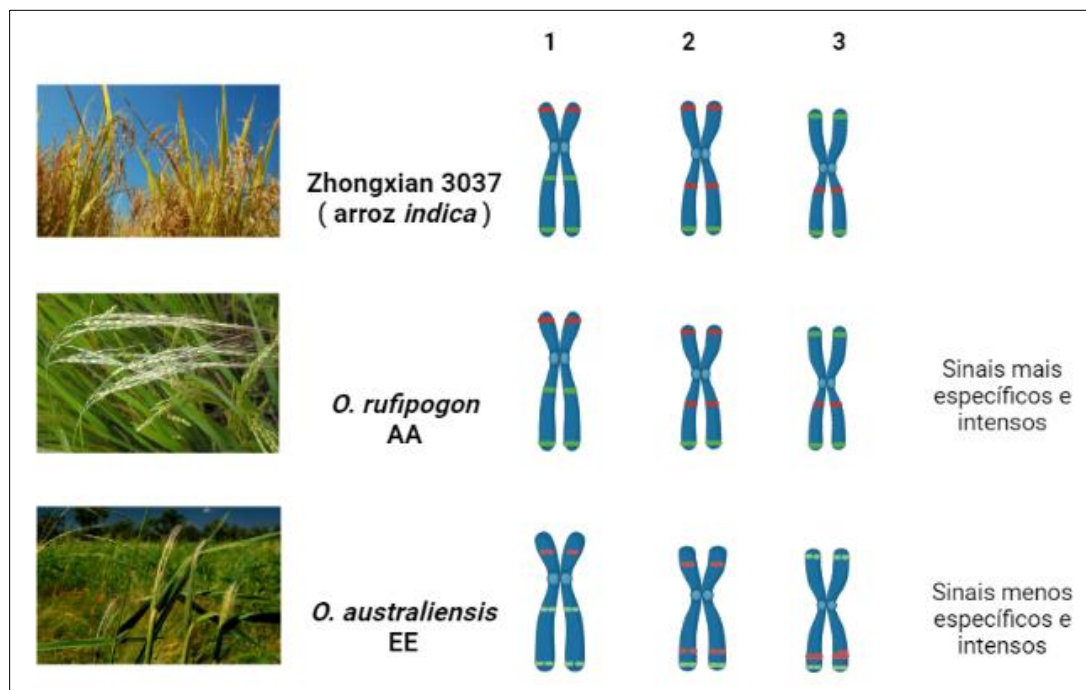


Figura 7. Adaptada do artigo de Liu et al., 2019. Cariotipagem comparativa de espécies de *Oryza* usando Oligo-FISH. Adaptado de “Icons - Nucleic Acids - DNA”, de BioRender.com (2020). Recuperado de <https://app.biorender.com/illustrations/62d4bbdecfdff5dbe05e9dff>. Imagens retiradas de: https://gydb.org/index.php?title=File:Oryza_australiensis.jpg; <https://efloraofindia.com/2011/03/17/oryza-rufipogon/>; <https://planetaarroz.com.br/almanaque-do-arroz/>

Impactos da FISH para a saúde e a segurança alimentar

aCGH como método de diagnóstico em humanos

A técnica FISH é utilizada como forma de diagnóstico de doenças raras dentro do sistema público de saúde brasileiro, o Sistema Único de Saúde (SUS). De acordo com o Ministério da Saúde é considerada doença rara aquela que atinge 1,3 pessoas a cada 2.000 indivíduos. Do total, 80% decorrem de fatores genéticos e o restante é influenciado por causas externas, como ambientais, infecciosas e imunológicas. O atendimento é realizado na Atenção Básica, porta de entrada ao SUS, e se necessário é encaminhado a um atendimento especializado.

As doenças raras apresentam sintomas diversos e variam de pessoa para pessoa, podem ser degenerativas e proliferativas e muitas não apresentam cura. Por isso, o diagnóstico precoce através de metodologias como a FISH assumem a responsabilidade de conceber melhor qualidade de vida aos pacientes, possibilitando um acompanhamento clínico para retardar a evolução da doença e aliviar sintomas. Algumas doenças raras têm seus Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para orientar o diagnóstico, tratamento e reabilitação dos pacientes. A FISH em metáfase ou núcleo interfásico, por doença, é realizada para avaliação para diagnóstico de doenças raras, eixo I - anomalias congênicas ou de manifestação tardia e eixo II - deficiência intelectual.

A Síndrome de Angelman (SA) se apresenta dentro do eixo I - anomalias congênicas ou de manifestação tardia, e é um distúrbio neurológico consequente da deleção da região 15q11-q13 do cromossomo de origem materna, com perda da função da proteína UBE3A (ubiquitina ligase), comprometendo funções neurais, como atraso intelectual, limitações na fala e no andar, além de sorrisos e risadas excessivas. Devido a isso, a técnica aCGH, variação da FISH, é utilizada como método diagnóstico, já que possibilita identificar alterações cromossômicas desbalanceadas através da análise de todo o genoma. Na imagem a seguir, a coloração vermelha está representando a deleção característica dessa síndrome, a cor verde está caracterizando uma possível duplicação do material genético, se fosse o caso, e a amarela representa quando tanto o teste quanto o DNA controle estão com números de cópias iguais para os alvos de DNA (Figura 8).

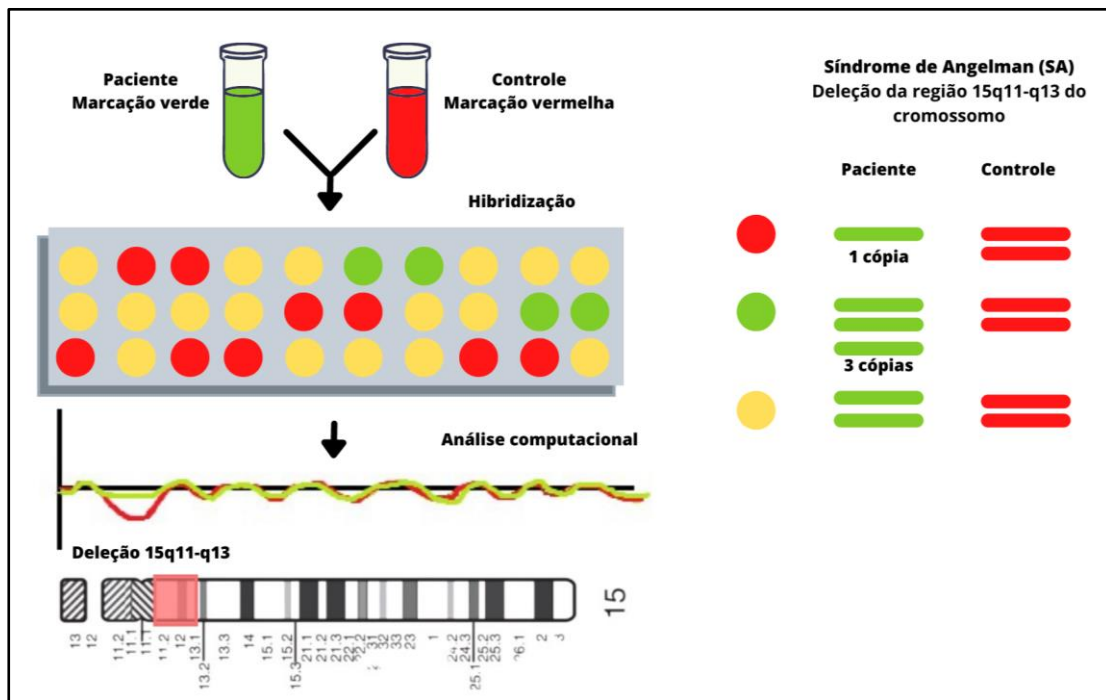


Figura 8. aCGH no diagnóstico da Síndrome de Angelman (SA).

GISH no melhoramento vegetal

O melhoramento interespecífico permite transferir um gene de interesse de espécies selvagens relacionadas para culturas cultivadas. A GISH distingue os genomas parentais e, assim, permite que a introgressão do material de interesse seja monitorado no nível cromossômico. Em um estudo realizado em 2019 (KHRUSTALEVA et al., 2019), a utilização da GISH foi realizada para monitorar o processo de introgressão no nível cromossômico do gene de resistência Pd_1 ao míldio no melhoramento interespecífico de cebola bulbo (*Allium cepa* L.) (Figura 9). O marcador molecular DMR1 que está intimamente ligado ao gene de resistência foi utilizado e a GISH aplicada ao cultivar comercial 'Santero' confirmou a presença do *locus* de resistência ao míldio no cromossomo 3. O míldio (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.) é a doença fúngica mais destrutiva para as

cebolas. A doença causa uma diminuição significativa na produção de bulbos e uma perda completa na produção de sementes sob clima úmido e frio.

Para isso, *A. roylei* Stearn ($2n = 2C = 16$) foi utilizada como o pai do pólen a ser cruzado com a linhagem citoplasmática-macho-estéril (T) 'Exhibition' de *A. cepa* ($2n = 2C = 16$), para produzir os híbridos F_1 interespecíficos ($2n = 2C = 16$). O primeiro e segundo retrocruzamentos seguintes foram realizados através dos cruzamentos $F_1 \times A. cepa$ 'Hiberna' = BC_1 e $BC_1 \times A. cepa$ 'Valensia' = BC_2 , respectivamente. A prole BC_2 foi autopolinizada (S_1BC_2) e apenas dois genótipos (plantas 7 e 8) apresentaram o gene de resistência, sendo analisadas com GISH. A análise GISH do acesso S_1BC_2 -8 mostrou a presença de cromossomos recombinantes no fundo genético de *A. cepa*. O cromossomo 3 continha os fragmentos de *A. roylei* nas regiões distais dos braços longos de ambos os homólogos. O braço curto do cromossomo 4, incluindo o centrômero e a parte proximal do braço longo, originou-se de *A. roylei*.

Um segundo auto cruzamento da planta 8 foi conduzido (S_2BC_2). A análise GISH da prole S_2BC_2 -8 permitiu selecionar três plantas que possuíam os fragmentos homozigotos de *A. roylei* na região distal do braço longo do cromossomo 3 apenas em o fundo genético de *A. cepa*. Usando GISH, foi demonstrado que seis tipos de cromossomos 3 recombinantes e três tipos de cromossomos 4 recombinantes em gametas viáveis produziram a descendência S_2BC_2 -8. Três plantas descendentes de S_2BC_2 apresentaram um fragmento homozigoto de *A. roylei* na região distal do braço longo dos cromossomos 3 em um fundo genético de *A. cepa* (Figura 9).

Sabe-se que um gene letal recessivo estava ligado ao gene de resistência, desta forma, os autores levantaram a hipótese de que o fragmento de *A. roylei* contém o fator letal recessivo que está localizado proximalmente ao gene de resistência ao míldio e localizado no

cromossomo 3 (Figura 9). O estudo demonstrou o poder da GISH no melhoramento interespecífico de plantas, permitindo monitorar tanto a introgressão do gene de interesse quanto o material genético indesejado de parentes selvagens. As linhas resistentes ao míldio foram produzidas em um período de tempo curto (7 anos) e o gene letal ligado ao gene *Pd₁* foi mapeado no cromossomo 3. Esses resultados irão influenciar no desenvolvimento de novos marcadores e na produção de outras cebolas resistentes ao míldio.

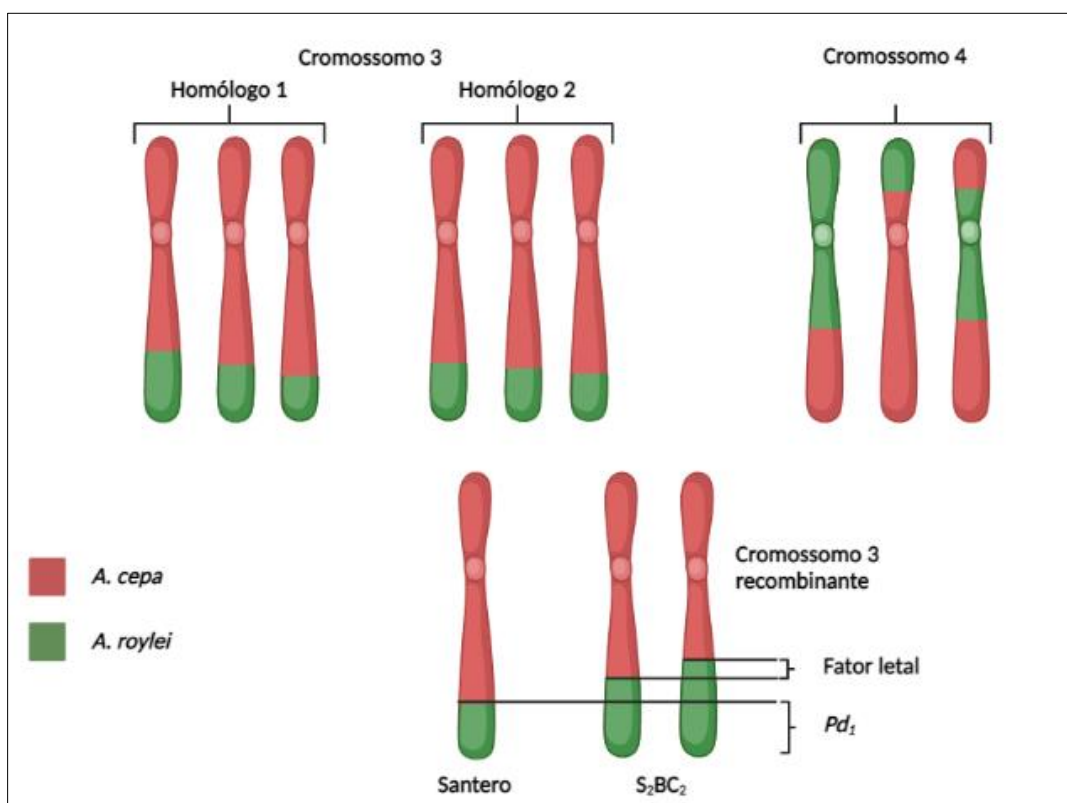


Figura 9. Adaptada de [Khrustaleva et al., 2019](#). Tipos de cromossomos recombinantes na prole S₂BC₂ e identificação do fragmento de *A. roylei* que contém o fator letal localizado proximalmente ao gene de resistência ao míldio no cromossomo 3. Adaptado de “Icons - Nucleic Acids - DNA”, de BioRender.com (2020). Recuperado de <https://app.biorender.com/illustrations/6331cb33c7828ec5e9de2e89>.

Considerações Finais

O presente trabalho demonstra que os estudos de caracterização de novos genes e espécies, realização de inferências evolutivas através de mapeamentos citogenéticos comparativos, e até o diagnóstico de doenças são perfeitamente possíveis de serem realizados a partir da aplicação da técnica de FISH e suas variações.

Em função da versatilidade da FISH, ela continua ganhando novos formatos e aplicações, o que indica sua adaptabilidade aos avanços tecnológicos, garantindo que sempre seja considerada como uma técnica atual. Vale ressaltar que a versatilidade encontrada a partir da possibilidade de acesso a diferentes materiais biológicos e diferentes regiões do genoma, assim como através da confecção de diferentes sondas, se dá através das propriedades da molécula de DNA que permitem que diferentes metodologias empregadas na citogenética molecular sejam realizadas. Sob o ponto de vista tecnológico o advento do sequenciamento de alto desempenho aliado à diminuição do seu custo relativo tem contribuído para o aumento do conhecimento dos genomas das mais diversas espécies o que facilita a obtenção de sondas para a aplicação da FISH em espécies não modelo.

Glossário

Amniócitos: células providas do líquido amniótico que envolve o embrião.

Células gaméticas: células reprodutoras, haploides (n) que carregam metade do número de cromossomos do indivíduo e são formadas por meiose. Os gametas masculinos são chamados de espermatozoides (animais) ou anterozoides (plantas) e os femininos são chamados óvulos (animais) ou oosferas (plantas).

Células somáticas: são as células de um organismo multicelular responsáveis pela formação de tecidos e órgãos. Assim, as células somáticas representam todas as células do corpo que

possuem o conjunto gênico completo, denominadas como diploides e que se replicam apenas por processo de mitose.

Cromossomos gigantes lampbrush (LBCs): são compostos por dois cromossomos homólogos (presença de quatro cromátides) ligados um ao outro, são transcricionalmente ativos e descondensados, por isso apresentam um tamanho consideravelmente grande.

Cromossomos politênicos: São cromossomos que sofreram replicação do DNA mas que não seguiram a divisão celular, formando cromossomos compostos por diversas moléculas de DNA unidas.

Cromossomos recombinantes: cromossomos com novas combinações de alelos.

Espectro: o espectro visível se refere às ondas eletromagnéticas, que estão entre o infravermelho e o ultravioleta, e que podem ser vistas pelo olho humano. Essas ondas apresentam picos de frequência que correspondem a cores distintas.

Espectroscopia: trata da medição e interpretação de espectros que surgem da interação da radiação eletromagnética (uma forma de energia propagada na forma de ondas eletromagnéticas) com a matéria.

Fluoróforo ou fluorocromo: moléculas que absorvem fótons em determinado comprimento de onda e emitem em outro comprimento de onda maior, produzindo fluorescência.

Haptenos: pequenas moléculas que desencadeiam uma resposta imune apenas quando ligadas a um grande transportador, como uma proteína.

Introgessão: transferência ou introdução permanente de genes de uma espécie para outra

Micromanipulação: conjunto de técnicas de laboratório para a manipulação de materiais biológicos com a utilização de microscópio óptico, micropipetas e microagulhas.

Meiose: é um processo de divisão celular que leva à formação de quatro células-filhas com metade do número de cromossomos da célula parental. As células humanas, por exemplo, apresentam 46 cromossomos, portanto, aquelas que sofrem meiose têm apenas 23 cromossomos (espermatozoides e óvulos).

Mitose: processo de divisão celular no qual ocorre a formação de duas células geneticamente idênticas à célula original, com mesmo material genético (e número de cromossomos). Ocorre em casos de reprodução assexuada, crescimento de organismos e regeneração de tecido.

Oócito: nome dado ao gameta feminino, conhecido por ovo ou óvulo. Esta célula é produzida nos ovários (gónadas femininas) pela oogénese (processo meiótico).

Vetor: moléculas circulares de material genético que podem se replicar de forma autônoma no hospedeiro.

Vilosidades coriônicas: são vilosidades que florescem na placenta e permitem o máximo de área de contato e troca de nutrientes entre a circulação embrionária e materna.

Para saber mais

FARRELL, R. E. **Nucleic Acid Probe Technology**. [s.l: s.n.].

FERRO, J. M. et al. Cytogenetics of four foam-nesting frog species of the *Physalaemus gracilis* group (Anura, Leptodactylidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 1, p. 1–10, 2022.

GERSEN, S.; KEAGLE, M. **The principles of clinical cytogenetics**. New York: Springer, 2013.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. Tradução de Paulo A. Mota. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p 27-29.

LIEHR T. **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)**. Berlin Heidelberg: Springer Protocols Handbooks, © Springer-Verlag, 2017.

KHRUSTALEVA, L. et al. The power of genomic in situ hybridization (GISH) in interspecific breeding of bulb onion (*Allium cepa* L.) resistant to downy mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.). **Plants**, v. 8, n. 2, 2019.

LIU, X. et al. Dual-color oligo-FISH can reveal chromosomal variations and evolution in *Oryza* species. **Plant Journal**, v. 101, n. 1, p. 112–121, 2020.

LIU, G.; ZHANG, T. Single copy oligonucleotide fluorescence in situ hybridization probe design platforms: Development, application and evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 2021.

SHAKOORI, A. R. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications. In: Bhat, T.A.; Wani, A.A. **Chromosome Structure and Aberrations**. New Delhi: Springer, p. 343-367, 2017.

Capítulo 2

PANORAMA GERAL DA TÉCNICA FISH EM PLANTAS COM ÊNFASE ÀS QUESTÕES EVOLUTIVAS

Manuscrito a ser submetido à publicação na revista BMC

Thainá Ferreira Silva

Flávia Barreto de Sousa

Rafael Barbosa Pinto

Thannya Nascimento Soares

Thainá Ferreira Silva, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: thaina.ferreira@discente.ufg.br. Flávia Barreto de Sousa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: flaviasousabarreto@gmail.com. Rafael Barbosa Pinto, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: rafaelbpinto@gmail.com. Thannya Nascimento Soares, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: tnsouares@ufg.br

Resumo

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica da citogenética molecular que promove a marcação de regiões específicas no genoma. O seu desenvolvimento combinado com o grande avanço das técnicas de biologia molecular e de genômica nos últimos 20 anos, possibilitam hoje a realização de muitos trabalhos de citogenética vegetal. A revisão sistemática é uma ferramenta interessante para mensurar e caracterizar os tipos de estudos realizados com uma determinada técnica, o que permite avaliar sua abrangência de aplicações e apontar lacunas de conhecimentos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi sumarizar e analisar de forma crítica os dados disponíveis na literatura sobre as aplicações da técnica FISH para o estudo citogenético em plantas. Além disso, os trabalhos científicos que aplicaram a técnica de FISH foram caracterizados com o objetivo de elucidar questões evolutivas em plantas. Esta revisão sistemática foi realizada seguindo as diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). A busca foi realizada através da base de dados *Scopus* utilizando palavras-chave que capturaram estudos que utilizavam a técnica FISH voltada para o estudo citogenético das plantas. A construção dos gráficos foram realizadas através da linguagem R utilizando o *R Statistical Software*, do Software VOSViewer© e através da linguagem Python utilizando o Software Jupyter. Os artigos foram classificados quanto ao assunto principal do estudo nas categorias “Biotecnologia vegetal”, “Estudos evolutivos”, “Descritivo”, “Técnicas/metodológico” e “Expressão gênica”. Foram selecionados 4006 artigos que apresentaram um crescimento entre os anos 1975 – 2020, com um pico de crescimento por volta de 2010, devido ao aumentando das possibilidades de aplicação e estudos nessa área. Um breve histórico do desenvolvimento da técnica pode ser traçada através das palavras-chave obtidas, abrangendo as primeiras marcações em espécies de plantas (palavra-chave “biotin labeling”), os avanços da FISH

(palavra-chave “gish”), até a utilização de sondas oligo-sintéticas nos dias atuais (palavra-chave “oligo-fish”). Os países que apresentaram maior quantidade de estudos foram China e EUA, com o Brasil na 8ª posição. As famílias mais encontradas nos estudos foram Poaceae, Brassicaceae e Leguminosae. As categorias “Biotecnologia vegetal” e “Estudos evolutivos” representaram mais de 60% do total de trabalhos, com o destaque da utilização das técnicas GISH e FISH com sondas de DNA repetitivo e a marcação indireta foi a mais utilizada pelos estudos. Foram selecionados 1.197 artigos categorizados como “Estudos evolutivos”, e a partir disso, os artigos desta categoria foram classificados quanto ao tipo de “questões evolutivas” respondidas por meio da utilização da FISH. Seu uso está sendo voltado para responder às questões relacionadas à evolução do genoma das diferentes espécies de plantas (categoria “Evolução do genoma”), identificar heterogeneidades no cariótipo a partir da comparação de cromossomos (categoria “Citogenética comparativa”) e reconstruir o histórico entre os diversos grupos de espécies (categoria “Sistemática e citotaxonomia”). A família Poaceae foi a mais estudada em todas as categorias, seguida da Leguminosae. Dito isso, o entendimento de como essa técnica está sendo aplicada permitirá direcionar novas pesquisas com diferentes perspectivas, novas análises e manejo de diferentes espécies vegetais, como também está gerando informações para novos estudos evolutivos.

Palavras-chave: botânica; fluorescência, citogenética molecular; revisão sistemática

Introdução

A técnica denominada hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi proposta em meados da década de 1970 e se baseia no uso de sondas marcadas com fluorescência para a identificação de regiões específicas (alvos) no genoma (HUBER; VOITH VON VOITHENBERG; KAIGALA, 2018). A citogenética molecular se beneficiou enormemente com o desenvolvimento da técnica de FISH, que é aplicada para os mais variados tipos de estudos citogenéticos e organismos (GRAPHODATSKY; TRIFONOV; STANYON, 2011; LIEHR et al., 2013; SZELES, 2002; YOUNIS et al., 2015).

A aplicação da FISH nos estudos de citogenética vegetal permitiu que espécies com alto interesse agrônômico e voltadas para o melhoramento genético, como o trigo (NARANG et al., 2020; SINGH et al., 2020), fossem estudadas. Tornou-se essencial para auxiliar no entendimento da história evolutiva de diferentes espécies, facilitando a análise de eventos e processos celulares que levam às mudanças no genoma. Também foi possível responder a questões relacionadas à estrutura do próprio material genético e identificar cromossomos de espécies distintas (JIANG, 2019; JIANG; GILL, 2006).

Em consequência da vasta aplicação da FISH, faz-se necessário utilizar de estratégias para avaliar a evolução ou estagnação desse campo de pesquisa e responder a diferentes questionamentos científicos. Uma das alternativas para solucionar essas questões é o uso da revisão sistemática, que envolve um plano detalhado para reunir todas as evidências empíricas para responder a uma ou mais perguntas científicas (WILT; FINK, 2007), como também o uso da cienciométrica, ferramenta dedicada ao estudo quantitativo da ciência e da tecnologia através de uma sistematização de métodos, áreas, pesquisadores e países (PARRA; COUTINHO; PESSANO, 2019).

A busca pelo panorama geral das aplicações da técnica FISH em plantas já foi revisado anteriormente. A primeira revisão abrangeu os primeiros anos do desenvolvimento da técnica, surgimento das primeiras variações e modo de marcação de sondas (JIANG JIMING; GILL, 1994). Em sequência, as crescentes modificações da FISH datadas até 2006 foram relacionadas às suas possíveis aplicações (JIANG; GILL, 2006). Recentemente, os avanços da técnica voltada para o uso das sondas oligosintéticas foram discutidos (JIANG, 2019). Essas revisões da literatura abrangeram as aplicações gerais da FISH, e como forma de atualização, este trabalho busca apresentar uma sistematização e direcionamento a cerca da técnica, desde o seu surgimento até os dias atuais, sobre quais tipos de estudos, sondas, famílias botânicas e variações da técnica estão sendo mais estudadas e quais são as relações entre esses parâmetros, como também detalhar sobre quais questões evolutivas podem ser respondidas através da FISH.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi sumarizar e analisar de forma crítica os dados disponíveis na literatura sobre as possíveis aplicações da técnica FISH para o estudo citogenético em plantas, além de detalhar e discutir as aplicações dessa técnica para estudos evolutivos em plantas. Desta forma, buscou-se responder aos seguintes objetivos específicos: (1) Como foi a dinâmica temporal de número de estudos entre os anos de 1975 e 2020? (2) Quais são as palavras-chave empregadas pelos autores e qual o significado delas de acordo com o panorama histórico? (3) Qual é a distribuição geográfica dos estudos que estão se destacando? (4) Quais famílias botânicas estão sendo mais estudadas? (5) Quais variações da técnica FISH, sondas e marcações estão sendo mais utilizadas? (6) Quais são os estudos em que a técnica FISH está sendo aplicada em plantas? (7) Quais tipos de perguntas/questões evolutivas podem ser respondidos com a aplicação técnica FISH em plantas?

Material e Métodos

Este trabalho foi realizado seguindo as diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*, PRISMA (MOHER et al., 2009) (Material Suplementar 1). A busca foi feita em 29 de abril de 2021 usando a base de dados *Scopus* (<https://www-scopus.ez49.periodicos.capes.gov.br/search/form.uri?display=basic#basic>), que abrange áreas de ciência, tecnologia, medicina, ciências sociais, artes e humanidades. Outras bases foram consultadas, no entanto, a Scopus foi selecionada por englobar a maioria dos artigos com os critérios estabelecidos neste trabalho.

Os termos aplicados para a busca dos artigos foram: {ISH techniques} OR {in situ hybridization} OR {hybridization in situ} OR {In-situhybridization} OR {hybridizationtechnique} OR {DNA sequenceshybridized in situ} OR {non-radioactive ISH} OR {nonisotopic ISH technique} OR {fluorescence in situ hybridization} OR {in situ hybridizationoffluorochrome} AND (chromosom* OR cytogenomic* OR cytogenetic* OR chromatin* OR probe* OR {hybridmolecules} OR {targetcells} OR {fluorochrome-labelled}) AND (plant* OR botan* OR {plantchromosomes}). Os termos “hybridization technique” e “target cells” são mais gerais e permitiram que outras técnicas que utilizam de hibridização e sondas fluorescentes também fossem encontradas nos artigos, no entanto, foi optado por mantê-los e fazer uma inspeção manual utilizando os critérios de inclusão e exclusão para que nenhum trabalho que contivesse a técnica FISH fosse excluída. Os termos de busca e suas combinações foram identificados automaticamente no título, resumo e palavras-chave.

O intervalo de tempo de publicação dos artigos originais foi limitado entre os anos de 1970 e 2020. Foram excluídos artigos relacionados à aplicação da técnica em outros organismos: Human (1323 artigos); Animals (1269); Humans (1009); Animal (862);

HumanCell (546); Animal Tissue (358); Animalia (333); Mouse (306); HumanTissue (299); Mice (279); Animal Experiment (256); ClinicalArticle (233). A delimitação do tempo e do tipo de organismo (plantas) estudado nos artigos foi realizada na primeira fase de filtragem. Os artigos que continham o termo bactéria e suas variações foram incluídos na primeira etapa de busca, visando a detecção da técnica de BAC-FISH. Em função disto, os artigos relacionados com microorganismos foram excluídos manualmente na segunda fase de filtragem. A terceira etapa de filtragem foi realizada durante a leitura dos resumos dos artigos (Material Suplementar 1).

A análise dos artigos foi realizada a partir da construção de uma tabela com os seguintes dados: título; link da publicação/doi; ano da publicação; autores e número de autores; idioma; fontes (revista); família e ordem botânica; variações da FISH; tipo de sonda; marcação da sonda (direta/indireta); tipo de estudo (Material suplementar 2). Os tipos de estudos foram classificados e definidos para este estudo como: “Biotecnologia vegetal”, “Estudos evolutivos”, “Descritivo”, “Técnicas/metodológico” e “Expressão gênica” (Tabela 1). Cada estudo foi direcionado para uma única categoria de acordo com seu principal objetivo. Sabendo que a FISH tem um espectro de aplicações que vai além da citogenética molecular, estudos de expressão gênica foram categorizados, porém não foram alvo de uma análise ou discussão profunda.

Tabela 1. Descrição das cinco categorias de estudos classificadas a partir da avaliação do assunto principal tratado do artigo. As cinco categorias identificadas foram: “Biotecnologia vegetal”, “Estudos evolutivos”, “Descritivo”, “Técnicas/metodológico” e “Expressão gênica”.

| Tipos de estudos | Descrição |
|------------------------------|--|
| Biotecnologia vegetal | Estudos sobre melhoramento genético, identificação e caracterização de genes de interesse (ex. genes de resistência; dormência física de sementes), cultura de tecidos vegetais (embriogênese somática), fitopatologia, reprodução assistida, composição e caracterização de possíveis alterações estruturais no genoma e nos processos celulares em híbridos artificiais e em programas de transferência de genes, identificação de mecanismos que respondem a estresses naturais e/ou induzidos, presença de micronúcleos, minicromossomos, alterações estruturais e instabilidades no genoma (podendo ou não ser induzidas. Ex: irradiação ionizante; mutagênicos). |
| Estudos evolutivos | Estudos sobre alterações estruturais e/ou numéricas no genoma, abrangendo relações intraespecíficas e/ou interespecíficas, com foco evolutivo. A citotaxonomia, especiação, evolução de genoma, identificação de parentescos e processos celulares que levam a mudanças no genoma, como a diploidização, também entraram nessa classificação. |
| Descritivo | Artigos cujo objetivo era descrever o número ou estrutura dos cromossomos ou dos genomas e descrever processos celulares (ex. replicações, endoreduplicação). |
| Técnicas/metodológico | Trabalhos que buscaram validar alguma técnica/metodologia nova ou aprimorar uma já existente |
| Expressão gênica | Artigos que realizaram a identificação de RNAs com o intuito de avaliar a expressão gênica. Também fizeram parte deste grupo os trabalhos que avaliaram padrões de metilação do DNA. |

A tendência temporal do número de publicações por ano foi visualizada a partir da construção de um gráfico de linha no R Statistical Software (versão 2022.07.1+554,

<https://www.rstudio.com/>) (TEAM; AL., 2016) utilizando a linguagem R. No R Notebook, a tabela com os dados foi lida utilizando o pacote ggplot2 (<https://ggplot2.tidyverse.org/index.html>) (WICKHAM, 2016) (Material suplementar 4).

A coocorrência das palavras-chave e distribuição dos artigos em diferentes países foi realizada através do Software VOSViewer© (versão 1.6.18, Centro de Estudos de Ciência e Tecnologia, Holanda, <https://www.vosviewer.com/>). O mapa das palavras-chave com o maior número de ocorrências e sendo atribuídas pelos autores foi relacionada aos anos 2006 - 2014, período temporal padrão que o Software disponibiliza. Sendo assim, a ocorrência das palavras-chave mais antigas foi representada por cores mais escuras (roxo/verde escuro) e as mais recentes por cores mais claras (verde claro/amarelo) e o peso evidenciado para as caixas que contém os termos foi de número de ocorrência, ou seja, quanto maior a ocorrência, maior a caixa. Em relação à distribuição dos artigos, o critério de inclusão foi o número mínimo de 10 documentos para cada país entre os estudos analisados.

Já os dados relacionados às famílias botânicas, variações da técnica, tipos de sondas e marcação, assim como os dados a partir da categorização dos estudos evolutivos, foram visualizados através de gráficos por meio da linguagem Python. Foi utilizada a biblioteca Seaborn (<https://seaborn.pydata.org/>) para a visualização de dados Python para desenhar gráficos estatísticos e o `seaborn.countplot` (<https://seaborn.pydata.org/generated/seaborn.countplot.html?highlight=countplot#seaborn.countplot>) para gerar as contagens de observações em cada caixa categórica utilizando barras. O software Jupyter (<https://jupyter.org/>) foi utilizado para gerar os gráficos de barras deste estudo (Material suplementar 4). O gráfico de pizza para os tipos de estudos foram graficamente realizados através da ferramenta Excel.

Os artigos categorizados como “Estudos evolutivos” foram analisados com um maior detalhamento, visando entender a aplicação da FISH nesta categoria de estudos (Material suplementar 3). Para tanto, os artigos desta categoria foram classificados quanto ao tipo de “questão evolutiva” respondida a partir da aplicação da técnica de FISH: “Plasticidade fenotípica e epigenética”, “Citogenética comparativa”, “Diversificação”, “Evolução do genoma”, “Sistemática e citotaxonomia” e “Evolução e diversificação de plantas cultivadas” (Tabela 2). As principais famílias botânicas encontradas e relacionadas a essas categorias também foram buscadas. Esses dados foram analisados através da linguagem Python, como descrito acima, para gerar o gráfico de barras com as categorias e famílias botânicas (Material suplementar 4).

Resultados

Análise temporal e principais países que publicaram artigos com a técnica de FISH em plantas

Na primeira fase de filtragem foram excluídos 1.021 artigos, totalizando 8.100, na segunda fase de filtragem foram excluídos 2.771 artigos, totalizando 5.329, e por fim, na terceira etapa de filtragem foram excluídos 1.323 artigos, totalizando 4.006 incluídos para a revisão (Material suplementar 1). Esses 4006 artigos selecionados datam desde 1975 até 2020 e apresentaram um crescimento ao longo dos anos (Figura 1).

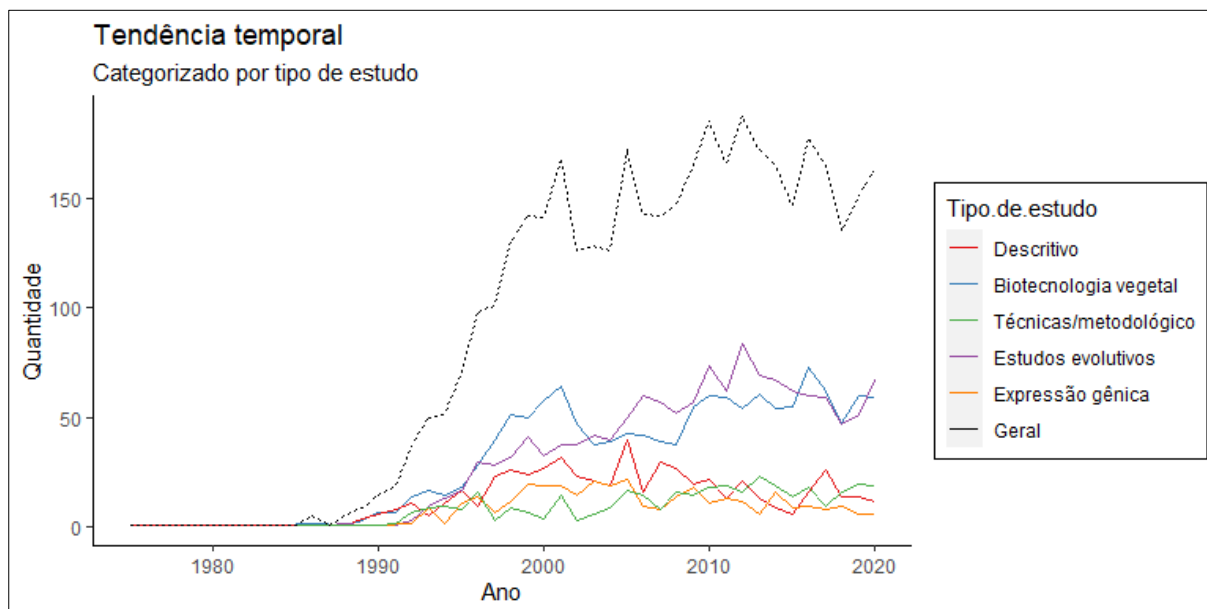


Figura 1. Tendência temporal categorizado por tipo de estudo. Os tipos de estudos são: “Biotecnologia vegetal” (linha azul); “Estudos evolutivos” (linha roxa); “Descritivo” (linha vermelha); “Técnicas/metodológico” (linha verde); “Expressão gênica” (linha laranja); Total de artigos analisados (linha preta).

A figura 2 exibe o número de ocorrência de palavras-chave que foram atribuídas pelos autores relacionadas aos anos 2006 - 2014. É possível observar que termos como "immunolocalization", “biotinlabeling”, “digoxigenin” abrangem as primeiras marcações em espécies de plantas e “fish”, “genomic in situ hybridization”, “gish”, “wheat”, “rdna”, “rice”, “brassica napus” remetem aos avanços da técnica e as diferentes variações desenvolvidas. Já “oligo-fish” e “oligonucleotide probes” se referem ao recente aumento da utilização de sondas sintéticas de oligonucleotídeos. A partir disso, um traçado histórico foi desenvolvido entre os anos de 2006 e 2014.

Dentre os 10 países que estão presentes em sua maioria nos trabalhos analisados, China, Estados Unidos, Japão e Reino Unido se destacaram (Figura 3). O Brasil se encontra na 8ª posição.

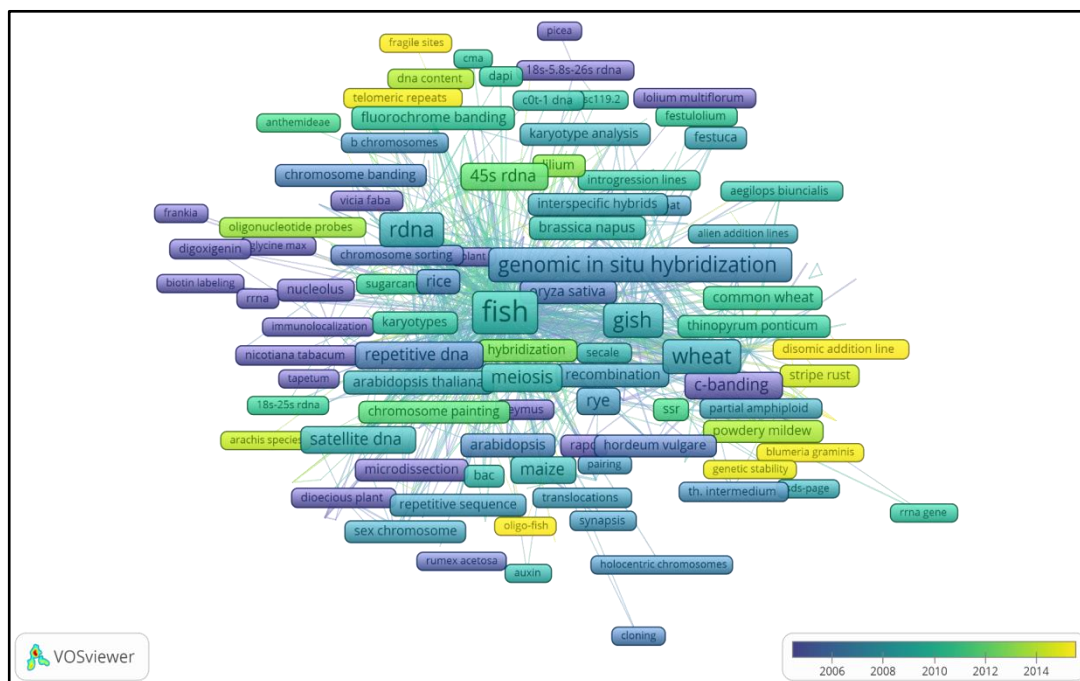


Figura 2. Número de ocorrências de palavras-chave atribuído pelos autores relacionados aos anos 2006 - 2014. As palavras-chave mais antigas foram representadas por cores mais escuras (roxo/verde escuro) e as mais recentes por cores mais claras (verde claro/amarelo) e o tamanho das caixas que contém os termos correspondem ao número de ocorrência de cada palavra-chave. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

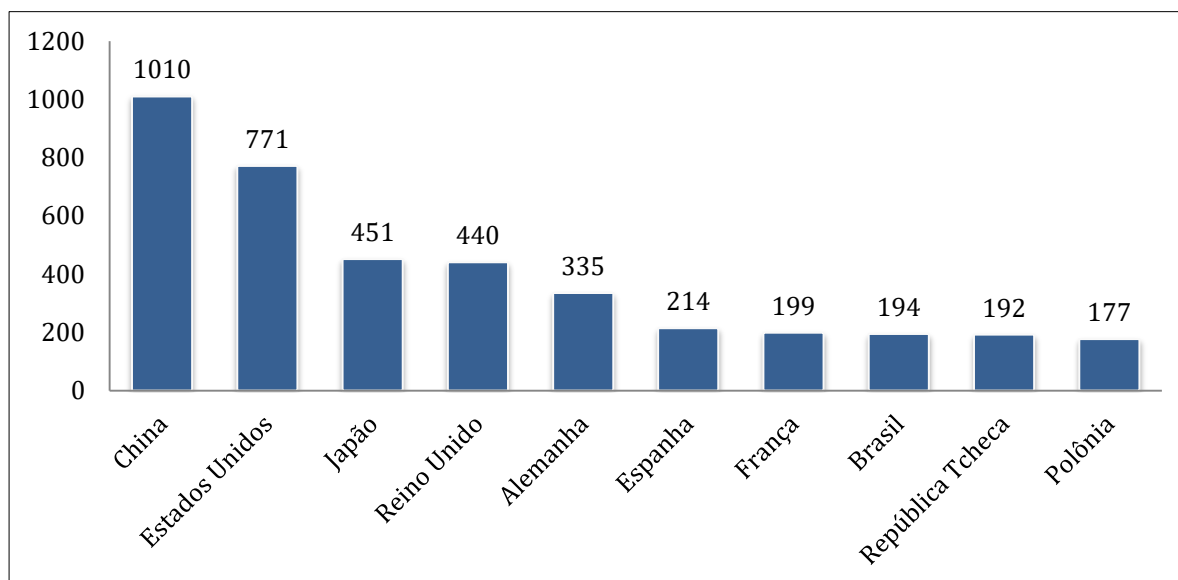


Figura 3. Número de artigos publicados pelos dez países com os maiores números de publicações sobre a aplicação da técnica de FISH em plantas. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

Classificação dos artigos por famílias botânicas

As famílias mais encontradas nos estudos foram Poaceae (2.037 observações), Brassicaceae (401 observações), Leguminosae (265 observações), Solanaceae (256 observações) e Asteraceae (182 observações) (Material suplementar 5). Há artigos que apresentaram em seu estudo mais de uma família botânica, por isso, o número de observações pode ser maior do que o número de artigos (Figura 4). A família Poaceae teve seu destaque nos estudos classificados como “Biotecnologia vegetal”, já as famílias Brassicaceae e Solanaceae se apresentam de forma homogênea nos diferentes tipos de estudos e, por fim, Leguminosae e Asteraceae estavam presentes majoritariamente na categoria de “Estudos evolutivos”.

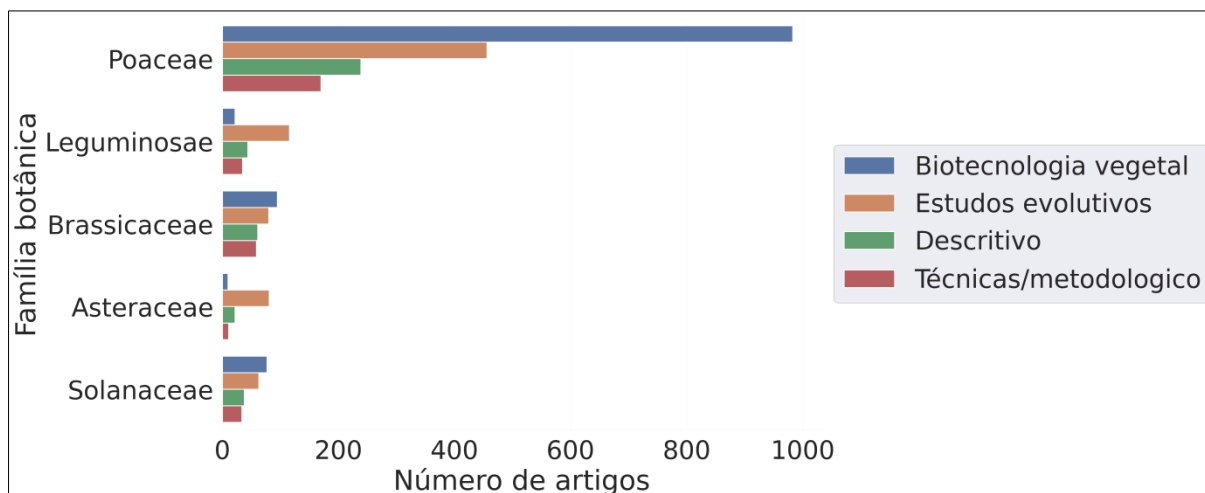


Figura 4. As cinco famílias mais encontradas nos artigos selecionados relacionadas às quatro categorias desenvolvidas neste estudo. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

Variações da FISH, tipos de sondas e marcações utilizadas nos artigos

As variações da FISH mais encontradas foram: FISH no uso tradicional da terminologia (3.688 observações), GISH (1.538 observações), BAC-FISH (448 observações) e oligo-FISH (191 observações) (Figura 5).

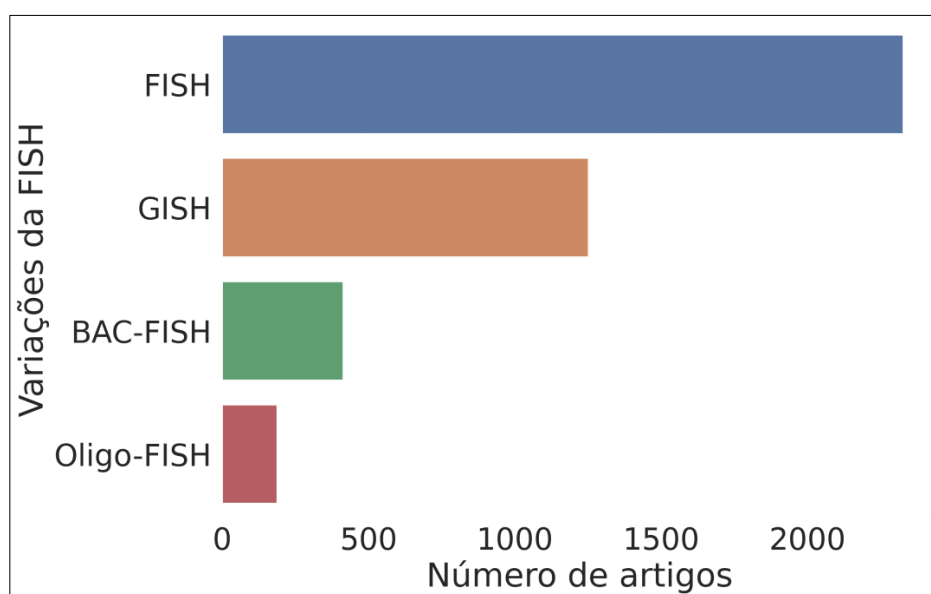


Figura 5. As quatro variações da técnica FISH mais utilizadas nos estudos selecionados. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

Os tipos de sondas relacionadas foram de DNA repetitivo (2.594 observações), sondas de genoma inteiro (1.353 observações), *locus*-específicas (590 observações) e pintura cromossômica (203 observações) (Figura 6), tendo por sua vez a possibilidade de marcação direta (1.121 observações no total) e/ou indireta (2.911 observações no total) (Figura 7). Vale ressaltar que tanto as variações da técnica quanto os tipos de sondas e marcações, apareceram mais de uma vez e concomitantemente umas com as outras, por isso, o número de observações foi maior do que a quantidade de artigos analisados.

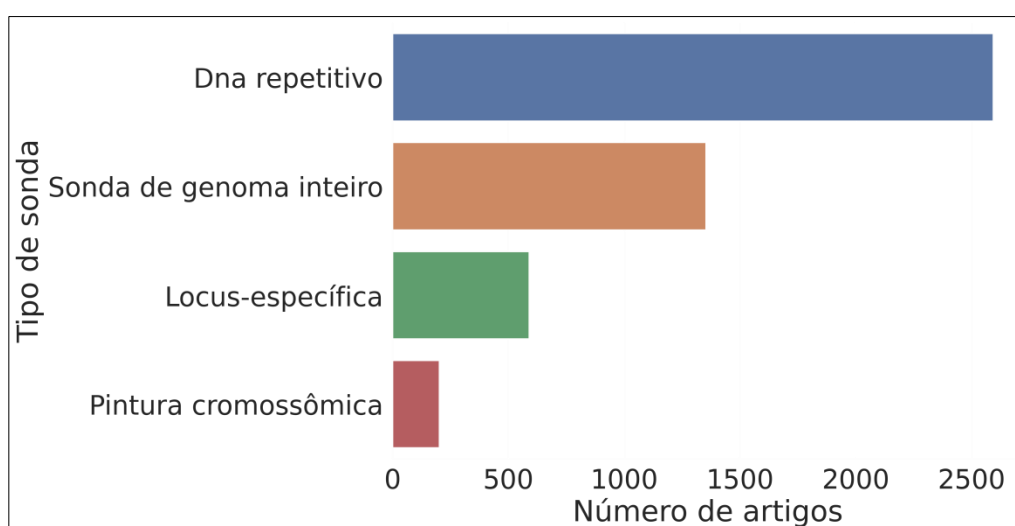


Figura 6. Os tipos de sondas mais utilizadas nos artigos selecionados. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

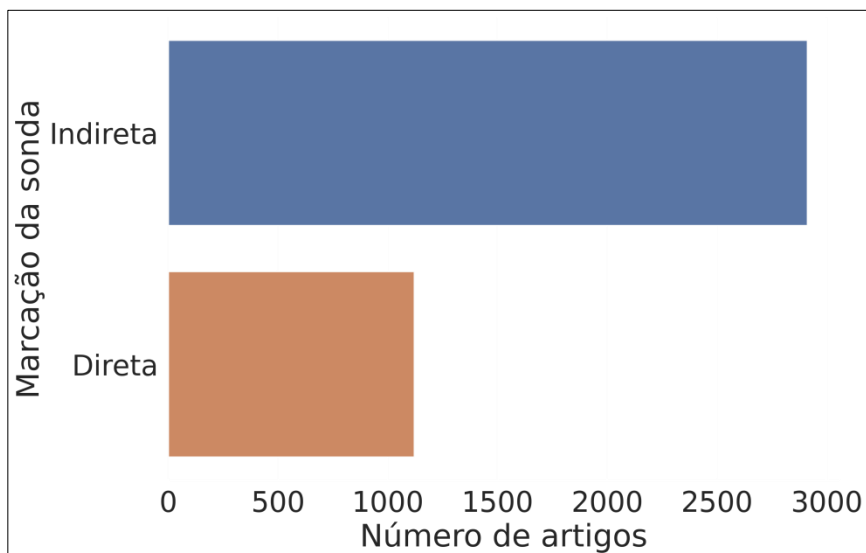


Figura 7. As diferentes marcações das sondas utilizadas para FISH. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

Tipos de estudos realizados com a técnica de FISH em plantas

A análise dos resumos dos artigos permitiu a sua classificação em cinco categorias de tipos de estudos, dentre as quais as categorias “Biotecnologia vegetal” e “Estudos evolutivos” representaram mais de 60% do total de trabalhos, com 1.362 e 1.349 respectivamente. A terceira categoria mais representativa em termos de número de trabalhos foi a “Descritivo” (Citogenética molecular descritiva), com 569 artigos. As categorias de estudos “Técnicas/metodológico” e “Expressão gênica” apresentaram os menores números de artigos em relação ao total, com valores semelhantes em cada um deles, com 375 e 351, respectivamente (Figura 8).

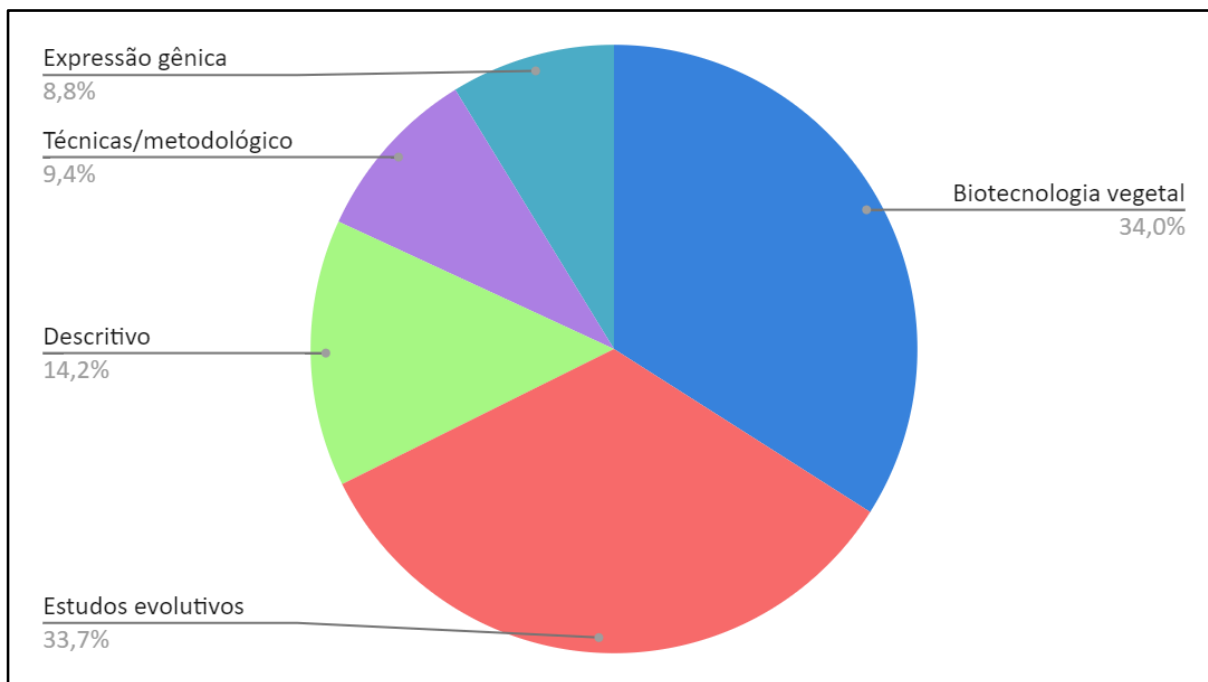


Figura 8. Os tipos de estudos categorizados neste trabalho utilizando a técnica FISH na literatura científica. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

A partir das categorias construídas, foi possível observar que em “Estudos evolutivos” a técnica FISH utilizando o DNA repetitivo como sonda se destaca consideravelmente, assim como nos tipos de estudo “Descritivo” e “Técnicas/metodológico”. Dentro da categoria “Biotecnologia vegetal”, observa-se o destaque da utilização da técnica GISH. Em quase todas as categorias é possível observar que as variações BAC-FISH e Oligo-FISH são utilizadas em menor quantidade, exceto em “Descritivo” e “Técnicas/metodológico”, em que BAC-FISH ultrapassa a GISH e se torna a segunda variação mais utilizada (Figura 9).

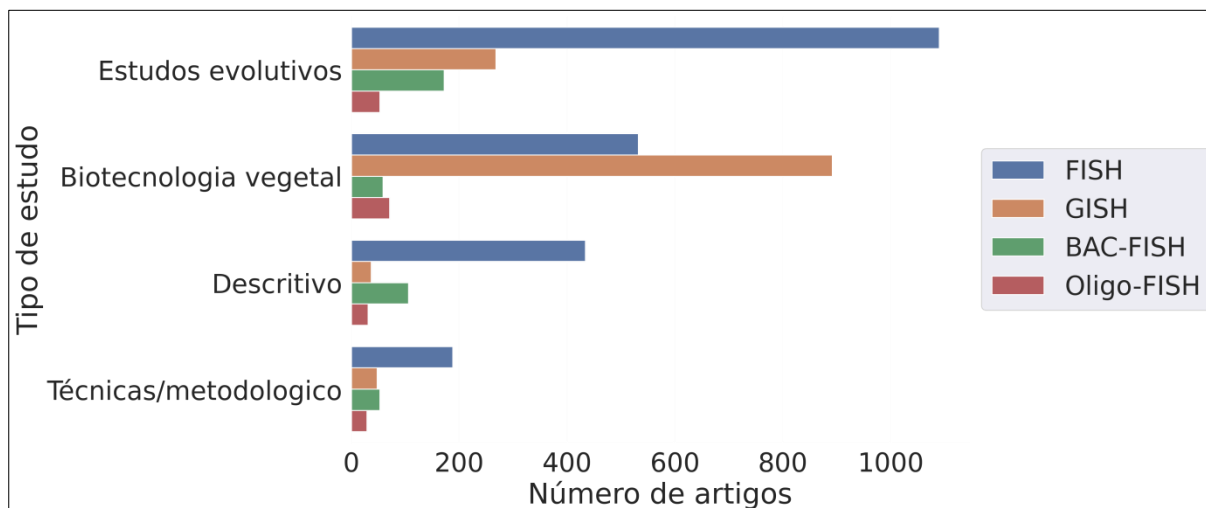


Figura 9. As quatro variações da técnica FISH mais utilizadas nos estudos estão sendo representadas nas categorias desenvolvidas para cada tipo de estudo. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

Quais questões evolutivas em plantas a técnica FISH pode ajudar a responder?

Dentre os 1.349 artigos classificados como “Estudos evolutivos”, 152 foram excluídos por não se encaixarem nas categorias e/ou por estarem em duplicatas (Material suplementar 3, totalizando 1.197 artigos). As questões evolutivas respondidas por FISH foram categorizadas como “Plasticidade fenotípica e epigenética”, “Citogenética comparativa”, “Diversificação”, “Evolução do genoma”, “Sistemática e citotaxonomia” e “Evolução e diversificação de plantas cultivadas” (Tabela 2). A figura 10 apresenta a quantidade de artigos classificados dentro de cada uma dessas categorias, com destaque para os estudos do tipo “Evolução do genoma”, que apresenta o maior número de artigos. Diante disso, pode-se concluir que uma das principais contribuições da FISH para estudos evolutivos em plantas tem sido no entendimento da estrutura e composição (por exemplo, na identificação e localização de DNA repetitivo) dos cromossomos.

Tabela 2. Questões evolutivas respondidas por FISH em seis diferentes categorias. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

| Questões evolutivas respondidas por FISH | Significado |
|--|---|
| Plasticidade fenotípica e epigenética | Fatores que podem contribuir para a especiação. Plasticidade fenotípica: capacidade de um genótipo único exibir uma gama de fenótipos em resposta à variação no ambiente. Epigenética: estuda mudanças no fenótipo que não são causadas por alterações na sequência de DNA |
| Citogenética comparativa | Comparação entre cariótipos e/ou cromossomos para identificar possíveis alterações responsáveis por contribuir para a separação de espécies e gêneros distintos. Abrange alterações cromossômicas, heterogeneidade cariotípica, mapeamento comparativo, questões taxonômicas e biogeográficas. Esse tópico também abrange: variação intraespecífica, ou seja, variação populacional ou de níveis taxonômicos infraespecíficos (táxon de hierarquia abaixo das espécies: subespécies, raças ou variedades, acessos) e variação interespecífica que inclui a diversidade genética de mais de uma espécie. |
| Diversificação | Diversificação cariotípica durante a evolução de diferentes gêneros e espécies. Essa categoria abrange principalmente grupos acima do nível de espécie com relação de ancestralidade e descendência definida. |
| Evolução do genoma | Estudos sobre evolução molecular (cromossomo). Identificação de ampliações de DNA repetitivo, assim como modificações estruturais cromossômicas, como translocações, inversões. |
| Sistemática e citotaxonomia | Sistemática: ciência que classifica os seres vivos através do estudo comparativo de suas características, aspectos e fenômenos morfológicos, fisiológicos, genéticos e evolutivos com o objetivo de reconstruir seu histórico evolucionário a partir das relações e afinidades entre os diversos grupos de espécies. Citotaxonomia: Estudo das relações naturais e da classificação de organismos por métodos que combinam técnicas sistemáticas clássicas com estudos comparativos de cromossomos. Artigos sobre a delimitação de espécies ou estudos de especiação aplicando métodos de sistemática filogenética. |

Evolução e diversificação de plantas cultivadas

Evolução de morfotipos e genótipos de plantas cultivadas. Estudos do processo de domesticação de plantas.

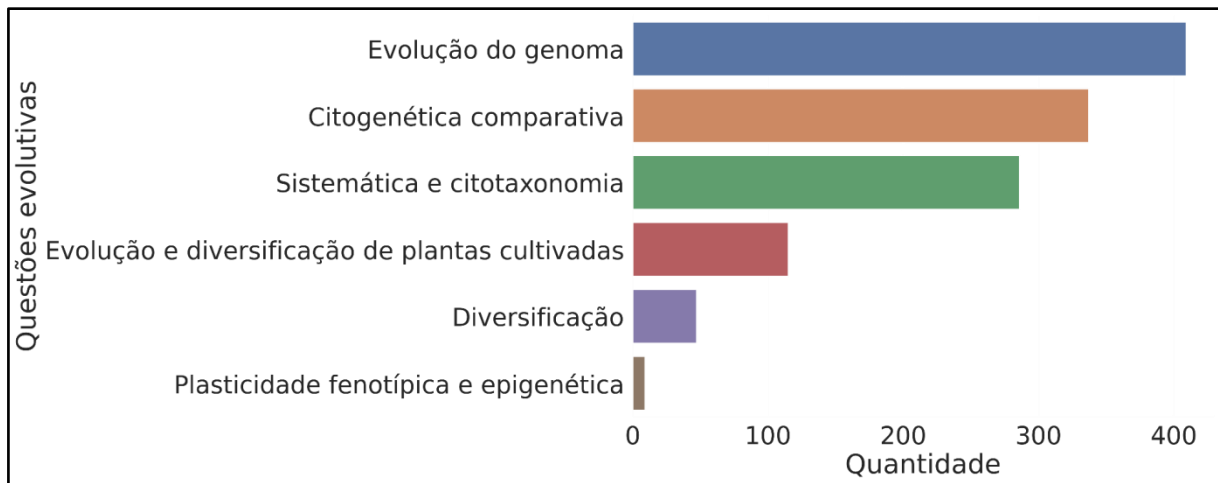


Figura 10. Questões evolutivas respondidas por FISH em seis diferentes categorias. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

As principais famílias botânicas encontradas nos Estudos evolutivos foram representadas nas seis diferentes categorias desenvolvidas para responder às questões evolutivas por meio da técnica FISH (Figura 11). A família Poaceae foi a mais estudada em todas as categorias, seguida da Leguminosae, e as famílias Asteraceae, Solanaceae e Brassicaceae foram as menos estudadas e apresentaram variações em relação a sua predominância nas categorias.

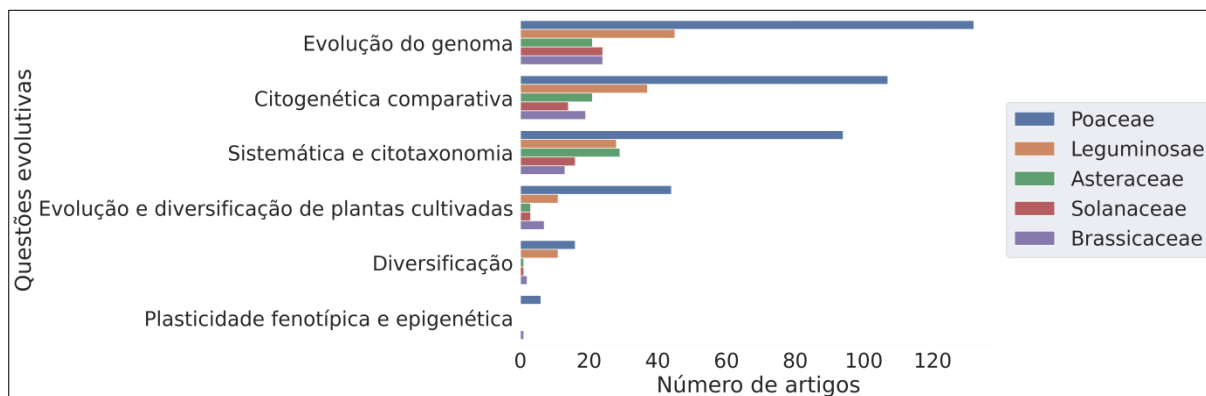


Figura 11. As cinco famílias botânicas mais encontradas nos estudos representadas nas seis diferentes categorias desenvolvidas para responder às questões evolutivas por meio da técnica FISH. Os dados são provenientes de uma busca de artigos publicados, entre os anos de 1975 e 2020, na base *Scopus*.

Discussão

O crescimento de estudos que utilizam a FISH como ferramenta ao longo do tempo (Figura 1) foi possível devido ao surgimento de tecnologias que contribuíram para uma melhoria no desenvolvimento de sondas, tais como a técnica de reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* – PCR), desenvolvida na década de 80 por (MULLIS, KARY B. AND FALOONA, 1987) e pelo surgimento, em 2005, do sequenciamento de próxima geração (do inglês *Next Generation Sequencing* - NGS) (JARVIE, 2005). Essas técnicas contribuíram para a identificação de regiões alvo do genoma, para as quais primers (iniciadores) são desenhados e as sondas de interesse são disponibilizadas.

Sendo assim, o desenvolvimento da FISH por volta de 1970 somado às contribuições dessas tecnologias e metodologias, permitiu que um crescimento de novas variações da técnica fossem desenvolvidas e modificadas para o uso em plantas (CUADRADO; GOLCZYK; JOUVE, 2009; SHE et al., 2007), aumentando as possibilidades de aplicação e estudos nessa área, o que justifica o pico de estudos por volta de 2010 (Figura 1). A maior disponibilidade de recursos genômicos e bioinformáticos abriu possibilidades de inovações e

desenvolvimento de novos softwares (HERSHBERG et al., 2021; ZHANG et al., 2021), abrindo espaço para projetar sondas oligo sintéticas de maneira mais rápida e barata, e assim, contribuir para a versatilidade e atualização da FISH em plantas (JIANG, 2019).

A análise das palavras-chave revela uma mudança no uso de termos ao longo do tempo, pois as palavras-chave "immunolocalization", "biotin labeling", "digoxigenin" se referem às marcações indiretas realizadas em plantas anteriormente aos anos 2000, por isso estão representados em roxo escuro na figura 2. Esse padrão histórico pode ser representado por estudos realizados por volta de 1985, quando sondas de DNA marcadas de forma indireta (ou imunofluorescência indireta) foram aplicadas em cromossomos de trigo (RAYBURN; GILL, 1985, 1986). A partir de 1989, sequências de DNA repetitivo foram identificadas por meio da detecção indireta, por meio de biotina e/ou digoxigenina, como em tomate (LAPITAN; GANAL; TANKSLEY, 1989) e *Arabidopsis thaliana* (MALUSZYNSKA, J.; HESLOP-HARRISON, 1991). Em 1989, foi aplicado pela primeira vez em plantas a técnica de Hibridização Genômica *in situ* (GISH, sigla em inglês de *Genomic In Situ Hybridization*), em que se utiliza o DNA genômico como sonda (SCHWARZACHER et al., 1989). Posteriormente, sequências de DNA repetitivo foram amplamente estudadas em espécies de Triticeae (ANAMTHAWAT-JÓNSSON; HESLOP-HARRISON, 1993; JIANG; GILL, 1994). Desta forma, os termos como "fish", "genomic in situ hybridization", "gish", "wheat", "rdna", "rice", "brassica napus", encontrados em uma coloração mais clara (azul/verde claro) remetem a esse período de desenvolvimento de novas técnicas entre 1989 – 2000 e à sua crescente utilização nos anos seguintes entre 2006 – 2010 (Figura 2).

A partir de 2012 técnicas utilizando sondas baseadas em oligos sintéticos começaram a ser cada vez mais utilizadas em plantas para substituir procedimentos convencionais de preparações de sondas (amplificações em plasmídeos, extração e marcação) que exigiam mais

tempo e trabalho. Desta forma, a síntese de oligonucleotídeos começou a ganhar espaço nos estudos (TANG; YANG; FU, 2014), o que explica o uso dos termos “oligo-fish” e “oligonucleotide probes” mais recentemente, destacados em amarelo e verde na Figura 2.

É possível observar uma representatividade dos países do hemisfério norte em produção de conhecimento se comparado aos do hemisfério sul. A liderança da China (Figura 3) em quantidade de estudos utilizando a técnica FISH em plantas se deve ao fato da sua prioridade em investir em ciência, tecnologia e inovação para levantar melhorias na sustentabilidade das suas áreas rurais, realizando modificações nos setores de sementes, biotecnologia e processamento (MONTE; LOPES; CONTINI, 2017). Foi observado que em anos anteriores a China não apresentava um alto investimento na área de biologia molecular de plantas correspondente ao que se era necessário (SHAO; CHU, 2005), e a partir dessa perspectiva, observou-se que recentemente houve uma mudança nesse parâmetro, e assim, foi encontrado um crescimento nas pesquisas dessa área (GARRIDO-CARDENAS; MESA-VALLE; MANZANO-AGUGLIARO, 2018). Como resultado, maiores investimentos em áreas correlatas foram realizados, promovendo o desenvolvimento de novas tecnologias interdisciplinares.

A produção científica da China apresentou um crescimento ao longo dos anos, sendo publicados artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, apresentando entre 2017-2019 os EUA como seu principal colaborador (UNESCO, 2021). Dentre as colaborações internacionais, 11% contêm ao menos um autor do Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul (BRICS). O principal parceiro do Brasil é a China, com 6,4% da produção brasileira associada a artigos com, pelo menos, um autor de cada um dos dois países (CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS - MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, 2021). Por sua vez, o maior investimento e maior produção científica, mesmo que em todas as áreas do

conhecimento, reflete em uma maior produção de estudos em diferentes áreas, como a de citogenética molecular.

As famílias botânicas estudadas nos artigos (Poaceae, Brassicaceae e Leguminosae) (Figura 4) possuem muitas espécies de interesse agrônomo. A família Poaceae apresenta espécies de plantas cosmopolitas, ou seja, que apresentam ampla distribuição geográfica. Brassicaceae também apresenta distribuição geográfica bastante ampla, sendo encontrada principalmente em regiões temperadas e de clima seco dos Hemisférios Norte e Sul (SCALON, V.R. & SOUZA, 2002). As espécies de leguminosas podem ser encontradas em quase todos os ambientes terrestres, como áreas costeiras, montanhas, florestas tropicais, desertos, áreas equatorial e próximo aos polos (BENJAMIM; DIAS DA COSTA; SILVA SANTOS, 2020). Devido ao alto valor agrônomo e ampla distribuição dessas famílias, o alto número de estudos neste trabalho é justificado.

A família Poaceae é considerada economicamente importante devido ao fato de produzirem os alimentos básicos do mundo, como milho, trigo, arroz e cevada, além de fornecerem forragem, materiais de construção (bambu, palha) e combustível (etanol). O trigo é uma fonte básica de nutrientes para cerca de 40% da população mundial, e umas das culturas mais cultivadas e comercializadas no mundo. A cevada é usada principalmente para alimentação animal e para fabricação de cerveja (GIRALDO et al., 2019). Sabendo disso, o aumento acelerado da produção tanto de trigo e cevada (GIRALDO et al., 2019) requerem estratégias de melhoramento genético para desenvolver variedades mais resistentes e com alto rendimento sem necessidade de insumos (fertilizantes). A partir dessas informações, foram encontrados estudos de introgressão de genomas para melhoramento (NARANG et al., 2020; SINGH et al., 2020) e para conferir resistência a patógenos no trigo (KWiatek et al., 2020;

SINGH et al., 2020), assim como para outras espécies (IDZIAK-HELMCKE et al., 2020; MA et al., 2019; WANG et al., 2020).

A família Brassicaceae também apresenta espécies de grande importância econômica que abrange desde alimentos (couve-rábano, brócolis, repolho, nabo e couve-flor), forragens, culturas de alto rendimento, até espécies com valor farmacológico (com atividade anticâncer e antioxidante). Nesta família também são encontradas espécies modelo utilizadas para pesquisas, como *Arabidopsis thaliana* e plantas ornamentais (RAZA et al., 2020). Sabe-se que espécies como *Brassica carinata*, *B. juncea* e *B. napus* são cultivadas e formadas após cruzamentos para adquirir caracteres agronômicos desejáveis (RAZA et al., 2020), sendo assim, dentre os estudos encontrados, pode-se observar pesquisas sobre fertilidade e resistência a patógenos a partir de cruzamentos interespecíficos (KUMARI et al., 2020) e estudos sobre a diversidade intraespecífica em *B. rapa* (conhecido popularmente como nabo) relevada pela variação do tamanho do genoma e genômica comparativa (BOUTTE et al., 2020).

A família Solanaceae se destaca pela sua importância econômica, com várias espécies utilizadas na alimentação como a batata-inglesa (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) e a berinjela (*Solanum melongena* L.). No Brasil, o gênero *Solanum*, o maior e mais diversificado morfologicamente, tem a Mata Atlântica como um dos biomas de grande diversidade do gênero (SAMPAIO et al., 2019). Desta forma, um exemplo de estudo encontrado buscou estudar estratégias de hibridização introgressiva de batata e tomate (GAVRILENKO et al., 2015).

As famílias Leguminosae e Asteraceae, são duas das três maiores famílias de Angiospermas e são alvos de estudos para entender a evolução de grupos pantropicais e diversificação dessas espécies. Possivelmente em função disso, essas famílias estão presentes

majoritariamente nos estudos “Estudos evolutivos” (Figura 4). Um fato curioso é que as espécies de Leguminosae, como soja, ervilha e feijão, que são amplamente cultivadas, não foram encontradas em abundância nos estudos de “Biotecnologia vegetal”, como o esperado, mas estavam presentes majoritariamente na categoria de “Estudos Evolutivos”. Alguns exemplos de “Estudos evolutivos” com a família Leguminosae foram os de citogenética comparativa envolvendo variações cariotípicas de espécies como *Lathyrus* L. (Leguminosae) (ALI; OSMAN, 2020) e sobre a estrutura, sintenia entre cromossomos e identificação de rearranjos em espécies dentro do gênero *Lupinus* L. (Leguminosae) (BIELSKI et al., 2020).

Foram encontrados também estudos de “Sistemática e Citotaxonomia” envolvendo espécies da família Asteraceae. Essa família apresenta complexidades taxonômicas devido a hibridizações interespecíficas que ocorrem entre diferentes espécies. A hibridização interespecífica é facilitada pela poliploidização e apomixia (reprodução assexuada por sementes), fazendo com que os poliploides apomíticos dominem a diversidade taxonômica do gênero e que as espécies diploides se concentrem em regiões específicas (MRÁZ et al., 2019). Dito isso, dentre os estudos encontrados, um descreveu uma espécie diploide para contribuir para o entendimento da diversidade do gênero *Hieracium* s.str. (MRÁZ et al., 2019), e um outro analisou a história evolutiva e diversidade genética de *Hieracium* L.s.str. (Asteraceae), por meio da identificação de parentesco e comparações gerais das frações repetitivas, trazendo como observação que marcadores de evolução muito rápida, como DNA satélite ou elementos transponíveis, não seguem necessariamente padrões de especiação (CHRTEK et al., 2020).

Para responder a diferentes questionamentos, é essencial a escolha da sonda que será vinculada a variação da técnica FISH, promovendo um maior sucesso de análise quanto ao objetivo proposto pelo pesquisador. Devido a isso, as variações da FISH mais encontradas

foram a FISH utilizando sondas de DNA repetitivo, a GISH utilizando sondas de genoma inteiro, BAC-FISH com sondas *locus*-específica e oligo-FISH que pode incluir tanto sondas de DNA repetitivo quanto *locus*-específica (Figura 5 e 6). A marcação indireta (2.912 observações) (Figura 7) se apresentou como a marcação mais utilizada do que a direta (1.121 observações no total), devido à facilidade de desenvolvimento de sondas no próprio laboratório dados os avanços de novas tecnologias e softwares (NOVÁK et al., 2013, 2017) para essa finalidade.

O uso de sondas de DNA repetitivo tem sido bastante aplicado para responder questões evolutivas em plantas (Figura 9). É observado que a reorganização estrutural cromossômica pode estar associada a regiões heterocromáticas compostas de sequências de DNA repetitivo (SILJAK-YAKOVLEV et al., 2017), que se encontra em abundância nos genomas vegetais e que estão sujeitas a rápidas mudanças nas sequências ou no número de cópias, tendo efeitos na função e evolução cromossômica e dos genomas (ZHU et al., 2016). Sequências repetitivas podem evoluir rapidamente ou serem mais conservadas, e dessa forma, podem ser específicas da espécie ou estar em muitas dentro de uma família taxonômica ou várias famílias (MEHROTRA; GOYAL, 2014).

Em relação aos tipos de estudos categorizados como “Biotecnologia vegetal” e “Estudos evolutivos”, observa-se que o uso de sondas de genoma inteiro (GISH) são utilizadas para detecção genômica em híbridos e poliplóides, que são eventos chave na evolução das plantas e no melhoramento vegetal e também na identificação de eventos que possam levar a outras complexidades no genoma, como a disploidia (JOHNEN et al., 2020). Uma das técnicas que também se destaca nas pesquisas é a denominada BAC-FISH, que utiliza sondas *locus*-específicas. Essa variação possibilita realizar mapeamentos genéticos ou citogenéticos comparativos (JIANG; GILL, 2006), consegue detectar diversificações nas

estruturas cariotípicas e rearranjos estruturais (BIELSKI et al., 2020; FERRAZ; FONSÊCA; PEDROSA-HARAND, 2020), e por isso, uma diversidade de aplicações são possíveis, desde sua utilização em estudos evolutivos até melhoramento vegetal.

Assim como a BAC-FISH, a técnica Oligo-FISH também se encontra em todos os tipos de estudos, mas em menor quantidade. Observa-se que recentemente a Oligo-FISH está ganhando mais atenção e lugar nas pesquisas científicas (JIANG, 2019) (Figura 9). Essa variação utiliza de sondas que podem ser projetadas a partir de elementos de DNA repetitivos ou de sequências de DNA de cópia única, mudando perspectivas tradicionais limitadas e sendo utilizadas para responder a diferentes problemas nos estudos com plantas (JIANG, 2019). O uso de pools desses oligos permitem a rotulagem de parte ou de um cromossomo completo (BIELSKI et al., 2020) e sua síntese pode ser dada através de fontes comerciais recém-disponíveis (AGRAWAL et al., 2020).

Os “Estudos evolutivos” representam 33,7% da amostra total selecionada para este artigo (Figura 10), sendo dividida em sete categorias diferentes. As denominadas como “Evolução do genoma”, “Citogenética comparativa” e “Sistemática e citotaxonomia” apresentaram os maiores números de artigos (Figura 10). A técnica FISH está sendo amplamente utilizada em estudos evolutivos, podendo ser uma ótima ferramenta de análise para eventos de duplicação/amplificação do genoma, revelar sintenia de cromossomos homeólogos em diferentes espécies (JIANG, 2019), assim como localizar regiões conservadas, alterações estruturais e/ou numéricas no genoma, abrangendo as relações intraespecíficas e interespecíficas, identificação de parentescos e processos celulares que levam a mudanças no genoma como a diploidização e poliploidização.

Foi possível observar que a FISH é utilizada para entender e responder aos processos que levam a evolução do genoma das diferentes espécies de plantas (Figura 10). A técnica

permite identificar modificações estruturais cromossômicas, como ampliações de DNA repetitivo, translocações e inversões, que são responsáveis pelos processos evolutivos que ocorrem nas plantas. O DNA repetitivo constitui uma grande proporção do genoma das plantas, e o entendimento da sua organização e disposição fornecem informações importantes para os estudos de “Evolução do genoma” de diferentes espécies, como as da família Poaceae (OURARI et al., 2020; YANG et al., 2020) e Leguminosae (RIBEIRO et al., 2017; XU et al., 2020) (Figura 11).

A FISH também possibilita identificar heterogeneidades no cariótipo de diferentes espécies por meio de estudos de “Citogenética comparativa” (Figura 10), utilizando de variações da técnica como oligo-FISH e BAC-FISH (BIELSKI et al., 2020). Desta forma, é possível analisar as diversidades intraespecíficas e interespecíficas, observando variantes polimórficas para cada espécie estudada, como no caso da família Poaceae (SONG et al., 2020) (Figura 11).

O uso da FISH nos estudos de “Sistemática e Citotaxonomia” (Figura 10) permitiu reconstruir o histórico evolutivo a partir das relações e afinidades entre os diversos grupos de espécies, por meio de métodos que combinam técnicas sistemáticas clássicas com estudos comparativos de cromossomos (MATA-SUCRE et al., 2020). Desta forma, foi possível avaliar a origem e a diversidade genética de diferentes táxons (CHRTEK et al., 2020; MRÁZ et al., 2019). Estudos que apresentavam foco nos processos de hibridização (KONO; CHUNG; PENG, 2012), e de irradiação (GARNATJE et al., 2012), também foram encontrados.

Os estudos de “Evolução e diversificação de plantas cultivadas” (Figura 10) abrangem pesquisas que contribuíram para o entendimento de processos evolutivos envolvidos na origem de diferentes culturas (SEIJO et al., 2018), assim como incluiu estudos com intuito de

avaliar instabilidades cromossômicas e de padrões de herança em espécies agronomicamente importantes (MAJKA et al., 2019).

Em relação aos estudos que apresentavam como foco a “Diversificação”, foi possível observar pesquisas que incluíram a diversificação citomolecular de gêneros como *Stylosanthes* e seu gênero irmão *Arachis* (Leguminosae) (FRANCO et al., 2020), como também foram encontradas investigações sobre o comportamento de DNA repetitivo dentro de seis cereais importantes (Poaceae) e a partir disso, informações sobre a diversificação e amplificação espécie-específica dessas regiões foram relatadas (KÖGLER; SCHMIDT; WENKE, 2017).

Para responder a questões de “Plasticidade fenotípica e epigenética” (Figura 10), a FISH também pôde ser utilizada como contribuição nos estudos de estrutura, expressão e paisagem epigenética de DNA repetitivo em espécies da família Poaceae (BENSON; MAO; HUFF, 2021; BOROWSKA-ZUCHOWSKA et al., 2020). Outro exemplo de estudo encontrado dentro dessa categoria propôs que a plasticidade da cromatina de *Arabidopsis* está associada à sua aclimatação ao ambiente (TESSADORI et al., 2009).

Conclusões

Foi observado um crescimento na produção de artigos durante os anos 1975 – 2020 devido ao surgimento de tecnologias e metodologias, como a PCR e NGS, que facilitaram o desenvolvimento de sondas e diferentes modos de marcações, e por isso, um pico nas publicações foi observado por volta de 2010, provavelmente devido ao aumento de possibilidades geradas através desses avanços. Foram observadas palavras-chave como “biotin labeling”, utilizadas no início do desenvolvimento da FISH devido ao uso da marcação indireta em espécies de plantas. Foram encontradas também palavras-chave como

“gish”, que remetem às modificações da técnica e avanços da FISH. Já palavras-chave como “oligo-fish”, que remetem à utilização de sondas oligo-sintéticas, começaram a se destacar. É possível observar uma falta de representatividade dos países do hemisfério sul em relação à quantidade de estudos encontrados. Os países que apresentaram maior quantidade de estudos foram China e EUA, com o Brasil na 8ª posição. A liderança da China está relacionada ao seu investimento em ciência e tecnologia para levantar melhorias das suas áreas rurais e pelo seu direcionamento nos estudos de biologia molecular e agricultura.

As famílias mais estudadas foram Poaceae, Brassicaceae e Leguminosae, o que pode ser explicado pelo fato de possuírem muitas espécies de importância econômica, com várias utilizadas principalmente na alimentação. As técnicas GISH e FISH com sondas de DNA repetitivo e a marcação indireta foram as mais utilizadas. Esse fato deve principalmente devido à importância da contribuição da GISH nos estudos de detecção genômica em híbridos e poliplóides, que são eventos chave na evolução das plantas e no melhoramento vegetal, como também de estudos que envolvem o DNA repetitivo, já que apresentam efeitos diretos na evolução cromossômica e dos genomas.

Foram selecionados 1.197 artigos classificados como “Estudos evolutivos”, sendo que a família Poaceae foi a mais estudada, seguida da Leguminosae. A técnica FISH está sendo amplamente utilizada para entender e responder aos processos que levam a evolução do genoma das diferentes espécies de plantas, identificar heterogeneidades no cariótipo e reconstruir o histórico evolutivo a partir das relações e afinidades entre os diversos grupos de espécies.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro do PRONEM “Identificação de barreiras entre populações e espécies de plantas do Cerrado: uma abordagem integrada”, aprovado na chamada pública 06/2017 CNPq/FAPEG, e também o apoio do INCT “Instituto Nacional de Ciência & Tecnologia” em Ecologia, Evolução e Conservação da Biodiversidade (EECBio), aprovado pela chamada pública MCTI/CNPq/CAPES/FAPs 016/2014 CNPq/FAPEG. Agradecemos também a agência de fomento CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Referências

- AGRAWAL, N. et al. Identification of Chromosomes and Chromosome Rearrangements in Crop Brassicas and *Raphanus sativus*: A Cytogenetic Toolkit Using Synthesized Massive Oligonucleotide Libraries. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. December, p. 1–15, 2020.
- ALI, H. B. M.; OSMAN, S. A. Ribosomal DNA localization on *Lathyrus* species chromosomes by FISH. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2020.
- ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; HESLOP-HARRISON, J. S. Isolation and characterization of genome-specific DNA sequences in Triticeae species. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 240, n. 2, p. 151–158, 1993.
- BENJAMIM, J. K. F.; DIAS DA COSTA, K. A.; SILVA SANTOS, A. Chemical, Botanical and Pharmacological Aspects of the Leguminosae. **Pharmacognosy Reviews**, v. 14, n. 28, p. 106–120, 2020.
- BENSON, C. W.; MAO, Q.; HUFF, D. R. Global DNA methylation predicts epigenetic reprogramming and transgenerational plasticity in *Poa annua* L. **Crop Science**, v. 61, n. 5, p. 3011–3022, 2021.
- BHAT, T. A.; WANI, A. A. Chromosome structure and aberrations. **Chromosome Structure and Aberrations**, p. 1–367, 2017.
- BIELSKI, W. et al. The puzzling fate of a lupin chromosome revealed by reciprocal oligo-fish and bac-fish mapping. **Genes**, v. 11, n. 12, p. 1–17, 2020.

- BOROWSKA-ZUCHOWSKA, N. et al. The fate of 35S rRNA genes in the allotetraploid grass *Brachypodium hybridum*. **Plant Journal**, v. 103, n. 5, p. 1810–1825, 2020.
- BOUTTE, J. et al. Genome Size Variation and Comparative Genomics Reveal Intraspecific Diversity in *Brassica rapa*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. November, p. 1–13, 2020.
- CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS - MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E I. **Panorama da ciência brasileira : 2015-2020. Boletim Anual OCTI**. [s.l.: s.n.]. v. 1
- CHRTEK, J. et al. Evolutionary history and genetic diversity of apomictic allopolyploids in *Hieracium* s.str.: morphological versus genomic features. **American Journal of Botany**, v. 107, n. 1, p. 66–90, 2020.
- CORRÊA, C. T. R. et al. GISH-based comparative genomic analysis in *Urochloa P. Beauv.* **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 2, p. 887–896, 2020.
- CUADRADO, Á.; GOLCZYK, H.; JOUVE, N. A novel, simple and rapid nondenaturing FISH (ND-FISH) technique for the detection of plant telomeres. Potential used and possible target structures detected. **Chromosome Research**, v. 17, n. 6, p. 755–762, 2009.
- FERRAZ, M. E.; FONSÊCA, A.; PEDROSA-HARAND, A. Multiple and independent rearrangements revealed by comparative cytogenetic mapping in the dysploid *Leptostachyus* group (*Phaseolus* L., Leguminosae). **Chromosome Research**, v. 28, n. 3–4, p. 395–405, 2020.
- FRANCO, A. L. et al. Low cytomolecular diversification in the genus *Stylosanthes* sw. (*papilionoideae*, *leguminosae*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 1–12, 2020.
- GARNATJE, T. et al. Swarm of terminal 35S in *Cheirolophus* (*Asteraceae*, *Centaureinae*). **Genome**, v. 55, n. 7, p. 529–535, 2012.
- GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MESA-VALLE, C.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Trends in plant research using molecular markers. **Planta**, v. 247, n. 3, p. 543–557, 2018.
- GAVRILENKO, T. A. et al. Homeologous chromosome pairing in distant allohaploid hybrids of the genus *Solanum*. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 5, n. 3, p. 182–190, 2015.
- GIRALDO, P. et al. Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. **Agronomy**, v. 9, n. 7, 2019.
- GRAPHODATSKY, A. S.; TRIFONOV, V. A.; STANYON, R. The genome diversity and karyotype evolution of mammals. **Molecular Cytogenetics**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2011.
- HERSHBERG, E. A. et al. PaintSHOP enables the interactive design of transcriptome- and genome-scale oligonucleotide FISH experiments. **Nature Methods**, v. 18, n. 8, p. 937–944, 2021.
- HUBER, D.; VOITH VON VOITHENBERG, L.; KAIGALA, G. V. Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? **Micro**

and Nano Engineering, v. 1, p. 15–24, 2018.

IDZIAK-HELMCKE, D. et al. 3-D nucleus architecture in oat × maize addition lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1–22, 2020.

JARVIE, T. Next-generation sequencing technologies. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 3, p. 255–260, 2005.

JIANG, J. Fluorescence in situ hybridization in plants: recent developments and future applications. **Chromosome Research**, v. 27, n. 3, p. 153–165, 2019.

JIANG, J.; GILL, B. S. New 18S·26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. **Chromosoma**, v. 103, n. 3, p. 179–185, 1994.

JIANG, J.; GILL, B. S. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome**, v. 49, n. 9, p. 1057–1068, 2006.

JIANG JIMING; GILL, B. S. Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: The first 10 years. **Genome**, v. 37, n. 5, p. 717–725, 1994.

JOHNEN, L. et al. Allopolyploidy and genomic differentiation in holocentric species of the *Eleocharis montana* complex (Cyperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 306, n. 2, 2020.

KHRUSTALEVA, L. et al. The power of genomic in situ hybridization (GISH) in interspecific breeding of bulb onion (*Allium cepa* L.) resistant to downy mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.). **Plants**, v. 8, n. 2, 2019.

KÖGLER, A.; SCHMIDT, T.; WENKE, T. Evolutionary modes of emergence of short interspersed nuclear element (SINE) families in grasses. **Plant Journal**, v. 92, n. 4, p. 676–695, 2017.

KONO, Y.; CHUNG, M. C.; PENG, C. I. Identification of genome constitutions in *Begonia × chungii* and its putative parents, *B. longifolia* and *B. palmata*, by genomic in situ hybridization (GISH). **Plant Science**, v. 185–186, p. 156–160, 2012.

KUMARI, P. et al. Development of a Yellow-Seeded Stable Allohexaploid Brassica Through Inter-Generic Somatic Hybridization With a High Degree of Fertility and Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. November, p. 1–12, 2020.

KWIATEK, M. T. et al. Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2Sk Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschyi* Boiss. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. December, p. 1–14, 2020.

LAPITAN, N. L. V.; GANAL, M. W.; TANKSLEY, S. D. Somatic chromosome karyotype of tomato based on in situ hybridization of the TGRI satellite repeat. **Genome**, v. 32, n. 6, p. 992–998, 1989.

LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R.; HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of plant DNA

sequences by simultaneous in situ hybridization of two differently labelled fluorescent probes. **Genome**, v. 34, n. 3, p. 329–333, 1991.

LIEHR, T. et al. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 3, p. 251–255, 2013.

LIEHR, T. **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Application Guide Second Edition**. [s.l.: s.n.].

LIEHR, T. Molecular Cytogenetics in the Era of Chromosomics and Cytogenomic Approaches. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. October, p. 1–9, 2021.

MA, X. et al. Pairing and exchanging between *Daypyrum villosum* chromosomes 6v#2 and 6v#4 in the hybrids of two different wheat alien substitution lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 1–16, 2019.

MAJKA, J. et al. Cytogenetic and molecular genotyping in the allotetraploid *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrids. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1–17, 2019.

MALUSZYNSKA, J.; HESLOP-HARRISON, J. S. Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 1, n. 2, p. 159–166, 1991.

MATA-SUCRE, Y. et al. Revisiting the cytomolecular evolution of the *Caesalpinia* group (Leguminosae): a broad sampling reveals new correlations between cytogenetic and environmental variables. **Plant Systematics and Evolution**, v. 306, n. 2, 2020.

MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 164–171, 2014.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 7, 2009.

MONTE, D. DE C.; LOPES, D. B.; CONTINI, E. China: Nova potência também no agronegócio. **Revista de Política Agrícola**, v. 26, n. 3, p. 107–123, 2017.

MRÁZ, P. et al. An unexpected new diploid *Hieracium* from Europe: Integrative taxonomic approach with a phylogeny of diploid *Hieracium* taxa. **Taxon**, v. 68, n. 6, p. 1258–1277, 2019.

MULLIS, KARY B. AND FALOONA, F. A. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335–350, 1987.

NARANG, D. et al. Discovery and characterisation of a new leaf rust resistance gene introgressed in wheat from wild wheat *Aegilops peregrina*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

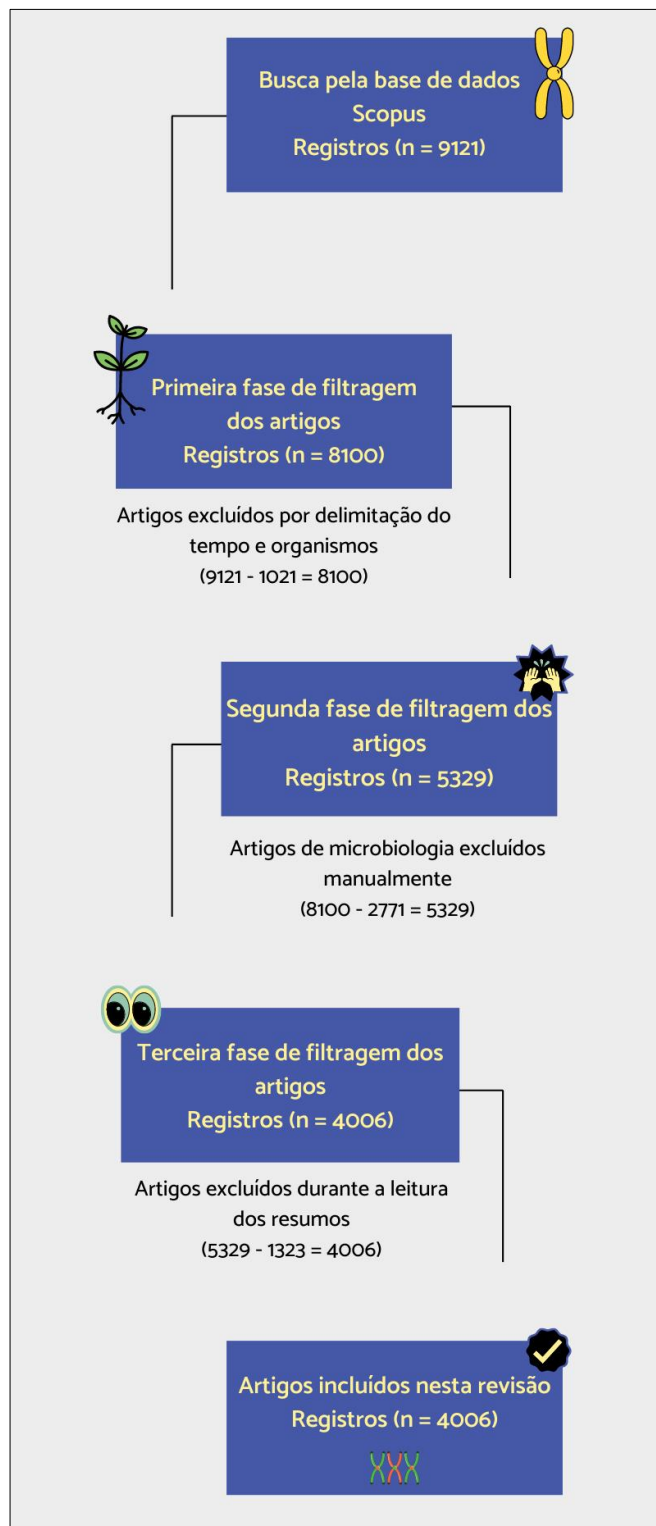
NOVÁK, P. et al. RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, n. 6, p. 792–793, 2013.

- NOVÁK, P. et al. TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 12, 2017.
- OURARI, M. et al. Screening diversity and distribution of Copia retrotransposons reveals a specific amplification of BARE1 elements in genomes of the polyploid *Hordeum murinum* complex. **Genetica**, v. 148, n. 2, p. 109–123, 2020.
- PARRA, M. R.; COUTINHO, R. X.; PESSANO, E. F. C. Um Breve Olhar Sobre a Cienciometria: Origem, Evolução, Tendências E Sua Contribuição Para O Ensino De Ciências. **Revista Contexto & Educação**, v. 34, n. 107, p. 126–141, 2019.
- RAYBURN, A. L.; GILL, B. S. Use of biotin-labeled probes to map specific dna sequences on wheat chromosomes. **Journal of Heredity**, v. 76, n. 2, p. 78–81, 1985.
- RAYBURN, A. L.; GILL, B. S. Molecular identification of the D-genome chromosomes of wheat. **Journal of Heredity**, v. 77, n. 4, p. 253–255, 1986.
- RAZA, A. et al. **The Plant Family Brassicaceae**. [s.l.] Springer Singapore, 2020.
- RIBEIRO, T. et al. Evolutionary dynamics of satellite DNA repeats from Phaseolus beans. **Protoplasma**, v. 254, n. 2, p. 791–801, 2017.
- RUPRECHT, C. et al. Revisiting ancestral polyploidy in plants. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. 1–7, 2017.
- SAMPAIO, V. et al. Flora do Ceará, Brasil: Solanum (Solanaceae). **Rodriguésia**, v. 70, n. e02512017, p. 27, 2019.
- SCALON, V.R. & SOUZA, V. C. BRASSICACEAE. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, v. 2, p. 57–64, 2002.
- SCHWARZACHER, T. et al. In Situ localization of parental genomes in a wide hybrid. **Annals of Botany**, v. 64, n. 3, p. 315–324, 1989.
- SEJO, J. G. et al. Karyotype stability and genome-specific nucleolar dominance in peanut, its wild 4× ancestor, and a synthetic AABB polyploid. **Crop Science**, v. 58, n. 4, p. 1671–1683, 2018.
- SHAO, H.; CHU, L. Plant molecular biology in China: Opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 23, n. 4, p. 345–358, 2005.
- SHE, C. et al. The Distribution of Repetitive DNAs Along Chromosomes in Plants Revealed by Self-genomic in situ Hybridization. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 5, p. 437–448, 2007.
- SILJAK-YAKOVLEV, S. et al. Evolutionary implications of heterochromatin and rDNA in chromosome number and genome size changes during dysploidy: A case study in *Reichardia* genus. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–21, 2017.
- SINGH, A. K. et al. Development and molecular cytogenetic characterization of *Thinopyrum*

- bessarabicum introgression lines in hexaploid and tetraploid wheats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, n. 7, p. 2117–2130, 2020.
- SONG, Z. et al. Analysis of Structural Genomic Diversity in *Aegilops umbellulata*, *Ae. markgrafii*, *Ae. comosa*, and *Ae. uniaristata* by Fluorescence In Situ Hybridization Karyotyping. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. June, p. 1–17, 2020.
- SZELES, A. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the molecular cytogenetics of cancer. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 49, n. 1, p. 69–80, 2002.
- TANG, Z.; YANG, Z.; FU, S. Oligonucleotides replacing the roles of repetitive sequences pAs1, pSc119.2, pTa-535, pTa71, CCS1, and pAWRC.1 for FISH analysis. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 3, p. 313–318, 2014.
- TEAM, R. C.; AL., E. R: A language and environment for statistical computing. v. 2, p. 1–12, 2016.
- TESSADORI, F. et al. PHYTOCHROME B and HISTONE DEACETYLASE 6 control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 9, p. 14–17, 2009.
- UMAN, L. S. Systematic Reviews and Meta-Analyses. **J Can Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 57–59, 2011.
- UNESCO. **Science Report: The Race Against Time for Smarter Development**. , 2021.
- WANG, Y. et al. Cytogenetic Analysis and Molecular Marker Development for a New Wheat–*Thinopyrum ponticum* 1Js (1D) Disomic Substitution Line With Resistance to Stripe Rust and Powdery Mildew. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. August, p. 1–13, 2020.
- WICKHAM, H. Data Analysis 9.1. p. 189–201, 2016.
- WILT, T. J.; FINK, H. A. Systematic reviews and meta-analyses. **Clinical Research Methods for Surgeons**, n. February, p. 311–325, 2007.
- XU, W. et al. The genome evolution and low-phosphorus adaptation in white lupin. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.
- YANG, S. et al. Sequence evolution, abundance, and chromosomal distribution of ty1-copia retrotransposons in the *saccharum spontaneum* genome. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 5, p. 272–282, 2020.
- YOUNIS, A. et al. FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 9, p. 1477–1488, 2015.
- ZHANG, T. et al. Chorus2: design of genome-scale oligonucleotide-based probes for fluorescence in situ hybridization. **Plant Biotechnology Journal**, v. 19, n. 10, p. 1967–1978, 2021.
- ZHU, Q. et al. Repetitive sequence analysis and karyotyping reveal different genome

evolution and speciation of diploid and tetraploid *Tripsacum dactyloides*. **Crop Journal**, v. 4, n. 4, p. 247–255, 2016.

Material suplementar



Material suplementar 1. Diagrama de fluxo baseado no PRISMA contendo detalhes sobre o número de documentos incluídos e excluídos nas fases de filtragem.

Material suplementar 2. Organização e extração de dados dos artigos selecionados. Link: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1S-4ZP1Oom2dLCYS29UHgIuQCXL61kVXt/edit?usp=sharing&ouid=105169368009913374260&rtpof=true&sd=true>

Material suplementar 3. Organização e extração de dados dos artigos dentro de “Relações evolutivas”. Link: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1S-4ZP1Oom2dLCYS29UHgIuQCXL61kVXt/edit#gid=816347954>

Material suplementar 4. Gráficos gerados a partir do R Statistical Software utilizando o pacote ggplot2 e a partir da biblioteca Seaborn para a visualização de dados Python para desenhar gráficos estatísticos e seaborn.countplot para gerar as contagens de observações em cada caixa categórica utilizando barras. Links: <https://drive.google.com/file/d/1z9jrfCKypK4Gp3VzIqy3URq7roy3e1rV/view?usp=sharing> e <https://drive.google.com/file/d/1rXAgOh3bVz70b8uyLO6IFv8H83JE3lgl/view?usp=sharing>

Material suplementar 5. Tabela com as famílias botânicas encontradas nos estudos selecionados para a revisão. Link: https://docs.google.com/spreadsheets/d/1K-oAY1fo3JDA3WPJ6dXidMqNp_gQjwmaTAsEB7uN4Gq/edit?usp=sharing

Considerações Finais

A FISH apresenta ampla aplicação nas diversas áreas do conhecimento, assim como, dentro da citogenética vegetal. Atualmente, regiões cromossômicas podem ser identificadas e localizadas com precisão, possibilitando a caracterização de novos genes e espécies, realização de inferências evolutivas através de mapeamentos citogenéticos comparativos, e até o diagnóstico de doenças. Em função da versatilidade da técnica, ela continua ganhando novos formatos e aplicações, o que indica sua adaptabilidade aos avanços tecnológicos e que não fique defasada.

Desta forma, o entendimento da técnica somado ao seu desenvolvimento e modificações metodológicas, contribuíram para a sua versatilidade e utilização atualmente. A partir da

síntese de artigos publicados foi possível demonstrar as principais contribuições da FISH nos estudos com plantas. Foi observado um crescimento nas pesquisas científicas com a utilização dessa técnica ao longo dos anos de 1975 – 2020, com um pico nas publicações por volta de 2010. Palavras-chave indicaram o início do desenvolvimento da técnica (“biotin labeling”), marcaram seus avanços (“gish”) e ressaltaram as novas pesquisas que estão surgindo (“oligo-fish”).

Os estudos se concentram na China e EUA devido ao maior investimento na ciência e tecnologia. Famílias botânicas como Poaceae, Brassicaceae e Leguminosae se destacam nos estudos por apresentarem muitas espécies com alta importância econômica. Houve destaque da técnica GISH que, por exemplo, pode contribuir nos estudos de detecção genômica em híbridos e poliploides, e a FISH com sondas de DNA repetitivo nos estudos de evolução genômica. Por fim, foi possível identificar que a técnica FISH está respondendo principalmente aos processos que levam a evolução do genoma e heterogeneidades no cariótipo de diferentes espécies, como também está possibilitando reconstruir o histórico evolutivo entre diversos grupos de espécies.

Dito isso, espera-se que o entendimento geral de como essa técnica está sendo aplicada direcione novas pesquisas com diferentes perspectivas de análise e manejo das espécies vegetais. Espera-se também que as informações obtidas a partir das principais questões evolutivas contribuam para estudos futuros em citogenética vegetal.

Referências

AGRAWAL, N. et al. Identification of Chromosomes and Chromosome Rearrangements in Crop Brassicas and *Raphanus sativus*: A Cytogenetic Toolkit Using Synthesized Massive Oligonucleotide Libraries. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. December, p. 1–15, 2020.

ALI, H. B. M.; OSMAN, S. A. Ribosomal DNA localization on *Lathyrus* species chromosomes by FISH. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p.

1–9, 2020.

ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; HESLOP-HARRISON, J. S. Isolation and characterization of genome-specific DNA sequences in Triticeae species. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 240, n. 2, p. 151–158, 1993.

BENJAMIM, J. K. F.; DIAS DA COSTA, K. A.; SILVA SANTOS, A. Chemical, Botanical and Pharmacological Aspects of the Leguminosae. **Pharmacognosy Reviews**, v. 14, n. 28, p. 106–120, 2020.

BENSON, C. W.; MAO, Q.; HUFF, D. R. Global DNA methylation predicts epigenetic reprogramming and transgenerational plasticity in *Poa annua* L. **Crop Science**, v. 61, n. 5, p. 3011–3022, 2021.

BHAT, T. A.; WANI, A. A. Chromosome structure and aberrations. **Chromosome Structure and Aberrations**, p. 1–367, 2017.

BIELSKI, W. et al. The puzzling fate of a lupin chromosome revealed by reciprocal oligo-fish and bac-fish mapping. **Genes**, v. 11, n. 12, p. 1–17, 2020.

BOROWSKA-ZUCHOWSKA, N. et al. The fate of 35S rRNA genes in the allotetraploid grass *Brachypodium hybridum*. **Plant Journal**, v. 103, n. 5, p. 1810–1825, 2020.

BOUTTE, J. et al. Genome Size Variation and Comparative Genomics Reveal Intraspecific Diversity in *Brassica rapa*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. November, p. 1–13, 2020.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS - MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E I. **Panorama da ciência brasileira : 2015-2020. Boletim Anual OCTI**. [s.l: s.n.]. v. 1

CHRTEK, J. et al. Evolutionary history and genetic diversity of apomictic allopolyploids in *Hieracium* s.str.: morphological versus genomic features. **American Journal of Botany**, v. 107, n. 1, p. 66–90, 2020.

CORRÊA, C. T. R. et al. GISH-based comparative genomic analysis in *Urochloa* P. Beauv. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 2, p. 887–896, 2020.

CUADRADO, Á.; GOLCZYK, H.; JOUVE, N. A novel, simple and rapid nondenaturing FISH (ND-FISH) technique for the detection of plant telomeres. Potential used and possible target structures detected. **Chromosome Research**, v. 17, n. 6, p. 755–762, 2009.

FERRAZ, M. E.; FONSÊCA, A.; PEDROSA-HARAND, A. Multiple and independent rearrangements revealed by comparative cytogenetic mapping in the dysploid *Leptostachyus* group (*Phaseolus* L., Leguminosae). **Chromosome Research**, v. 28, n. 3–4, p. 395–405, 2020.

FRANCO, A. L. et al. Low cytomolecular diversification in the genus *Stylosanthes* sw. (papilionoideae, leguminosae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 1–12, 2020.

GARNATJE, T. et al. Swarm of terminal 35S in *Cheirolophus* (Asteraceae, Centaureinae). **Genome**, v. 55, n. 7, p. 529–535, 2012.

GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MESA-VALLE, C.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Trends in plant research using molecular markers. **Planta**, v. 247, n. 3, p. 543–557, 2018.

GAVRILENKO, T. A. et al. Homeologous chromosome pairing in distant allohaploid hybrids of the genus *Solanum*. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 5, n. 3, p. 182–190, 2015.

GIRALDO, P. et al. Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. **Agronomy**, v. 9, n. 7, 2019.

GRAPHODATSKY, A. S.; TRIFONOV, V. A.; STANYON, R. The genome diversity and karyotype evolution of mammals. **Molecular Cytogenetics**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2011.

HERSHBERG, E. A. et al. PaintSHOP enables the interactive design of transcriptome- and genome-scale oligonucleotide FISH experiments. **Nature Methods**, v. 18, n. 8, p. 937–944, 2021.

HUBER, D.; VOITH VON VOITENBERG, L.; KAIGALA, G. V. Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? **Micro and Nano Engineering**, v. 1, p. 15–24, 2018.

IDZIAK-HELMCKE, D. et al. 3-D nucleus architecture in oat × maize addition lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1–22, 2020.

JARVIE, T. Next-generation sequencing technologies. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 3, p. 255–260, 2005.

JIANG, J. Fluorescence in situ hybridization in plants: recent developments and future applications. **Chromosome Research**, v. 27, n. 3, p. 153–165, 2019.

JIANG, J.; GILL, B. S. New 18S·26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. **Chromosoma**, v. 103, n. 3, p. 179–185, 1994.

JIANG, J.; GILL, B. S. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome**, v. 49, n. 9, p. 1057–1068, 2006.

JIANG JIMING; GILL, B. S. Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: The first 10 years. **Genome**, v. 37, n. 5, p. 717–725, 1994.

JOHNEN, L. et al. Allopolyploidy and genomic differentiation in holocentric species of the *Eleocharis montana* complex (Cyperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 306, n. 2, 2020.

KHRUSTALEVA, L. et al. The power of genomic in situ hybridization (GISH) in interspecific breeding of bulb onion (*Allium cepa* L.) resistant to downy mildew (peronospora destructor [berk.] casp.). **Plants**, v. 8, n. 2, 2019.

KÖGLER, A.; SCHMIDT, T.; WENKE, T. Evolutionary modes of emergence of short interspersed nuclear element (SINE) families in grasses. **Plant Journal**, v. 92, n. 4, p. 676–695, 2017.

KONO, Y.; CHUNG, M. C.; PENG, C. I. Identification of genome constitutions in *Begonia* × *chungii* and its putative parents, *B. longifolia* and *B. palmata*, by genomic in situ hybridization (GISH). **Plant Science**, v. 185–186, p. 156–160, 2012.

KUMARI, P. et al. Development of a Yellow-Seeded Stable Allohexaploid Brassica Through Inter-Generic Somatic Hybridization With a High Degree of Fertility and Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. November, p. 1–12, 2020.

KWIATEK, M. T. et al. Development and Cytomolecular Identification of Monosomic Alien Addition and Substitution Lines of Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) With 2Sk Chromosome Conferring Leaf Rust Resistance Derived From *Aegilops kotschy* Boiss. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. December, p. 1–14, 2020.

LAPITAN, N. L. V.; GANAL, M. W.; TANKSLEY, S. D. Somatic chromosome karyotype of tomato based on in situ hybridization of the TGRI satellite repeat. **Genome**, v. 32, n. 6, p. 992–998, 1989.

LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R.; HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous in situ hybridization of two differently labelled fluorescent probes. **Genome**, v. 34, n. 3, p. 329–333, 1991.

LIEHR, T. et al. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 3, p. 251–255, 2013.

LIEHR, T. **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Application Guide Second Edition**. [s.l: s.n.].

LIEHR, T. Molecular Cytogenetics in the Era of Chromosomics and Cytogenomic Approaches. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. October, p. 1–9, 2021.

LIU, G.; ZHANG, T. Single copy oligonucleotide fluorescence in situ hybridization probe design platforms: Development, application and evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 2021.

MA, X. et al. Pairing and exchanging between *Daypyrum villosum* chromosomes 6v#2 and 6v#4 in the hybrids of two different wheat alien substitution lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 1–16, 2019.

MAJKA, J. et al. Cytogenetic and molecular genotyping in the allotetraploid *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrids. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1–17, 2019.

MALUSZYNSKA, J.; HESLOP-HARRISON, J. S. Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 1, n. 2, p. 159–166, 1991.

MATA-SUCRE, Y. et al. Revisiting the cytomolecular evolution of the *Caesalpinia* group (Leguminosae): a broad sampling reveals new correlations between cytogenetic and environmental variables. **Plant Systematics and Evolution**, v. 306, n. 2, 2020.

MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 12, n.

4, p. 164–171, 2014.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 7, 2009.

MONTE, D. DE C.; LOPES, D. B.; CONTINI, E. China: Nova potência também no agronegócio. **Revista de Política Agrícola**, v. 26, n. 3, p. 107–123, 2017.

MRÁZ, P. et al. An unexpected new diploid Hieracium from Europe: Integrative taxonomic approach with a phylogeny of diploid Hieracium taxa. **Taxon**, v. 68, n. 6, p. 1258–1277, 2019.

MULLIS, KARY B. AND FALOONA, F. A. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335–350, 1987.

NARANG, D. et al. Discovery and characterisation of a new leaf rust resistance gene introgressed in wheat from wild wheat *Aegilops peregrina*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

NOVÁK, P. et al. RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, n. 6, p. 792–793, 2013.

NOVÁK, P. et al. TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 12, 2017.

OURARI, M. et al. Screening diversity and distribution of Copia retrotransposons reveals a specific amplification of BARE1 elements in genomes of the polyploid *Hordeum murinum* complex. **Genetica**, v. 148, n. 2, p. 109–123, 2020.

PARRA, M. R.; COUTINHO, R. X.; PESSANO, E. F. C. Um Breve Olhar Sobre a Cienciometria: Origem, Evolução, Tendências E Sua Contribuição Para O Ensino De Ciências. **Revista Contexto & Educação**, v. 34, n. 107, p. 126–141, 2019.

RAYBURN, A. L.; GILL, B. S. Use of biotin-labeled probes to map specific dna sequences on wheat chromosomes. **Journal of Heredity**, v. 76, n. 2, p. 78–81, 1985.

RAYBURN, A. L.; GILL, B. S. Molecular identification of the D-genome chromosomes of wheat. **Journal of Heredity**, v. 77, n. 4, p. 253–255, 1986.

RAZA, A. et al. **The Plant Family Brassicaceae**. [s.l.] Springer Singapore, 2020.

RIBEIRO, T. et al. Evolutionary dynamics of satellite DNA repeats from *Phaseolus* beans. **Protoplasma**, v. 254, n. 2, p. 791–801, 2017.

RUPRECHT, C. et al. Revisiting ancestral polyploidy in plants. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. 1–7, 2017.

SAMPAIO, V. et al. Flora do Ceará, Brasil: *Solanum* (Solanaceae). **Rodriguésia**, v. 70, n. e02512017, p. 27, 2019.

SCALON, V.R. & SOUZA, V. C. BRASSICACEAE. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, v. 2, p. 57–64, 2002.

SCHWARZACHER, T. et al. In Situ localization of parental genomes in a wide hybrid. **Annals of Botany**, v. 64, n. 3, p. 315–324, 1989.

SEIJO, J. G. et al. Karyotype stability and genome-specific nucleolar dominance in peanut, its wild 4× ancestor, and a synthetic AABB polyploid. **Crop Science**, v. 58, n. 4, p. 1671–1683, 2018.

SHAO, H.; CHU, L. Plant molecular biology in China: Opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 23, n. 4, p. 345–358, 2005.

SHE, C. et al. The Distribution of Repetitive DNAs Along Chromosomes in Plants Revealed by Self-genomic in situ Hybridization. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 5, p. 437–448, 2007.

SILJAK-YAKOVLEV, S. et al. Evolutionary implications of heterochromatin and rDNA in chromosome number and genome size changes during dysploidy: A case study in *Reichardia* genus. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–21, 2017.

SINGH, A. K. et al. Development and molecular cytogenetic characterization of *Thinopyrum bessarabicum* introgression lines in hexaploid and tetraploid wheats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, n. 7, p. 2117–2130, 2020.

SONG, Z. et al. Analysis of Structural Genomic Diversity in *Aegilops umbellulata*, *Ae. markgrafii*, *Ae. comosa*, and *Ae. uniaristata* by Fluorescence In Situ Hybridization Karyotyping. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. June, p. 1–17, 2020.

SZELES, A. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the molecular cytogenetics of cancer. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 49, n. 1, p. 69–80, 2002.

TANG, Z.; YANG, Z.; FU, S. Oligonucleotides replacing the roles of repetitive sequences pAs1, pSc119.2, pTa-535, pTa71, CCS1, and pAWRC.1 for FISH analysis. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 3, p. 313–318, 2014.

TEAM, R. C.; AL., E. R: A language and environment for statistical computing. v. 2, p. 1–12, 2016.

TESSADORI, F. et al. PHYTOCHROME B and HISTONE DEACETYLASE 6 control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 9, p. 14–17, 2009.

UMAN, L. S. Systematic Reviews and Meta-Analyses. **J Can Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 57–59, 2011.

UNESCO. **Science Report: The Race Against Time for Smarter Development**. , 2021.

WANG, Y. et al. Cytogenetic Analysis and Molecular Marker Development for a New Wheat–*Thinopyrum ponticum* 1Js (1D) Disomic Substitution Line With Resistance to Stripe

Rust and Powdery Mildew. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. August, p. 1–13, 2020.

WICKHAM, H. Data Analysis 9.1. p. 189–201, 2016.

WILT, T. J.; FINK, H. A. Systematic reviews and meta-analyses. **Clinical Research Methods for Surgeons**, n. February, p. 311–325, 2007.

XU, W. et al. The genome evolution and low-phosphorus adaptation in white lupin. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.

YANG, S. et al. Sequence evolution, abundance, and chromosomal distribution of ty1-copia retrotransposons in the *Saccharum spontaneum* genome. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 5, p. 272–282, 2020.

YOUNIS, A. et al. FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 9, p. 1477–1488, 2015.

ZHANG, T. et al. Chorus2: design of genome-scale oligonucleotide-based probes for fluorescence in situ hybridization. **Plant Biotechnology Journal**, v. 19, n. 10, p. 1967–1978, 2021.

ZHU, Q. et al. Repetitive sequence analysis and karyotyping reveal different genome evolution and speciation of diploid and tetraploid *Tripsacum dactyloides*. **Crop Journal**, v. 4, n. 4, p. 247–255, 2016.