

WELLINGTON RONILDO CLARINDO

**AVALIAÇÃO DE AGREGADOS CELULARES DE
CAFÉ (*Coffea* spp.) POR TÉCNICAS CITOMÉTRICAS
E CITOGENÉTICAS**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS BRASIL**

2004

WELLINGTON RONILDO CLARINDO

**AVALIAÇÃO DE AGREGADOS CELULARES DE
CAFÉ (*Coffea* spp.) POR TÉCNICAS CITOMÉTRICAS
E CITOGENÉTICAS**

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

APROVADA: 02 de agosto de 2004.

Prof. Ney Sussumu Sakiyama
(Conselheiro)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Luiz Sérgio Saraiva

Dr^a. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

Aos meus amados pais

Luiz Carlos Clarindo (*in memoriam*) e Maria das Graças Clarindo.

AGRADECIMENTOS

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

Ao CNPq e ao CBP&D/Café, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação, pela dedicação, pelos ensinamentos, pela amizade e pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus conselheiros Ney Sussumu Sakyiama e Wagner Campos Otoni, pela amizade, pela confiança, pelos valiosos conselhos e pelo auxílio nos trabalhos fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Luiz Sérgio Saraiva, pela amizade, pela confiança e pelos valiosos conselhos.

À Dr^a Eveline Teixeira Caixeta, pelas sugestões e pelos estímulos.

Ao Professor Cosme Damião Cruz, pelo auxílio nas análises estatísticas e pela contribuição na interpretação dos resultados.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, pelo amor incondicional, pelo exemplo, pelo apoio e pela dedicação em todos os momentos.

Aos pesquisadores do Laboratório BIOCAFÉ/BIOAGRO, em especial ao Marcelo e à Ana, pelo fornecimento do material utilizado neste trabalho, pela amizade, pelos momentos de descontração e pelas informações científicas.

À minha grande amiga Maria Andréia Corrêa Mendonça, pela amizade, pelo carinho e pelo companheirismo.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal Isane, Milene, Carolina, Fernanda, Bruno e Ionara, pelo auxílio técnico, pela agradável convivência, pelos momentos de descontração e pelo auxílio nos momentos difíceis.

Aos funcionários da Genética Rita e Conceição, do Departamento de Biologia Geral Salvador e Rose e do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal José Francisco e Americano, pelo auxílio profissional, pela amizade e pela atenção.

Aos meus amigos e aos professores que contribuíram para a minha formação, pela amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

WELLINGTON RONILDO CLARINDO, filho de Luiz Carlos Clarindo e Maria das Graças Clarindo, nasceu em Ponte Nova, Minas Gerais, no dia 19 de agosto de 1979.

Em 1998, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se, em março de 2003, como Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Durante o período de graduação, foi monitor do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e bolsista do PIBIC/CNPq do Departamento de Biologia Geral, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética e Citometria Vegetal.

Em março de 2003, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2004.

CONTEÚDO

	PÁGINA
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais do gênero <i>Coffea</i>	1
1.2. Citogenética do gênero <i>Coffea</i>	2
1.3. Aspectos gerais da citometria de fluxo.....	3
1.4. Aspectos gerais da citometria de imagem em plantas.....	4
1.5. Variação somaclonal.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CROMOSSOMOS METAFÁSICOS DE <i>Coffea congestis</i> Froehner.....	14
RESUMO.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Material	16
2.2. Métodos.....	16
2.2.1. Obtenção, manutenção e repicagem das suspensões de agregados celulares de <i>C. congestis</i>	16
2.2.2. Preparação do material citogenético.....	17
2.2.3. Maceração enzimática.....	17

2.2.4. Técnica de dissociação celular e secagem ao ar.....	17
2.2.5. Coloração uniforme com Giemsa.....	17
2.2.6. Análise de imagem.....	18
3. RESULTADOS.....	19
4. DISCUSSÃO.....	21
5. CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ESTIMAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA, EM PICOGRAMAS, PARA CADA CROMOSSOMO DO COMPLEMENTO DE <i>Coffea canephora</i> cv. Apoatã.....	28
RESUMO.....	28
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1. Material	32
2.2. Métodos.....	32
2.2.1. Obtenção, manutenção e repicagem das suspensões de agregados celulares de <i>C. canephora</i>	32
2.2.2. Preparação do material citogenético.....	32
2.2.3. Citometria de imagem.....	33
2.2.3.1. Maceração enzimática.....	33
2.2.3.2. Preparação das lâminas.....	33
2.2.3.3. Reação de Feulgen.....	34
2.2.3.4. Análise dos dados.....	34
3. RESULTADOS.....	36
4. DISCUSSÃO.....	44
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
UTILIZAÇÃO DO NÚMERO DE NUCLÉOLOS COMO PARÂMETRO PARA INFERIR A OCORRÊNCIA DE VARIAÇÃO SOMACLONAL EM SUSPENSÕES DE AGREGADOS CELULARES DE <i>Coffea. canephora</i> cv. Apoatã.....	51
RESUMO.....	51
1. INTRODUÇÃO.....	53

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1. Material	54
2.2. Métodos.....	54
2.2.1. Obtenção, manutenção e repicagem das suspensões de agregados celulares de <i>C. canephora</i> cv Apoatã.....	54
2.2.2. Coleta do material.....	54
2.2.3. Maceração enzimática.....	55
2.2.4. Técnica de dissociação celular e secagem ao ar.....	55
2.2.5. Coloração utilizando solução de AgNO ₃	55
2.2.6. Contagem dos núcleos.....	55
2.2.7. Análise estatística.....	56
3. RESULTADOS.....	57
4. DISCUSSÃO.....	61
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO MONITORAMENTO DE SUSPENSÕES DE AGREGADOS CELULARES DE <i>Coffea arabica</i> cv. Catuai Vermelho.....	67
RESUMO.....	67
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1. Material	70
2.2. Métodos.....	70
2.2.1. Obtenção, manutenção e repicagem das suspensões de agregados celulares de <i>C. arabica</i>	70
2.2.2. Coleta do material.....	70
2.2.3. Citometria de fluxo em agregados celulares.....	71
2.2.3.1. Extração dos núcleos e coloração com DAPI.....	71
2.2.3.2. Processamento no citômetro de fluxo.....	72
3. RESULTADOS.....	73
4. DISCUSSÃO.....	79
5. CONCLUSÕES.....	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

RESUMO

CLARINDO, Wellington Ronildo, M. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004. **Avaliação de agregados celulares de café (*Coffea* spp.) por técnicas citométricas e citogenéticas**. Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Conselheiros: Ney Sussumu Sakiyama e Wagner Campos Otoni.

O Brasil lidera o mercado mundial de café em produção e exportação e é o segundo maior consumidor desse grão. Parte do aumento da produção tem sido atribuída aos investimentos em programas de melhoramento e às inovações geradas pelos processos biotecnológicos. Espécies do gênero *Coffea* têm sido objetos de estudos citogenéticos e citométricos, os quais procuram dados de base citológica e genética para contribuir com programas de melhoramento. Entre os diversos níveis de contribuição, essa linha de pesquisa tem forte potencial como ferramenta de prospecção e monitoramento de genomas, considerando-se que a caracterização dos cariótipos e a quantificação do conteúdo genômico geram dados que se estendem da cultura de tecidos a processos de hibridação. Levando em conta a necessidade de aprimoramento de estratégias de pesquisas citogenética e citométrica, desenvolveram-se quatro ferramentas de estudo em *Coffea*. Citogeneticamente, procurou-se obter cromossomos com morfologia adequada para caracterização de *C. congensis*, com aplicação de metodologias que aumentam o índice metafásico e fornecem cromossomos com morfologia mais adequada para caracterização e montagem de cariogramas. O complemento de *C. congensis* corresponde a $2x=22$ cromossomos, sendo quatro metacêntricos (4, 6, 8 e 9) e sete submetacêntricos (1, 2, 3, 5, 7, 10 e 11). A constrição secundária foi identificada na porção distal do braço curto do cromossomo 7. A citometria de imagem foi utilizada

para estimar o conteúdo de DNA em picogramas (pg) de cada cromossomo de *C. canephora* cv. Apatã. Neste estudo foi possível mensurar, a partir da densidade óptica, o conteúdo de DNA, com $2C=1,43$ pg, dos 11 cromossomos. Os valores encontrados variaram entre 0,18 pg (cromossomo 1) e 0,10 pg (cromossomos 10 e 11). Amostras de calos e agregados celulares de *C. canephora* cv. Apatã foram coletadas para verificar se há relação entre os núcleos interfásicos com diferente número e o tempo de manutenção das culturas nas condições *in vitro*. A partir dos valores percentuais de células com um, dois, três ou quatro nucléolos, foi aplicada a análise de regressão, que indicou que o tempo das culturas *in vitro* altera o número de nucléolos por núcleo, o que pode ser utilizado como ferramenta no monitoramento de ocorrências de variações somaclonais. Em termos de citometria de fluxo, analisaram-se suspensões nucleares extraídas de agregados celulares fixados de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho e corados com DAPI. Os histogramas gerados evidenciaram a ocorrência de variação somaclonal (aneuploidias e euploidias) ao longo dos subcultivos das suspensões de agregados celulares com células em diferentes fases do ciclo celular. Com este estudo, espera-se que os resultados descritos representem um avanço na prospecção do genoma do cafeeiro.

ABSTRACT

CLARINDO, Wellington Ronildo, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August 2004. **Evaluation of coffee (*Coffea spp.*) cell aggregates by cytometric and cytogenetic techniques.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Committee members: Ney Sussumu Sakiyama and Wagner Campos Otoni.

Brazil leads the world coffee market in production and exportation, and is the second biggest worldwide consumer of the grain. Part of the production increase has been ascribed to the investments on breeding programs and to the innovations brought by the biotechnological processes. Species from the genus *Coffea* have been investigated to cytogenetical and cytometrical studies, which search for data with cytological and genetical basis, so as to contribute with breeding programs. Among the many contribution levels, this research line has strong potential as a research and genome monitoring tool, considering that karyotype characterization and genomic content quantification generate data that range from tissue culture to hybridization processes. Considering the necessity of improving cytogenetical and cytometrical research strategies, four studying tools have been developed in *Coffea*. Cytogenetically, it was sought to obtain chromosomes with adequate morphology for the characterization of *C. congensis* was sought, with use of methodologies that increase the metaphasic index and provide chromosomes with adequate morphology for karyogram characterization and assembly. The complement of *C. congensis* corresponds to $2x=22$ chromosomes, being four metacentric chromosomes (4, 6, 8 and 9) and seven submetacentric ones (1, 2, 3, 5, 7, 10 and 11). The secondary constriction was identified on the distal portion of the short arm of chromosome 7. Image cytometry was used to estimate the DNA content in picograms (pg) in each

chromosome of *C. canephora* cv. Apoatã. In the present study it was possible to measure, based on optical density, the DNA content, with $2C=1,43$ pg, for the eleven chromosomes. The values found varied between 0,18 pg (chromosome 1) and 0,10 pg (chromosomes 10 and 11). Samples of calli and cell aggregates of *C. canephora* cv. Apoatã were collected for verification of the existence of a relationship between the interphasic nuclei with different number of nucleoli and time maintenance of the cultures an *in vitro* condition. Based on the percentage values of cells with one, two, three or four nucleoli, regression analysis was applied, and it suggested that the *in vitro* culture time alters the number of nucleoli per nucleus, which can be used as a tool for monitoring the occurrence of somaclonal variations. In terms of flow cytometry were analyzed nuclei suspensions of *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho, extracted from fixed cell aggregates and stained with DAPI. The generated histograms evidenced the occurrence of somaclonal variations (aneuploidies and euploidies) throughout the passages of the cell aggregate suspensions with cells in different phases of the cell cycle. With this study, it is expected that the described results represent an advance on the research of the coffee tree genome.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais do gênero *Coffea*

O cafeeiro, pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, é uma planta originária das regiões montanhosas da Abissínia, Cafa e Enária (GRANER e JÚNIOR, 1967; MATIELLO, 1991), introduzida no Brasil, em 1727, pelo sargento-mor Francisco de Mello Palheta (GRANER e JÚNIOR, 1967).

A introdução e, principalmente, a expansão do cultivo do café favoreceram a formação de progressivos núcleos populacionais nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, contribuindo, também, para a expansão da rede ferroviária, para a construção de escolas e hospitais e, mais tarde, para o próprio desenvolvimento industrial dessas regiões (CARVALHO e FAZUOLI, 1993).

Dentre as espécies de café, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner são as de maior cotação no mercado internacional. Cerca de 75% do café negociado no mundo é Arábica (*C. arabica*) e 25%, Robusta (*C. canephora*) (CARNEIRO, 1999). O principal tipo de café cultivado no Brasil é o Arábica, embora existam algumas áreas (Espírito Santo, norte do Rio de Janeiro, Vale do Rio Doce em Minas Gerais, Mato Grosso, Rondônia, sul da Bahia e Acre) plantadas com o café Robusta (CAIXETA, 2001).

O Brasil lidera o mercado mundial de café em produção e exportação (NOTÍCIAS, 2004) e é o segundo maior consumidor do grão. Na safra de 2003/2004, o país colheu 28 milhões e 820 mil sacas e, segundo a previsão da Companhia

Nacional de Abastecimento (Conab), a safra de 2004/2005 deve atingir 40 milhões de sacas (INCRA, 2004).

Dada a importância dessa cultura, espécies do gênero *Coffea*, em especial *C. arabica* e *C. canephora*, têm sido objeto de estudos citogenéticos e citométricos, os quais contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos evolutivos, além de fornecerem subsídios para programas de melhoramento genético (FONTES, 2003).

Genótipos de *Coffea* de importância econômica e no melhoramento vêm sendo introduzidos, propagados e regenerados *in vitro* com objetivos de: (i) multiplicar rapidamente, e em grande escala, os organismos desejáveis (SANTOS et al., 2000); (ii) gerar variabilidade genética por meio da cultura de embriões, de anteras, de suspensões celulares e de protoplastos; e (iii) manipular geneticamente as culturas, por meio de técnicas de transformação (CARNEIRO, 1999).

1.2- Citogenética do gênero *Coffea*

Um dos primeiros estudos citogenéticos no gênero *Coffea* foi realizado por Krug (1938). Esse autor, por meio de preparações incluídas em parafina e cortes histológicos, determinou que o número cromossômico básico do gênero é $x=11$, havendo apenas a espécie *C. arabica* com $2n=4x=44$. As metáfases mitóticas documentadas apresentaram cromossomos morfológicamente compactados, arredondados, não permitindo a identificação de constrições primárias e secundárias.

Informações sobre a morfologia dos cromossomos meióticos de *Coffea* foram relatadas por Pinto-Maglio e Cruz (1987). Utilizando a técnica de esmagamento e microscopia de contraste de fase, esses autores determinaram o número e classificaram os cromossomos paquitênicos com constrição secundária das nove espécies estudadas.

Todos os cromossomos meióticos de *C. arabica* foram caracterizados por Pinto-Maglio e Cruz (1998). Estes autores, também aplicando a técnica de esmagamento, constataram que essa espécie apresenta quatro cromossomos metacêntricos (1, 8, 11 e 18), 14 submetacêntricos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 19 e 20) e quatro acrocêntricos (13, 14, 21 e 22), dos quais três com organizador nucleolar (14, 21 e 22).

As técnicas de dissociação celular e secagem ao ar e análise de imagem foram algumas das ferramentas empregadas para caracterizar os cromossomos mitóticos obtidos de meristemas radiculares de *C. canephora* (FONTES e CARVALHO, 2001). Estes autores constataram que essa espécie apresenta um cromossomo metacêntrico (1) e 10 submetacêntricos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11), sendo um (6) possuindo, no braço curto, um satélite associado à constricção secundária.

Clarindo et al. (2002), utilizando suspensões de agregados celulares de *C. arabica* como fonte de células metafásicas e técnicas de dissociação celular e secagem ao ar e análise de imagem, elaboraram o kariograma contendo um cromossomo metacêntrico (21), 17 submetacêntricos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 19, 20 e 22) e quatro acrocêntricos (15, 16, 17 e 18), sendo dois (5 e 6) com constricções secundárias na porção distal do braço curto.

Técnicas de bandeamentos foram aplicadas aos cromossomos metafásicos de *C. canephora* por Clarindo et al. (2003). Estes autores identificaram a região organizadora do nucléolo (RON) ativa no cromossomo 6 e evidenciaram a heterocromatina flanqueadora da RON, após o emprego dos bandeamentos Ag-NOR e Hsc-FA (bandeamento fluorescente da heterocromatina associada à constricção secundária com uso de laranja de acridina).

1.3- Aspectos gerais da citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma ferramenta que analisa parâmetros ópticos de partículas coradas em suspensão, com o auxílio do citômetro de fluxo (DOLEZEL, 1997). Esse método requer suspensões com grande quantidade de núcleos preservados, isolados e corados com fluorocromos (GALBRAITH et al., 1983). Dessa maneira, as etapas de isolamento e coloração das partículas a serem analisadas são fundamentais quando a citometria de fluxo é aplicada a estudos em vegetais (YANPAISAN et al., 1999).

A citometria de fluxo é um método particularmente rápido e eficiente (YANPAISAN et al., 1999) que tem sido empregado em estudos de mensuramento do conteúdo de DNA; em análises da expressão gênica (DOLEZEL, 1997); na cariotipagem das espécies (YANPAISAN et al., 1999); em estudos de verificação de ocorrência de variação somaclonal em cultura de tecidos vegetais (WYMAN et al.,

1992; MOYNE et al., 1993; BRUTOVSKA et al., 1998; THIEM e SLIWINSKA, 2003); e no monitoramento das fases do ciclo celular (PLANCHAIS et al., 2000). Em virtude de todas essas aplicações, a citometria de fluxo gera informações úteis à biologia molecular, citogenética, cultura de tecidos e melhoramento (YANPAISAN et al., 1999).

Em café, a citometria de fluxo foi utilizada para estimar o conteúdo de DNA em picogramas (pg), de espécies e variedades. Cros et al. (1994) relataram que *C. canephora* apresenta 1,46 pg de DNA, *C. congensis* possui 1,53 pg e *C. arabica* 2,47 pg. Para a primeira espécie, Noirot et al. (2003) encontraram um valor em pg equivalente a 1,44. Fontes (2003) estimou o conteúdo de DNA de cinco cultivares de *C. canephora*; dentre esses, o cultivar Apoatã, que apresentou 1,43 pg de DNA e 10 cultivares de *C. arabica*.

Em cultura de tecidos vegetais, a citometria de fluxo pode ser aplicada em estudos envolvendo alterações no nível de ploidia e em análises do ciclo celular, constituindo uma ferramenta útil para verificação de heterogeneidades em populações celulares (YANPAISAN et al., 1999).

1.4- Aspectos gerais da citometria de imagem em plantas

A citometria de imagem desenvolvida a partir de metodologias baseadas no cálculo da densidade óptica (DO) (CHIECO et al., 2001) é um método que estima o conteúdo de DNA em pg, de núcleos (CHIECO e DERENZINI, 1999) ou cromossomos (ROSADO, 2004), a partir da medida indireta de sua absorvância em lâminas, após estes terem sido corados pela reação de Feulgen (CHIECO e DERENZINI, 1999).

A reação de Feulgen, de acordo com Feulgen e Rossenbeck (1924), citados por Hardie et al. (2002), é uma técnica citoquímica específica para o DNA, pois nessa reação ocorre a hidrólise desse ácido nucléico, gerando radicais aldeídos nas desoxirriboses por meio da depurinação. Os radicais aldeídos ligam-se a moléculas de parosanalina (cromóforo), presentes no reativo de Schiff.

Após a coloração dos espécimes a serem analisados pela citometria de imagem, para calcular o conteúdo de DNA, é necessária a captura de imagens observadas ao microscópio, por uma videocâmera. A imagem capturada é

convertida em pixels, que estão relacionados a uma cor e a uma intensidade em específico, e processada automaticamente pelo programa de análise de imagens em valores de absorbância relacionados com a área, denominados valores de densidade óptica integrada (DOI) (HARDIE et al., 2002).

A maioria das análises realizadas via citometria de imagem utiliza a luz processada de câmeras analógicas/digitais monocromáticas ou de câmeras policromáticas (RGB), mas com apenas o canal de comprimento de onda na faixa verde. No caso de imagens monocromáticas, estudos citométricos em humanos e plantas têm utilizado, principalmente, a escala de valor do pixel com 8 bits (256 tons de cinza) (VOLGMAYR e GREILHUBER, 1998) ou 12 bits (4.096 tons de cinza) (FONTES, 2003; ROSADO, 2004). São coletados, então, valores tanto de regiões contendo núcleos quanto de regiões com ausência de material celular na lâmina, e calcula-se a DOI (VOLGMAYR e GREILHUBER, 1998).

Em café, a citometria de imagem foi aplicada em núcleos de *C. canephora* cv. Conillon, *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho e cv. Mundo Novo, a fim de estabelecer uma metodologia para estimar a DOI (FONTES, 2003). A autora comparou os índices gerados por citometria de imagem aos resultados obtidos por citometria de fluxo e relatou que as técnicas apresentavam diferenças inferiores a 2,27%, verificando que a citometria de imagem estimou o conteúdo de DNA em pg das variedades, a partir da conversão dos valores de DOI.

1.5- Variação somaclonal

Variação somaclonal — variação encontrada entre células, embriões, órgãos, ou plantas derivadas de cultura *in vitro* — pode envolver alterações cromossômicas numéricas (HENRY et al., 1996) e estruturais (WYMAN et al., 1992), mutações gênicas, ativação de elementos transponíveis, permutações somáticas, permutas entre cromátides-irmãs, ampliações e deleções do DNA, mudanças no padrão de metilação e alterações no DNA mitocondrial e cloroplastidial (BENNICI et al., 2004).

Vários fatores são citados na literatura como possíveis causas da variação somaclonal, dentre os quais se destaca: (i) resposta à composição física (TURNER et al., 2001) e, ou, química do meio de cultura (EZURA et al., 1992; FLUMINHAN e AGUIAR-PERECIN, 1998; TURNER et al., 2001; ZORINIANTS et al., 2003; BENNICI

et al., 2004); e (ii) a expressão de genes essenciais no controle do número cromossômico pode ser afetada durante a embriogênese somática, levando a ocorrência de variantes somaclonais (HENRY et al., 1996).

A variação somaclonal reduz o potencial organogênico (WYMAN et al., 1992), embriogênico (BENNICI et al., 2004) e regenerativo das culturas *in vitro* (MOYNE et al., 1993), prejudicando etapas fundamentais à manipulação genética e ao melhoramento de plantas (BENNICI et al., 2004). Entretanto, espécimes derivados de cultura de tecidos com alterações cromossômicas, numéricas ou estruturais podem exibir fenótipos normais (WYMAN et al., 1992). Devido a esses fatos, a determinação da estabilidade genética de células, embriões, órgãos ou plantas derivadas de cultura *in vitro* é um processo necessário para assegurar o sucesso dos programas de melhoramento que utilizam a cultura de tecidos. Além disso, é imperativo que genótipos selecionados para propagação apresentem constituição genética conhecida (WYMAN et al., 1992).

A ocorrência de variação somaclonal pode ser detectada por meio de diversas técnicas, como: (i) contagem de cromossomos (EZURA et al., 1992; HARVEY et al., 1995; HENRY et al., 1996; KOCHVENKO et al., 1996; BRUTOVSKA et al., 1998); (ii) análises citológicas que evidenciam aberrações cromossômicas (FLUMINHAN e AGUIAR-PERECIN, 1998; MENÉNDEZ-YUFFÁ et al., 2000) e anormalidades citológicas (MENÉNDEZ-YUFFÁ et al., 2000); (iii) citometrias de fluxo (WYMAN et al., 1992; MOYNE et al., 1993; BRUTOVSKA et al., 1998; THIEM e SLIWINSKA, 2003) e imagem (VILHAR et al., 2002; ZORINIANTS et al., 2003); (iv) tamanho dos estômatos (SARI et al., 1999); (v) número de cloroplastos nas células-guardas (SARI et al., 1999); e (vi) reação de amplificação do DNA polimórfico (RAPD) (BENNICI et al., 2004). Os métodos citados em i, ii e vi são considerados por Sari et al. (1999) métodos diretos e os outros, métodos indiretos.

A ocorrência de aberrações mitóticas, em células de explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Catimor e calos derivados desses explantes, foi analisada por Menéndez-Yuffá et al. (2000). Um total de 1.551 células de folhas e 4.568 células de calos foram examinadas. A maioria (79%) das células foliares e (75%) das células dos calos apresentou mitoses normais. Entretanto, células poliplóides, aneuplóides, prófases com número cromossômico duplicado e intérfases com micronúcleos ou binucleadas foram encontradas em ambos os tecidos. A frequência dessas anormalidades foi estatisticamente superior nas células foliares, e os autores

concluíram que o meio de cultura não induziu a ocorrência de aberrações cromossômicas, ou seja, as anormalidades pré-existiam nos explantes.

2- OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos investigar amostras de agregados celulares de *Coffea* spp., a fim de:

- 1- Obter cromossomos com morfologia adequada para caracterização citogenética de *C. congensis*.
- 2- Elaborar o cariograma de *C. congensis* associando técnicas citogenéticas a programas de análise de imagem digital.
- 3- Estimar o conteúdo de DNA dos cromossomos de *C. canephora* cv. Apoatã via citometria de imagem.
- 4- Verificar se há relação entre os núcleos interfásicos com diferente número de nucléolos e o tempo de manutenção das culturas nas condições *in vitro* de *C. canephora* cv. Apoatã.
- 5- Averiguar se o número de nucléolos pode ser utilizado como parâmetro para inferir a ocorrência de variação somaclonal.
- 6- Estabelecer protocolos para obtenção de núcleos isolados de culturas de agregados celulares de *C. arabica*, para que possam ser analisados por citometria de fluxo.
- 7- Verificar se a citometria de fluxo pode ser utilizada para monitorar a ocorrência de variação somaclonal em suspensões de agregados celulares de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho.

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENNICI, A.; ANZIDEI, M.; VENDRAMIN, G. G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, 166: 221-227, 2004.

BRUTOVSKA, R.; CELLAROVA, E.; DOLEZEL, J. Cytogenetic variability of in vitro regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. **Plant Science**, 133: 221-229, 1998.

CAIXETA, G. Z. T. **Gerenciamento da cafeicultura em época de crise.** Tecnologias de produção de café com qualidade. Visconde de Rio Branco, MG: 2001. 80 p.

CARNEIRO, M. F. Advances in coffee biotechnology. **AgBiotechNet**, 1: 1-7, 1999.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C. **Melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo** [S.l.: s. n.], 1993. 43 p.

CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochemistry and Cellular Biology**, 111: 345-358, 1999.

CHIECO, P.; JUNKER, A., VAN NOORDEN, C. J. F. Image cytometry. **Microscopy handbooks**. [S. I.] Springer, 2001. 116 p.

- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; GASPERAZZO, T. A.; FONTES, M. A. Morfometria dos cromossomos de *Coffea arabica* L. var. Catuaí Vermelho. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; FONTES, M. A. Bandeamento NOR e coloração com laranja de acridina em cromossomos metafásicos de *Coffea canephora*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).
- CROS, J.; GAVALDA, M. C.; CHABRILLANGE, N.; RECALT, C.; DUPERRAY, C.; HAMON, S. Variations in the total nuclear DNA content in African *Coffea* species (Rubiaceae). **Café Cacao The**, 38: 3-10, 1994.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, 38: 285-302, 1997.
- EZURA, H.; AMAGAI, H.; YOSHIOKA, K.; OOSAWA, K. Highly frequently appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Science**, 85: 209-213, 1992.
- FLUMINHAN, A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Embryogenic response and mitotic instability in callus cultures derived from maize inbred lines differing in heterochromatic knob content of chromosomes. **Annals of Botany**, 82: 569-576, 1998.
- FONTES, B. P. D. **Citogenética, citometria de fluxo e citometria de imagem em Coffea spp.** Viçosa, MG: UFV, 2003. 130 p. (Tese D.S.).
- FONTES, B. P. D.; CARVALHO, C. R. Caracterização do cariótipo de *Coffea canephora*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47., 2001, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).

- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, J. M.; SHARMA, P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. **Science**, 220: 1049-1051, 1983.
- GRANER, E. A.; JÚNIOR, C. G. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: EDUSP, 1967. 30 p.
- HARDIE, D. C.; GREGORY, T. R.; HEBERT, P. D. N. From pixels to picograms: a beginners guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 50: 735-749, 2002.
- HARVEY, C. F.; FRASER, L. G.; KENT, J.; STEINHAGEN, S.; McNEILAGE, M. A.; GUI-JUN, Y. Analysis of plants obtained by embryo rescue from an interspecific *Actinicia* cross. **Scientia Horticulturae**, 60: 199-212, 1995.
- HENRY, Y.; MARCOTTE, J. L.; BUYSER, J. The effect of aneuploidy on karyotype abnormalities in wheat plants regenerated from short- and long-term somatic embryogenesis. **Plant Science**, 114: 101-109, 1996.
- INCRA, Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária. Disponível em: <http://www.incra.gov.br/noticias/news/Ano/2004>. Acesso em: 21. jun. 2004.
- KOCHEVENKO, A. S.; RATUSHNYAK, Y. I.; GLEBA, Y. Y. Protoplast culture and somaclonal variability of species of series *Juglandifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 44: 103-110, 1996.
- KRUG, C. A. Variações somáticas em *Coffea arabica* L. **Instituto Agronômico do Estado**, Campinas, 12: 1-11, 1938.
- MATIELLO, J. B. **O café do cultivo ao consumo**. Rio de Janeiro Globo, 1991. 60 p.

- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A.; SILVA, R. F.; RIOS, L.; ENRECH, N. X. Mitotic aberrations in coffee (*Coffea arabica* cv. 'Catimor') leaf explants and their derived embryogenic calli. **Electronic Journal of Biotechnology**, 3: 161-166, 2000.
- MOYNE, A. L.; SOUQ, F.; YEAN, L. H.; BROWN, S. C.; BOULAY, M.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Relationship between cell ploidy and regeneration capacity of long term *Rosa hybrida* cultures. **Plant Science**, 93: 159-168, 1993.
- NOIROT, M.; BARRE, P.; DUPERRAY, C.; LOUARN, J.; HAMON, S. Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: consequences on genome size evaluation in Coffee tree. **Annals of Botany**, 92: 259-264, 2003.
- NOTÍCIAS. Disponível em: <http://www.exportnews.com.br/NOTICIAS/0.008a12.htm>. Acesso em: 21. jun. 2004.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. **Caryologia**, 40: 7-23, 1987.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. **Caryologia**, 51: 19-35, 1998.
- PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, 476: 78-83, 2000.
- ROSADO, T. B. **Análise citogenética de cromossomos B de milho (*Zea mays* L.) associada às citometrias de fluxo e de imagem**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 71 p. (Dissertação M. S.).
- SANTOS, A. C. P.; CORDEIRO, A. T.; CAMPOS, M. R. C.; OTONI, W. C.; ZAMBOLIM, L. Calogênese em *Coffea* via cultura semi-sólida. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas, MG. **Resumos Expandidos**, p. 156-159.

- SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. **Scientia Horticulturae**, 82: 265-277, 1999.
- THIEM, B.; SLIWINSKA, E. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) in vitro cultures. **Plant Science**, 164: 129-134, 2003.
- TURNER, S.; KRAUSS, S.; BUNN, E.; SENARATNA, T.; DIXON, K.; TAN, B.; TOUCHELL, D. Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold store and cryopreservation. **Plant Science**, 161: 1099-1106, 2001.
- VILHAR, B.; VIDIC, T.; JOGAN, N.; DERMASTIA, M. Genome size and the nucleolar number as estimators of ploidy level in *Dactylis glomerata* in the Slovenian Alps. **Plant Systematics and Evolution**, 234: 1-13, 2002.
- VOLGMAYR, H.; GREILHUBER, J. Genome size determination in Peronosporales (Oomycota) by feulgen image analysis. **Fungal Genetics and Biology**, 25: 181-195, 1998.
- WYMAN, J.; BRASSARD, N.; FLIPO, D.; LALIBERTE, S. Ploidy level stability of callus tissue, axillary and adventitious shoots of *Larix X eurolepis* Henry regenerated in vitro. **Plant Science**, 85: 189-196, 1992.
- YANPAISAN, W.; KING, N. J. C.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, 17: 3-27, 1999.
- ZORINIANTS, S. E.; NOSOV, A. V.; MONFORTE-GONZALEZ, M.; MENDES-ZEEL, M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry. **Plant Science**, 164: 141-146, 2003.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CROMOSSOMOS METAFÁSICOS DE *Coffea congestis* Froehner

Coffea congestis Froehner; família Rubiaceae, gênero *Coffea*, apresenta $2x=22$ cromossomos. O objetivo do presente estudo foi adaptar técnicas citogenéticas para obtenção de metáfases citogeneticamente adequadas para determinar as características morfométricas dos cromossomos de *C. congestis*. Para obtenção de cromossomos metafásicos, foi adicionado amiprofos-metil (APM) ao meio de cultura contendo os agregados celulares de *C. congestis*, na concentração final de $4,0 \mu\text{M}$. Após quatro horas de bloqueio, os agregados foram retirados, fixados em solução de metanol:ácido acético (3:1) e armazenados a -20°C . As preparações citogenéticas foram realizadas pela técnica de dissociação celular com digestão enzimática Flaxzym[®] (NOVO), secagem ao ar e coradas com solução de Giemsa 5%, em tampão fosfato pH 6,8, por quatro minutos. As preparações foram observadas com objetiva de imersão (100X) e as figuras cromossômicas, capturadas com sistema digital de análise de imagem acoplado ao microscópio. A metodologia utilizada possibilitou a obtenção de metáfases com cromossomos morfologicamente definidos, alongados e não sobrepostos, permitindo a montagem do kariograma da espécie. O kariograma de *C. congestis* é composto por quatro cromossomos metacêntricos (4, 6, 8 e 9) e sete submetacêntricos (1, 2, 3, 5, 7, 10 e 11). A análise citogenética também revelou a presença de um cromossomo com constrição secundária, o cromossomo 7.

Palavras-chave: *C. congestis*, cromossomos, suspensão de agregados celulares.

1- INTRODUÇÃO

Krug (1938), por meio de preparações incluídas em parafina e corte histológico, determinou que *C. congensis* Froehner apresenta $2n=2x=22$ cromossomos. Essa espécie vem sendo utilizada em programas de melhoramento do cafeeiro, com a finalidade de obter híbridos resistentes a patógenos, e em estudos que visam gerar informações acerca da sua contribuição na origem de *C. arabica* (CAIXETA, 2001).

Dados adicionais a respeito da caracterização citogenética de *C. congensis* foram relatados por Pinto-Maglio e Cruz (1987). No preparo das lâminas, os autores utilizaram anteras e a técnica de esmagamento e, com auxílio de um microscópio de contraste de fase, caracterizaram o cromossomo paquitênico que possuía constrição secundária. Os pesquisadores constataram que *C. congensis* apresenta um cromossomo com constrição secundária, sendo esse metacêntrico.

Visando obter uma análise mais detalhada dos cromossomos dessa espécie, no presente estudo foram adaptadas técnicas citogenéticas para obtenção de metáfases adequadas para caracterizar morfometricamente os cromossomos de *C. congensis*.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Material

As suspensões de agregados celulares de *C. congestis* foram cedidas pelo Dr. Antônio Teixeira Cordeiro, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e pelos técnicos da Embrapa Marcelo Antoniol Fontes e Ana Cláudia F. Cruz, do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BIOCAFÉ) da UFV. As análises mitóticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal da UFV.

2.2- Métodos

2.2.1- Obtenção, manutenção e repicagem das suspensões de agregados celulares de *C. congestis*

Explantos foliares de ramos ortotrópicos e, ou, plagiotrópicos foram submetidos às etapas de desinfestação e eliminação da nervura. Logo após, os explantes foram colocados em placas de Petri contendo meio semi-sólido, para desenvolvimento de calos embriogênicos friáveis.

Os calos embriogênicos friáveis foram colocados em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultura líquido VB₂ (van BOXTEL e BERTHOULY, 1996) sob agitação orbital contínua a 110 rpm, sendo as culturas subcultivadas em intervalos de 15 dias.

2.2.2- Preparação do material citogenético

Aos meios de cultura contendo agregados celulares foi adicionado o bloqueador amiprofos-metil (APM) na concentração final de 4 μ M. As amostras permaneceram no meio de cultura com o bloqueador por um período de quatro horas. Após esse período, os agregados celulares foram fixados em solução de metanol:ácido acético (3:1) (CLARINDO et al., 2002; 2003). Foram realizadas três trocas de fixador, em intervalos de 10 minutos, sendo, após a última troca, o material estocado a -20 °C (CARVALHO e SARAIVA, 1993; CARVALHO 1995)

2.2.3- Maceração enzimática

Os agregados, depois de transferidos para tubos de microcentrífuga Eppendorfs, foram lavados em água destilada, para remoção do fixador. Em seguida, foram adicionadas solução enzimática Flaxzym[®] (NOVO) e água destilada, na proporção de 1:30 (enzima: água). Os tubos foram mantidos à temperatura de 34 °C por 30 minutos. Após a maceração, a solução enzimática foi retirada, e os agregados foram fixados em solução de metanol: ácido acético (3:1) (CLARINDO et al., 2002; 2003).

2.2.4- Técnica de dissociação celular e secagem ao ar

Cada agregado foi transferido para uma lâmina de vidro previamente limpa. As preparações cromossômicas foram obtidas, com o auxílio de uma lupa e um bisturi, por dissociação celular dos agregados gotejando fixador gelado. As lâminas foram submetidas à técnica de secagem ao ar e mantidas em placa aquecedora à temperatura de 37 °C (CARVALHO, 1995).

2.2.5- Coloração uniforme com Giemsa

As lâminas foram submetidas à coloração com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH 6,8, por quatro minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, as preparações foram lavadas em recipientes contendo água destilada. Em seguida,

a técnica de secagem ao ar foi realizada, sendo as lâminas novamente colocadas em placa aquecedora.

2.2.6- Análise de imagem

As lâminas observadas em fotomicroscópio Olympus™, modelo BX60, equipado com acessórios de análise de imagem, iluminação de campo claro e de fluorescência; com objetiva de imersão de 100X. As figuras cromossômicas adequadas foram capturadas diretamente por uma videocâmera acoplada ao microscópio e a um computador Macintosh™ equipado com placa digitalizadora. As análises morfométricas dos cromossomos foram realizadas usando o programa *Image SXM* (BARRETT, 2002) de domínio público, o qual pode ser obtido via internet (<http://reg.ssci.liv.ac.uk>). Os braços de cada cromossomo foram medidos em pixels e convertidos em escala de micrômetros. A razão entre os braços (r) e o índice centromérico (ic) foram determinadas segundo o critério de classificação morfológica dos cromossomos descrito por Guerra (1986).

3- RESULTADOS

O complemento diplóide de *C. congensis* foi evidenciado como sendo $2n=22$ cromossomos. O cariógrama da espécie é composto por quatro cromossomos metacêntricos (4, 6, 8 e 9) e sete submetacêntricos (1, 2, 3, 5, 7, 10 e 11). A classificação dos cromossomos foi realizada segundo a terminologia proposta por Guerra (1986) (Quadro 1). A análise citogenética revelou, ainda, a presença de um cromossomo com constrição secundária, cromossomo 7 (Figura 1a). O idiograma da espécie (Figura 1b) foi estabelecido com base nos dados do Quadro 1.

Quadro 1 - Morfometria dos cromossomos prometafásicos de *C. congensis*

<i>C. congensis</i>						
Cromossomo	Total (µm)	Braço (µm)		r	Classe	Comprimento Relativo(%)
		Curto	Longo			
1	5,45	2,15	3,30	1,53	SM	13,20
2	4,60	1,55	3,05	1,97	SM	11,14
3	4,40	1,50	2,90	1,93	SM	10,65
4	3,90	1,80	2,10	1,17	M	9,44
5	3,65	1,45	2,20	1,52	SM	8,84
6	3,60	1,65	1,95	1,18	M	8,72
7	3,35	1,00	2,35	2,35	SM	8,11
8	3,30	1,45	1,85	1,28	M	7,99
9	3,15	1,40	1,75	1,25	M	7,63
10	2,95	1,15	1,80	1,57	SM	7,14
11	2,95	1,10	1,85	1,68	SM	7,14
Total	41,30					100,00

M = metacêntrico e SM = submetacêntrico.

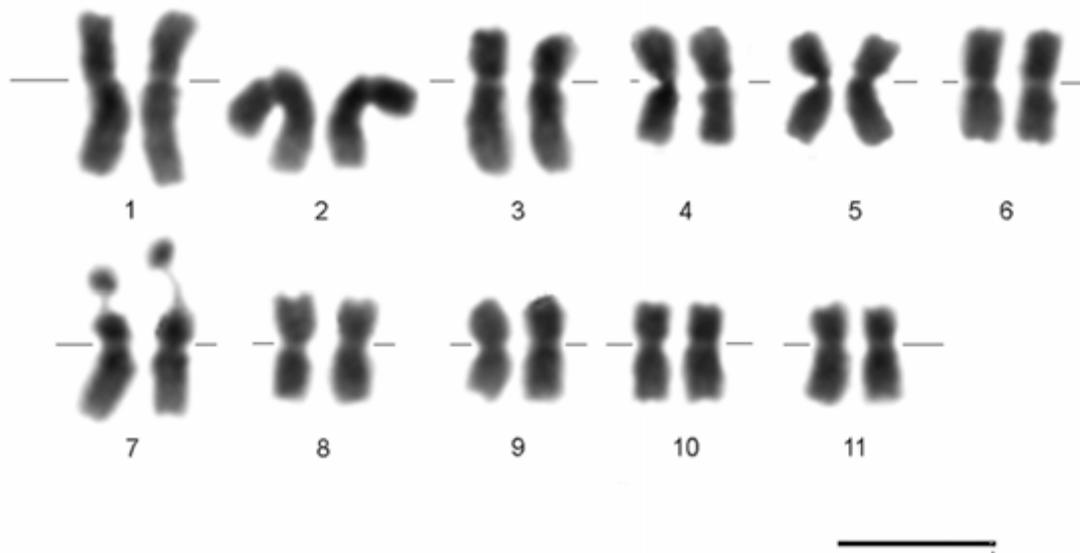


Figura 1a - Cariograma de *C. congensis* ($2x=22$ cromossomos). Cromossomos prometafásicos pré-tratados com APM a $4 \mu\text{M}$, por quatro horas, e corados com Giemsa 5%. Observar as constrições primárias e secundária definidas. (barra = $5 \mu\text{m}$).

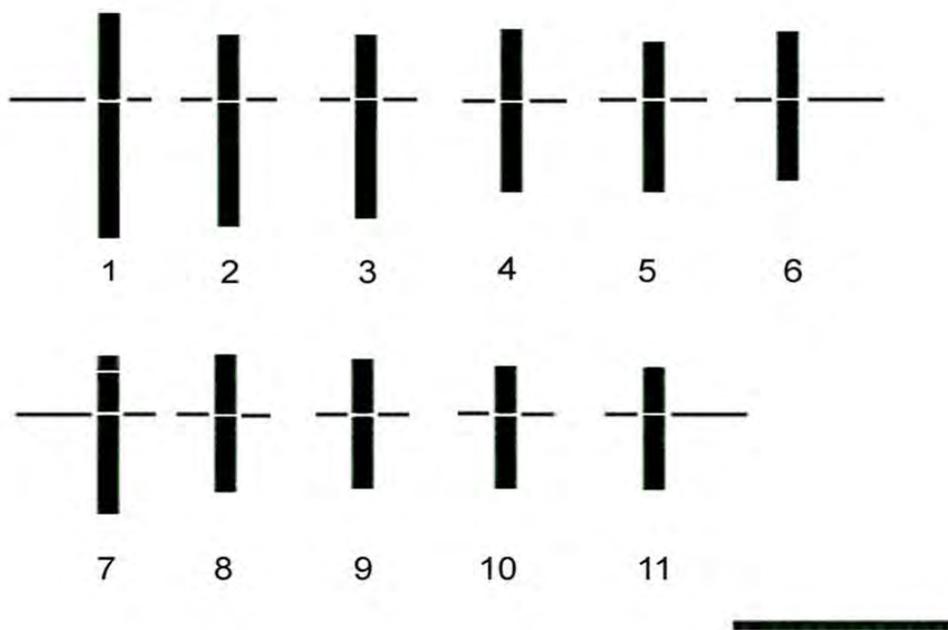


Figura 1b - Idiograma da espécie *C. congensis*, estruturado com base nas informações do Quadro 1, evidenciando-se constrições primárias e secundária (barra = $5 \mu\text{m}$).

4- DISCUSSÃO

O cariograma de *C. congensis* apresentou $2x=22$ cromossomos com constrições primárias e secundária definidas (Figura 1a). Em virtude do baixo grau de compactação dos cromossomos prometafásicos foi possível identificar (Figura 1a) e caracterizar morfometricamente (Quadro 1) cada par de homólogo. O mesmo número cromossômico de *C. congensis* foi observado por Krug (1938) em preparações incluídas em parafina e corte histológico, mas em decorrência do elevado nível de compactação; o autor constatou que os cromossomos aparentaram ser pequenos, quase arredondados.

No cariograma de *C. congensis*, observou-se que a constrição secundária está localizada no cromossomo 7 (Figura 1a). De acordo com as medidas morfométricas realizadas e com a terminologia proposta por Guerra (1986), esse cromossomo foi classificado como submetacêntrico. Entretanto, outra classificação para esse cromossomo foi relatada por Pinto-Maglio e Cruz (1987). Esses autores, utilizando a técnica de esmagamento, analisaram cromossomos paquitênicos e propuseram que o cromossomo com constrição secundária é metacêntrico. Porém, a técnica de esmagamento, segundo Sumner (1990), geralmente resulta em cromossomos sobrepostos, morfologicamente não preservados, dificultando análises citogenéticas confiáveis.

O cromossomo 7 provavelmente possui, na constrição secundária, os genes rDNA responsáveis pela formação e manutenção do nucléolo no núcleo interfásico; a região organizadora do nucléolo (RON) ativa. Segundo Langer e Koul (1983), Ansari et al. (1999) e Vilhar et al. (2002), as constrições secundárias estão

potencialmente envolvidas com a organização do nucléolo, em virtude da presença, geralmente nessa porção cromossômica, de seqüências repetitivas em *tandem* dos genes rDNA 5,8, 18 e 28 S. A RON ativa, em estudos futuros, poderá ser identificada pela técnica de bandeamento Ag-NOR (SATO et al., 1980; von KALM e SMYTH, 1984), por demonstração de heterocromatinas flanqueadoras desta região (SATO et al., 1980; BESENDORFER et al., 2002; CARVALHO e GUERRA, 2002; ALMEIDA, 2003; CLARINDO et al., 2003) e, ou, por métodos de hibridização *in situ* (BESENDORFER et al., 2002; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2003; JI et al., 2003; DOLEZEL et al., 2004).

A metodologia utilizada, adaptada de Clarindo et al. (2002; 2003), proporcionou o acúmulo de prometáfases adequadas para análise e montagem do cariograma de *C. congensis* (Figura 1a). Nessa metodologia, empregaram-se, para obtenção de células em divisão, suspensões de agregados celulares. Considerando as dificuldades existentes, baixa taxa de germinação e baixo índice metafásico (FONTES, 2003), quando meristemas radiculares de café são utilizados como fonte de material citogenético, as suspensões de agregados celulares foram importantes para a aquisição de prometáfases.

A vantagem da cultura de células em meio líquido é a elevada freqüência de células em mitose (FOWLER e VASIL, 1984). Entretanto, há necessidade de renovação periódica do meio, total ou parcial, para que as células atinjam a fase mitótica do ciclo celular (COLLIN e EDWARDS, 1998). No presente estudo foram adotados subcultivos em intervalos de 15 dias (CORDEIRO, 1999), procedimento que dificultou o acúmulo de algum tipo de metabólito tóxico para as células, bem como a deficiência de outros, ou mesmo evitou a manutenção prolongada das células em pH muito afastado do ideal (CID, 1998).

A utilização do antitubulínico APM foi também importante no acúmulo de células metafásicas. Segundo Lucretti e Dolezel (1995), Dolezel et al. (1999) e Planchais et al. (2000), o APM possui alta afinidade pelas tubulinas vegetais, apresentando elevada atividade de despolimerização dos microtúbulos, impedindo que as células atinjam a anáfase.

As etapas de fixação, maceração enzimática, dissociação celular e secagem ao ar, também aplicadas neste estudo, proporcionaram cromossomos morfológicamente preservados e não sobrepostos, adequados para análise citogenética.

5- CONCLUSÕES

A presença de metáfases com cromossomos morfologicamente bem preservados, pouco condensados e com constrições bem definidas possibilitou a montagem do kariograma de *C. congensis* e a obtenção de informações acerca da organização do genoma dessa espécie.

A utilização de suspensões de agregados celulares oferece uma alternativa viável para obtenção de cromossomos metafásicos, considerando-se as dificuldades existentes quando se utilizam meristemas radiculares das espécies do gênero *Coffea*.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P. M. **Caracterização morfológica e bandeamento com laranja de acridina dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annum* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 65 p. (Dissertação M. S.).
- ANSARI, H. A.; ELLISON, N. W.; READER, S. M.; BADAEVAS, E. D.; FRIEBES, B.; MILLER, T. E.; WILLIAMS, W. M. Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S-26S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. **Annals of Botany**, 83: 199-206, 1999.
- BARRETT, S. D. Software for scanning microscopy. **Proceedings of the Royal Microscopy Society**, 37: 7-14, 2002.
- BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 139: 99-108, 2002.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; ZANATTA, A. C.; PRESTES, A. M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; GUERRA, M. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ*

- hybridization with different DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, 26: 505-510, 2003.
- CAIXETA, G. Z. T. **Gerenciamento da cafeicultura em época de crise.** Tecnologias de produção de café com qualidade. Visconde de Rio Branco, MG: 2001. 80 p.
- CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.).** Viçosa, MG: UFV, 1995. 127 p. (Tese D. S.).
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, 70: 515-519, 1993.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, 136: 159-168, 2002.
- CID, L. P. B. **Suspensão celular cultura, de tecidos e transformação genética de plantas.** [S. I.]: Embrapa, 1998. 450 p.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; GASPERAZZO, T. A.; FONTES, M. A. Morfometria dos cromossomos de *Coffea arabica* L. var. Catuaí Vermelho. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; FONTES, M. A. Bandejamento NOR e coloração com laranja de acridina em cromossomos metafásicos de *Coffea canephora*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).
- COLLIN, H. A.; EDWARDS, S. **Growth of callus and cell suspension cultures.** Plant Cell Culture. [S. I.]: Springer, 1998. 470 p.

- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. Viçosa, MG: 1999. 130 p. (Tese D. S.).
- DOLEZEL, J.; CIHALIKOVA, J.; WEISEROVA, J.; LUCRETTI, S. Cell cycle synchronization in plant root meristems. **Methods in Cell Science**, 21: 95-107, 1999.
- DOLEZEL, J.; KUBALÁKOVÁ, M.; BARTOS, J.; MACAS, J. Flow cytogenetics and plant genome mapping. **Chromosome Research**, 12: 77-91, 2004.
- FONTES, B. P. D. **Citogenética, citometria de fluxo e citometria de imagem em *Coffea* spp.** Viçosa, MG: UFV, 2003, 130 p. (Tese D. S.).
- FOWLER, M. W.; VASIL, I. K. Large scale cultures of cells in suspension. **Cell culture and somatic cell genetic of plants: laboratory procedures and their applications**, 1: 67-74, 1984.
- GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, 9: 741-743, 1986.
- JI, F. Y.; YU, Q. X.; LI, K.; REN, X. H. Ag-staining pattern, FISH and ISH with rDNA probes in the rice field el (*Monopterus albus* Zuiew) chromosomes. **Hereditas**, 138: 207-212, 2003.
- KRUG, C. A. Variações somáticas em *Coffea arabica* L. **Instituto Agronômico do Estado**, em Campinas, 12: 1-11, 1938.
- LANGER, A.; KOUL, A. K. Studies on nucleolus and nucleolar chromosomes in Angiosperms IX. *Lilium* Linn. **Cytologia**, 48: 519-526, 1983.
- LUCRETTI, S.; DOLEZEL, J. Cell cycle synchronization, chromosome isolation, and flow-sorting in plants. **Methods in Cell Biology**, 50: 61-83, 1995.

- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. **Caryologia**, 40: 7-23, 1987.
- PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, 476: 78-83, 2000.
- SATO, S.; HIMUZE, M.; KAWAMURA, S. Relationship between secondary constrictions and nucleolus organizing regions in *Allium sativum* chromosomes. **Protoplasma**, 105: 77-85, 1980.
- SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman, 1990. 419 p.
- van BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 44: 7-17, 1995.
- VILHAR, B.; VIDIC, T.; JOGAN, N.; DERMASTIA, M. Genome size and the nucleolar number as estimators of ploidy level in *Dactylis glomerata* in the Slovenian Alps. **Plant Systematics and Evolution**, 234: 1-13, 2002.
- von KALM, L.; SMYTH, D. R. Ribosomal RNA genes and the substructure of nucleolar organizing regions in *Lilium*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, 26: 158-166, 1984.

ESTIMAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA, EM PICOGRAMAS, PARA CADA CROMOSSOMO DO COMPLEMENTO DE *Coffea canephora* cv. Apoatã

A citometria de fluxo e a citometria de imagem são métodos utilizados para estimar o tamanho do genoma de plantas. O mensuramento do conteúdo de DNA de plantas fornece informações úteis para o melhoramento, sistemática e taxonomia vegetal. O objetivo do presente estudo foi estimar o conteúdo de DNA em picogramas (pg) para cada cromossomo de *C. canephora* cv. Apoatã via citometria de imagem. Para obtenção de cromossomos metafásicos, foi adicionado ao meio de cultura contendo agregados celulares de *C. canephora* o bloqueador amiprofos-metil (APM), na concentração final de 4 μ M. Após quatro horas de bloqueio, os agregados foram retirados, fixados em solução de etanol (95%):ácido acético (3:1) por 24 horas. A solução fixadora foi substituída por etanol 70%, e os agregados foram armazenados. As preparações citogenéticas foram realizadas pela técnica de dissociação celular e secagem ao ar. As lâminas foram colocadas em solução fixadora de metanol:formalina:ácido acético 17:5:1 por 12 horas, lavadas em água corrente e hidrolisadas em HCl 5N. Após hidrólise, as lâminas foram lavadas em água destilada, secadas ao ar e recobertas com reativo de Schiff. Após a etapa de coloração, cada lâmina foi submetida a duas lavagens, uma em água sulfurosa e outra em água destilada. As lâminas foram analisadas em microscópio acoplado a uma câmera monocromática e as metáfases, capturadas usando uma objetiva de 100X, um filtro de densidade neutra (ND6) e outro de interferência de cor verde (IF550). O programa Image Pro-Plus 4.5 e uma tabela de calibração com valores de

densidade conhecidos foram empregados para calibrar e processar as imagens. Os procedimentos metodológicos adotados para a citometria de imagem, envolvendo as etapas de bloqueio, fixação, maceração enzimática, hidrólise, coloração com reativo de Schiff e calibração dos equipamentos de microscopia e análise de imagem, foram apropriados para obtenção de valores de DOI e mensuramento do conteúdo de DNA em pg para cada cromossomo de *C. canephora* cv. Apatã. Três prometáfases e seis metáfases foram utilizadas para estimar os valores de DOI. A partir desses valores e do conteúdo de DNA, $2C = 1,43$ pg, do cultivar Apatã estimou-se o conteúdo de DNA em pg por cromossomo. Os resultados abrangem informações acerca do genoma dessa espécie que podem ser úteis em programas de melhoramento e seqüenciamento e em estudos evolutivos.

Palavras-chave: *C. canephora*, citometria de imagem, cromossomos.

1- INTRODUÇÃO

O mensuramento do conteúdo de DNA em plantas fornece informações úteis para o melhoramento, sistemática e taxonomia vegetal (VOLGMAYR e GREILHUBER, 1998). Além disso, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, o conhecimento do tamanho do genoma se faz necessário para o planejamento de projetos de seqüenciamento (HARDIE et al., 2002).

Para estimar o conteúdo de DNA em plantas, dois métodos vêm sendo utilizados: a citometria de fluxo e a citometria de imagem (MOSCONE et al., 2003).

A quantificação de DNA por cromossomo pode ser realizada por citometria de fluxo e *sorting*, denominada cariotipagem de fluxo. A separação dos cromossomos nesses equipamentos ocorre de acordo com o tamanho, morfologia e intensidade de fluorescência por eles apresentados (DOLEZEL et al., 2004). Para isso, uma preparação de suspensão cromossômica com elevada qualidade é um pré-requisito para a eficiência da cariotipagem de fluxo (LUCRETTI et al., 1993).

Uma metodologia que possibilita a quantificação de DNA por cromossomo pela citometria de imagem foi padronizada por Rosado (2004). Nesse estudo, cromossomos metafásicos e valores de conteúdo de DNA nuclear, estimados por citometria de fluxo, foram utilizados para mensurar o conteúdo de DNA em picogramas (pg) para cada cromossomo de milho. Essa autora relatou que as técnicas de dissociação celular e secagem ao ar foram fundamentais para obtenção de cromossomos no mesmo plano de foco da lâmina e com morfologia adequada para análise. Além disso, as etapas de fixação, hidrólise e coloração com reativo de

Schiff proporcionaram cromossomos corados que puderam ter a densidade óptica integrada (DOI) calculada.

No propósito de gerar informações acerca do genoma de *C. canephora* cv. Apoatã, o objetivo do presente estudo foi estimar o conteúdo de DNA em pg, para cada cromossomo, por citometria de imagem.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Material

As suspensões de agregados celulares de *C. canephora* cv. Apatã foram cedidas pelo Dr. Antônio Teixeira Cordeiro, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e pelos técnicos da Embrapa Marcelo Antonio Fontes e Ana Cláudia F. Cruz, do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BIOCAFÉ) da UFV. As análises citométricas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal da UFV.

2.2- Métodos

2.2.1- Obtenção, manutenção e repicagem das suspensões de agregados celulares de *C. canephora*

O item 2.2.1 foi processado de forma idêntica à descrita no item 2.2.1 do capítulo 1.

2.2.2- Preparação do material citogenético

Aos meios de cultura contendo agregados celulares foi adicionado o bloqueador amiprofos-metil (APM) na concentração final de 4 μ M. As amostras

permaneceram no meio de cultura com o bloqueador por um período de quatro horas (CLARINDO et al., 2003).

2.2.3- Citometria de imagem

Os agregados de *C. canephora* foram retirados do tratamento de bloqueio, lavados em água destilada e fixados com solução gelada de etanol (95%):ácido acético (3:1). O fixador foi trocado por três vezes, sendo os agregados armazenados a -20 °C por 24 horas. A solução fixadora inicialmente utilizada foi substituída por etanol 70%, sendo este fixador trocado por três vezes e os agregados armazenados (modificado de NEUMANN et al., 1998; ZORINIANTS et al., 2003).

2.2.3.1- Maceração enzimática

Os agregados, depois de transferidos para tubos de microcentrífuga Eppendorfs, foram lavados em água destilada para remoção do fixador. Em seguida, foi adicionada 1 mL de solução enzimática contendo hemicelulase 1%, celulase 1,5% e pectinase 0,01%. Os tratamentos foram mantidos à temperatura de 34 °C por 30 minutos, em banho-maria. Após a maceração, a solução enzimática foi retirada, e os agregados foram fixados em solução de etanol 70% (modificado de CLARINDO et al., 2003; ROSADO, 2004).

2.2.3.2- Preparação das lâminas

Cada agregado foi transferido para uma lâmina de vidro, previamente limpa. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa), um bisturi e uma placa aquecedora foram realizadas a dissociação celular e a posterior secagem ao ar, seguindo os procedimentos descritos por Carvalho (1995). Subseqüentemente, aos cinco minutos em placa aquecedora, as lâminas foram colocadas em cubetas contendo solução fixadora de metanol:formalina:ácido acético (17:5:1) por 12 horas (ROSADO, 2004).

2.2.3.3- Reação de Feulgen

A coloração pela reação de Feulgen em lâminas foi adaptada segundo procedimentos descritos por Greilhuber (1998) e Vilhar et al. (2001) para coloração de meristemas radiculares e de Rosado (2004) para coloração de cromossomos metafásicos.

As lâminas foram retiradas do fixador, lavadas por 10 minutos em água corrente e hidrolisadas em HCl 5 N à temperatura de 25 °C, por períodos variando entre 12, 14, 16, 18, 20, ou 22 minutos, para padronizar o tempo de hidrólise mais adequado.

Após hidrólise, as lâminas foram lavadas em água destilada por dois minutos, secadas ao ar e recobertas com 2 mL de reativo de Schiff (5 g de Fucsina Básica, 15 mL de HCl 1 N, 2,23 g de K₂S₂O₅, 1 g de carvão ativo e 85 mL de água destilada) por 12 ou 24 horas.

Após a etapa de coloração, cada lâmina foi submetida a duas lavagens de dois minutos cada, uma em água sulfurosa (2,5 mL de K₂S₂O₅ 10% em 50 mL de água destilada) e outra em água destilada.

2.2.3.4- Análise dos dados

As lâminas foram analisadas num microscópio Olympus™ (modelo BX-60) acoplado a uma câmera monocromática CCD de 12 bits do kit de análise de imagem Cool SNAP™. As metáfases foram capturadas usando uma objetiva de 100X, um filtro de densidade neutra (ND6) e outro de interferência de cor verde (IF550).

O programa Image Pro-Plus 4.5 e uma tabela de calibração com valores de densidade conhecidos foram empregados para processar as imagens. Foi utilizada uma curva de calibração a partir dos filtros de densidade óptica (DO)= 0,4; 0,22; 0,42; 0,60; 0,79; 0,99; 1,18; 1,36; 1,55; 1,75; 1,95; e 2,13, certificados pela Stouffer Industries.

Para determinar a DOI foram utilizados valores tanto de regiões contendo cromossomos quanto de regiões com ausência de material celular na lâmina. O

programa computacional Image Pro-Plus calculou automaticamente a DOI, por meio da seguinte equação (VOLGMAYR e GREILHUBER, 1998):

$$DOI = \sum_{i=1}^n - \log_{10} \frac{If_i}{Ib_i}$$

em que:

n = número total de pixels no cromossomo;

If = intensidade dos pixels do cromossomo; e

Ib = intensidade dos pixels da área limpa da lâmina.

3- RESULTADOS

Três prometáfases (Figura 1a, d, e) e seis metáfases (Figura 1b, c, f, g, h, i), contendo cromossomos morfologicamente preservados e sem sobreposições, foram selecionadas para que fosse realizado o cálculo da DOI. Os nove kariogramas foram montados de acordo com as características morfométricas dos cromossomos, como tamanho e posição do centrômero.

A DOI foi mensurada para cada um dos 198 cromossomos, e a DOI total variou entre 8,57 – 5,75 (Quadro 1). A partir dos valores descritos nesse quadro, foram calculados os valores percentuais de DOI em cada cromossomo (Quadro 2).

Para que o conteúdo de DNA em pg pudesse ser estimado em cada cromossomo, utilizaram-se os valores de DOI listados no Quadro 1 e o conteúdo de DNA ($2C = 1,43$ pg) de *C. canephora* cv. Apatã quantificado por Fontes (2003) pela citometria de fluxo. Os valores obtidos estão apresentados no Quadro 3.

Com base nos valores desse quadro, foi calculado o conteúdo de DNA médio, em cada cromossomo, das três prometáfases e seis metáfases do complemento de *C. canephora*. A partir da média desses valores, obteve-se o conteúdo de DNA em pg de cada cromossomo de *C. canephora*, que variou entre 0,18 (cromossomo 1) e 0,10 pg (cromossomos 10 e 11).

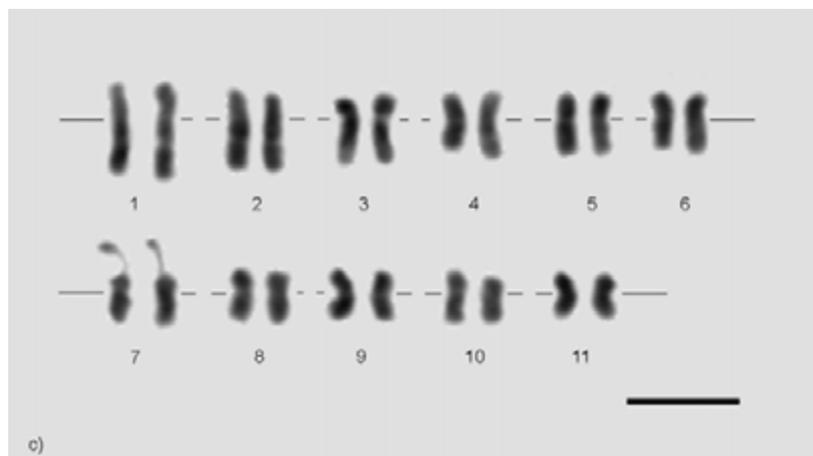
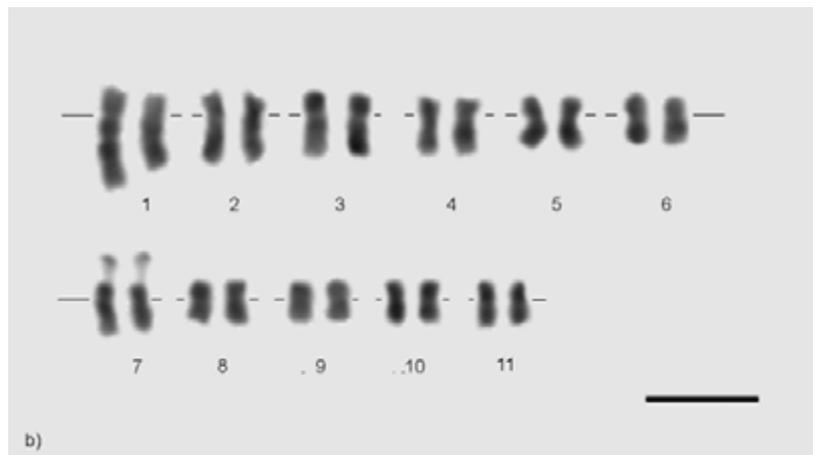
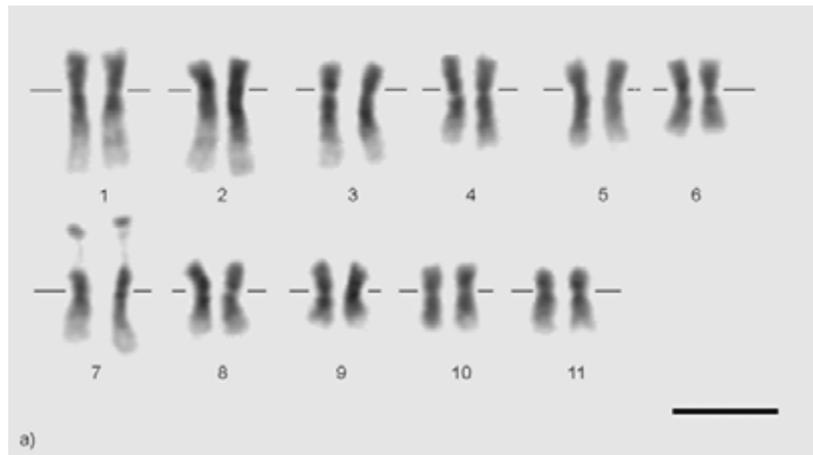


Figura 1 (a – c) - Cariogramas de *C. canephora* cv. Apoatã ($2x=22$ cromossomos) obtidos de suspensões de agregados celulares e corados com Feulgen por 24 horas (barra = 5 μ m). Continua...

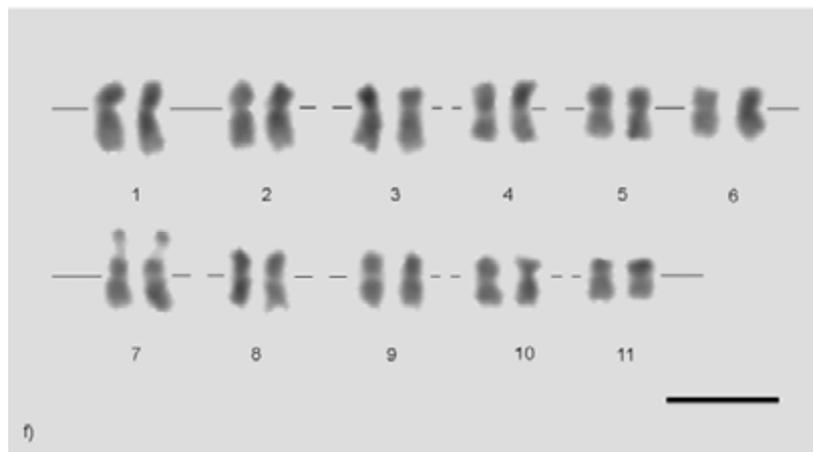
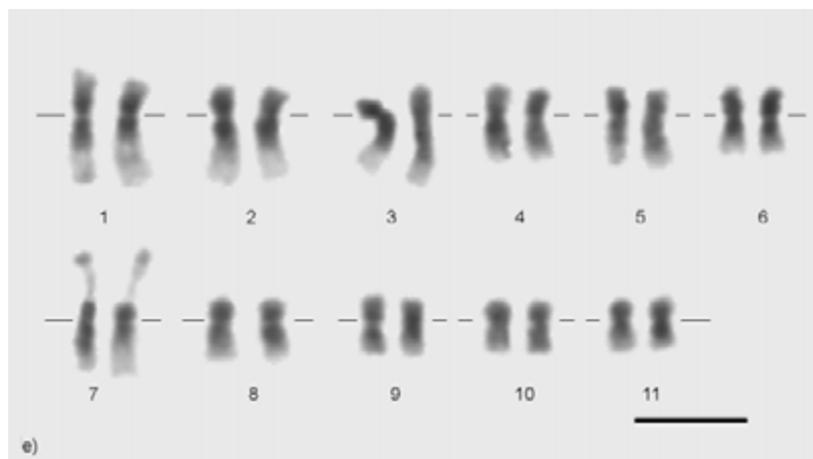
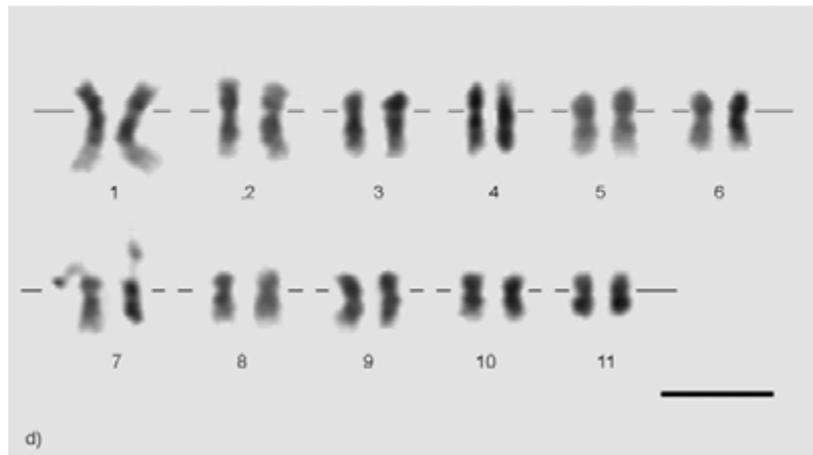


Figura 1 (d – f) - Cariogramas de *C. canephora* cv. Apoatã ($2x=22$ cromossomos) obtidos de suspensões de agregados celulares e corados com Feulgen por 24 horas (barra = 5 μm). Continua...

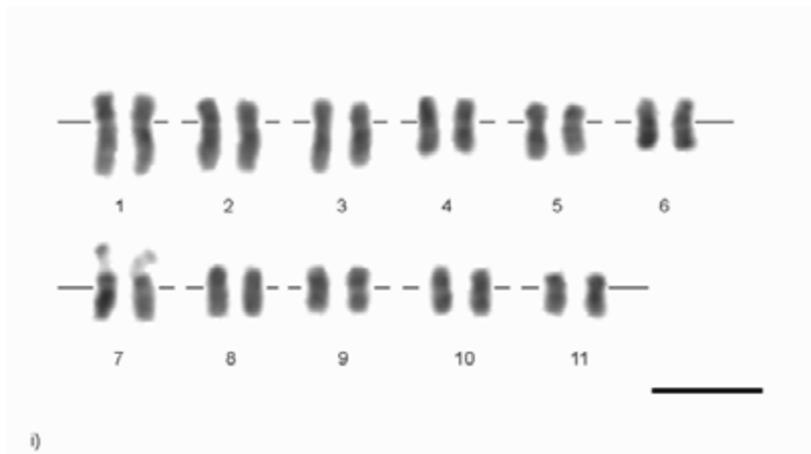
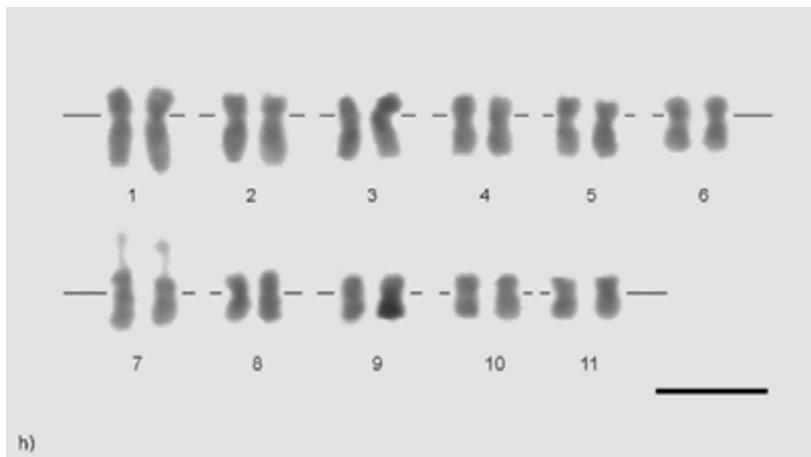
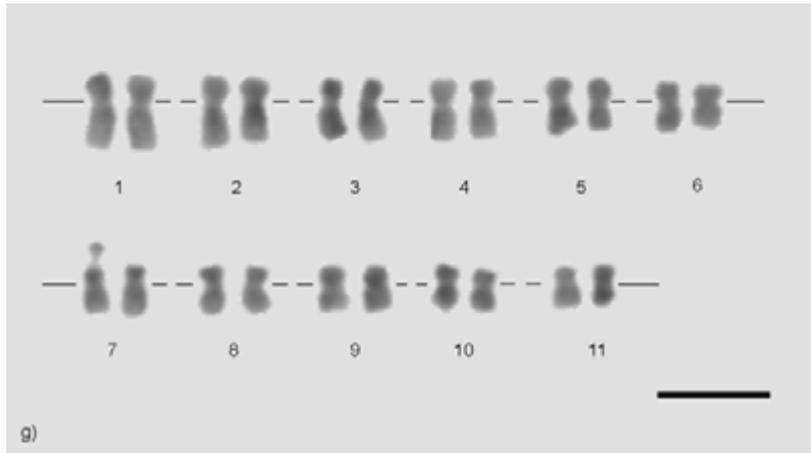


Figura 1 (g – i) - Cariogramas de *C. canephora* cv. Apoatã ($2x=22$ cromossomos) obtidos de suspensões de agregados celulares e corados com Feulgen por 24 horas. Em 1 g, um dos cromossomos do sétimo par, contrário a todos os outros, não apresenta constrição secundária distendida (barra = 5 μm).

Quadro 1 - Valores de densidade óptica integrada (DOI) obtidos por citometria de imagem, referentes aos cromossomos individuais e totais das três prometáfases e seis metáfases de *C. canephora* cv. Aipoatã

Cromossomo	Valores de DOI								
	Prometáfases e Metáfases								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1a	0,47	0,74	0,47	0,49	0,47	0,54	0,35	0,48	0,44
1b	0,47	0,53	0,51	0,54	0,51	0,49	0,35	0,52	0,41
2a	0,50	0,44	0,52	0,42	0,51	0,47	0,33	0,44	0,42
2b	0,57	0,43	0,46	0,45	0,45	0,50	0,36	0,45	0,41
3a	0,42	0,47	0,41	0,40	0,42	0,48	0,32	0,38	0,35
3b	0,41	0,48	0,40	0,45	0,44	0,45	0,29	0,45	0,35
4a	0,36	0,34	0,37	0,42	0,42	0,38	0,26	0,37	0,34
4b	0,39	0,39	0,34	0,44	0,36	0,40	0,26	0,35	0,31
5a	0,36	0,35	0,41	0,36	0,34	0,39	0,30	0,34	0,32
5b	0,32	0,35	0,35	0,38	0,39	0,37	0,24	0,36	0,27
6a	0,32	0,33	0,36	0,33	0,35	0,35	0,24	0,33	0,31
6b	0,31	0,30	0,37	0,39	0,36	0,39	0,23	0,32	0,29
7a	0,34	0,36	0,30	0,38	0,34	0,38	0,23	0,36	0,33
7b	0,33	0,32	0,35	0,32	0,34	0,41	0,23	0,32	0,26
8a	0,34	0,30	0,32	0,28	0,35	0,34	0,22	0,29	0,29
8b	0,32	0,30	0,32	0,32	0,34	0,32	0,20	0,32	0,26
9a	0,31	0,29	0,35	0,37	0,31	0,33	0,23	0,30	0,27
9b	0,32	0,27	0,31	0,34	0,30	0,33	0,26	0,41	0,26
10a	0,28	0,28	0,29	0,33	0,29	0,33	0,23	0,29	0,26
10b	0,29	0,28	0,27	0,32	0,28	0,30	0,21	0,28	0,26
11a	0,29	0,27	0,29	0,30	0,29	0,29	0,18	0,27	0,24
11b	0,28	0,25	0,29	0,31	0,29	0,31	0,21	0,29	0,24
Total	8,01	8,08	8,07	8,33	8,15	8,57	5,75	7,92	6,88

a, b = cromossomos homólogos; A, D, E = prometáfases; e B, C, F, G, H, I = metáfases.

Quadro 2 - Valores percentuais de densidade óptica integrada (DOI) calculados a partir dos dados do Quadro 1, referentes a cromossomos individuais das três prometáfases e seis metáfases de *C. canephora* cv. Apoatã

Cromossomo	Valores Percentuais de DOI								
	Prometáfases e Metáfases								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1a	5,87	9,19	5,91	6,16	5,84	6,80	4,33	5,99	5,45
1b	5,88	6,56	6,35	6,75	6,33	6,17	4,40	6,43	5,11
2a	6,25	5,51	6,53	5,22	6,39	5,84	4,18	5,46	5,29
2b	7,09	5,34	5,78	5,59	5,58	6,27	4,45	5,58	5,07
3a	5,30	5,89	5,13	4,98	5,18	6,03	4,05	4,70	4,34
3b	5,17	6,03	5,01	5,57	5,50	5,62	3,67	5,57	4,41
4a	4,55	4,24	4,62	5,23	5,22	4,79	3,25	4,58	4,19
4b	4,87	4,88	4,26	5,51	4,53	5,00	3,19	4,43	3,83
5a	4,44	4,40	5,11	4,46	4,30	4,88	3,73	4,26	3,94
5b	3,95	4,43	4,31	4,74	4,87	4,66	2,99	4,48	3,40
6a	4,03	4,11	4,43	4,13	4,34	4,35	3,05	4,11	3,89
6b	3,86	3,77	4,64	4,90	4,51	4,90	2,89	4,01	3,68
7a	4,20	4,53	3,80	4,71	4,24	4,73	2,88	4,56	4,09
7b	4,14	4,00	4,35	3,99	4,28	5,08	2,89	3,97	3,30
8a	4,26	3,71	4,00	3,53	4,33	4,29	2,75	3,60	3,63
8b	4,03	3,75	4,03	3,94	4,19	4,00	2,54	3,97	3,25
9a	3,89	3,56	4,34	4,57	3,86	4,07	2,91	3,81	3,36
9b	3,96	3,38	3,85	4,21	3,80	4,13	3,30	5,18	3,21
10a	3,54	3,47	3,56	4,14	3,63	4,13	2,90	3,63	3,19
10b	3,65	3,53	3,42	4,05	3,53	3,77	2,60	3,51	3,30
11a	3,60	3,41	3,67	3,77	3,58	3,68	2,21	3,42	2,97
11b	3,46	3,14	3,59	3,90	3,68	3,81	2,64	3,61	3,00
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100

a, b = cromossomos homólogos; A, D, E = prometáfases; e B, C, F, G, H, I = metáfases.

Quadro 3 - Estimativa da quantidade de DNA, em picogramas (pg), obtido a partir dos resultados apresentados no Quadro 1 e do conteúdo de DNA (2C = 1,43 pg) da variedade Aipoatã, referente a cromossomos individuais das três prometáfases e seis metáfases de *C. canephora* cv. Aipoatã

Cromossomo	Conteúdo de DNA (pg) em cada Cromossomo								
	Prometáfases e Metáfases								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1a	0,17	0,26	0,17	0,17	0,16	0,18	0,17	0,17	0,18
1b	0,17	0,19	0,18	0,19	0,18	0,16	0,18	0,19	0,17
2a	0,18	0,16	0,19	0,14	0,18	0,16	0,17	0,16	0,18
2b	0,20	0,15	0,16	0,15	0,16	0,17	0,18	0,16	0,17
3a	0,15	0,17	0,15	0,14	0,15	0,16	0,16	0,14	0,14
3b	0,15	0,17	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15
4a	0,13	0,12	0,13	0,14	0,15	0,13	0,13	0,13	0,14
4b	0,14	0,14	0,12	0,15	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
5a	0,13	0,12	0,15	0,12	0,12	0,13	0,15	0,12	0,13
5b	0,11	0,13	0,12	0,13	0,14	0,12	0,12	0,13	0,11
6a	0,12	0,12	0,13	0,11	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13
6b	0,11	0,11	0,13	0,13	0,13	0,13	0,11	0,12	0,12
7a	0,12	0,13	0,11	0,13	0,12	0,13	0,11	0,13	0,14
7b	0,12	0,11	0,12	0,11	0,12	0,14	0,12	0,11	0,11
8a	0,12	0,11	0,11	0,10	0,12	0,11	0,11	0,10	0,12
8b	0,12	0,11	0,11	0,11	0,12	0,11	0,10	0,11	0,11
9a	0,11	0,10	0,12	0,13	0,11	0,11	0,12	0,11	0,11
9b	0,11	0,10	0,11	0,12	0,11	0,11	0,13	0,15	0,11
10a	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,11	0,12	0,11	0,11
10b	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11
11a	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10
11b	0,10	0,09	0,10	0,11	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10
Valor 4C	2,86	2,86	2,86	2,86	2,86	2,86	2,86	2,86	2,86

a, b = cromossomos homólogos; A, D, E = prometáfases; e B, C, F, G, H, I = metáfases.

Quadro 4 - Estimativa do conteúdo médio de DNA em picogramas (pg) de cada cromossomo de *C. canephora* cv. Apatã

Cromossomo	Conteúdo de DNA (pg) em cada Cromossomo de <i>C. canephora</i>									
	Prometáfases e Metáfases									Média
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	0,17	0,22	0,17	0,18	0,17	0,17	0,17	0,18	0,18	0,18
2	0,19	0,15	0,17	0,15	0,17	0,16	0,17	0,16	0,17	0,17
3	0,15	0,17	0,14	0,15	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,15
4	0,13	0,13	0,13	0,15	0,14	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
5	0,12	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12
6	0,11	0,11	0,13	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13
7	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,11	0,12	0,12	0,12
8	0,12	0,11	0,11	0,10	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
9	0,11	0,10	0,12	0,12	0,11	0,11	0,12	0,13	0,11	0,11
10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,11	0,11	0,10	0,11	0,10
11	0,10	0,09	0,10	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Valor 2C	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43

A, D, E = prometáfases; e B, C, F, G, H, I = metáfases.

4- DISCUSSÃO

No presente estudo, a utilização de suspensões de agregados celulares como fonte de material citogenético foi fundamental para a obtenção de prometáfases e metáfases de *C. canephora* (Figura 1a – i). Culturas celulares mantidas em meio líquido apresentam elevada taxa de divisão (FOWLER e VASIL, 1984), facilitando a obtenção de células em mitose (CLARINDO et al., 2002; 2003)

O antitubulínico APM, utilizado na concentração final de 4 μ M por quatro horas, acumulou células prometafásicas e metafásicas (Figura 1a – i) com grau de compactação adequado para citometria de imagem. A coloração com Feulgen e, conseqüentemente, a estimacão do conteúdo de DNA por citometria de imagem podem ser afetados pelo nível de condensação da cromatina (DUIJNDAM e VAN DUIJN, 1975). O grau de compactação da cromatina interfere na formação de grupos aldeídos devido à proporção diferencial de depurinação entre cromatina condensada e descondensada durante a hidrólise (PRICE e JOHNSTON, 1996).

Outros fatores que interferem na mensuração do conteúdo de DNA por citometria de imagem são as condições de fixação dos tecidos e lâminas a serem submetidos à coloração com Feulgen (DUIJNDAM e VAN DUIJN, 1975; PRICE e JOHNSTON, 1996; CHIECO e DERENZINI, 1999). Segundo Hardie et al. (2002), em estudos de citometria de imagem, fixadores mais ácidos devem ser evitados, pois estes reagem com a solução de HCl, utilizada na hidrólise, promovendo a degradação do DNA. As soluções fixadoras empregadas no presente estudo preservaram a morfologia dos cromossomos por provocarem a precipitação de

nucleases e proteases, evitando, assim, a perda de fragmentos de DNA e proteínas (LEITCH et al., 1994).

A estrutura cromossômica e a coloração com Feulgen podem, também, ser afetadas por enzimas utilizadas na etapa de maceração enzimática (ROSADO, 2004). A solução enzimática (hemicelulase 1%, celulase 1,5% e pectinase 0,01%) empregada nos agregados celulares por 30 minutos a 34 °C (CLARINDO et al., 2003) promoveu a eliminação da parede celular sem interferir na estrutura cromossômica e na coloração com Feulgen.

As técnicas de maceração enzimática, dissociação celular e secagem ao ar (CARVALHO, 1995) proporcionaram lâminas com qualidade adequada para citometria de imagem, em que os cromossomos prometafásicos e metafásicos estavam espalhados, com poucas sobreposições e no mesmo plano de foco. Esses fatores possibilitaram a distribuição homogênea do cromóforo ao longo do cromossomo. Caso o cromóforo apresente distribuição não homogênea, a medida de absorvância obtida em determinado ponto pode não estar correlacionada com o conteúdo de DNA nuclear (CHIECO e DERENZINI, 1999).

Apesar de todos os fatores citados anteriormente, Chieco e Derenzini (1999) relataram que o ponto crítico da citometria de imagem é a etapa de hidrólise, em que o tempo deve ser determinado, a fim de garantir que não haja interferência na coloração do DNA pelo Feulgen. Durante a hidrólise ocorre a formação de radicais aldeídos nas desoxirriboses, por meio da depurinação, essenciais por se associarem aos cromóforos presentes no reativo de Schiff (HARDIE et al., 2002).

A coloração adequada com Feulgen foi obtida em lâminas coradas por 24 horas e hidrolisadas por 18 minutos. Períodos inferiores e superiores de hidrólise resultaram lâminas em que os cromossomos não puderam ser visualizados. A eliminação de fragmentos de DNA em períodos de hidrólise superiores a 18 minutos e a ausência de grupos aldeídos em períodos inferiores impossibilitaram a coloração dos cromossomos com Feulgen.

A adequação das metodologias, a coloração homogênea dos cromossomos (Figura 1a – i) e a calibração dos equipamentos de microscopia, realizada com filtros certificados pela Stouffer Industries, garantiram o processamento de imagens digitais em programa de análise de imagens. O programa Image Pro-Plus 4.5 automaticamente realizou o cálculo da densidade óptica das regiões coradas, permitindo a determinação da DOI em cada um dos 198 cromossomos (Quadro 1).

Os valores de DOI (Quadro 1) e o valor $2C = 1,43$ pg de *C. canephora* cv. Apatã (FONTES, 2003) foram utilizados para mensurar o conteúdo de DNA em pg em cada um dos cromossomos desse cultivar (Quadro 4). Observou-se que, quanto menor o cromossomo, menor o seu conteúdo de DNA.

Outro método que também pode ser utilizado para mensurar a quantidade de DNA por cromossomo é a cariotipagem de fluxo (citometria de fluxo e *sorting*). Cariotipagens de fluxo têm sido úteis no monitoramento de mudanças cariotípicas, na detecção de alterações cromossômicas estruturais, na construção de bibliotecas de DNA cromossomo específico, no mapeamento genético e no isolamento de genes de interesse agrônomico (LUCRETTI et al., 1993; LEE et al., 1997). Entretanto, a cariotipagem de fluxo necessita de suspensões com grande quantidade de cromossomos intactos e de técnicas que possibilitem a diferenciação dos picos referentes a cada cromossomo (LUCRETTI et al., 1993).

Para que se estime o conteúdo de DNA na cariotipagem de fluxo, deve haver a separação dos cromossomos proporcionada de acordo com o tamanho, morfologia e intensidade de fluorescência. Portanto, em espécies que possuem cromossomos morfológicamente semelhantes, os picos gerados nos histogramas provavelmente não apresentam resolução suficiente para determinar a que cromossomos pertencem (DOLEZEL et al., 2004).

Lee et al. (2002), utilizando citometria de fluxo e *sorting*, apesar de os picos obtidos nos histogramas não terem tido resolução suficiente para discriminar todos os cromossomos, relataram que o conteúdo de DNA do cromossomo 1 de oito linhagens de milho variou de 0,685 a 0,747 pg (9,1%). No entanto, Rosado (2004), utilizando a citometria de imagem, além de mensurar o conteúdo de DNA em todos os cromossomos de milho, obteve, no cromossomo 1, valores de conteúdo de DNA variando entre 0,749 e 0,809 pg (8%). Esses dados indicam que a citometria de imagem é, também, um método adequado para determinar o conteúdo de DNA por cromossomo.

Em adição, a citometria de imagem tem a vantagem de possibilitar estudos em pequenas amostras de núcleos e cromossomos diferentemente da citometria de fluxo, que necessita de grande quantidade de núcleos ou cromossomos em suspensão (PRICE e JOHNSTON, 1996; ROSS, 1996; HARDIE et al., 2002).

5- CONCLUSÕES

Os procedimentos metodológicos adotados na citometria de imagem, envolvendo as etapas de bloqueios, fixação, maceração enzimática, hidrólise, coloração com Feulgen e calibração dos equipamentos de microscopia e análise de imagem, foram apropriados para obtenção de valores de DOI e mensuramento do conteúdo de DNA em pg em cada cromossomo de *C. canephora* cv. Apatã.

Os resultados indicaram uma variação no conteúdo de DNA de 0,18 (cromossomo 1) a 0,10 pg (cromossomo 11) e abrangem informações acerca do genoma dessa espécie que podem ser úteis em programas de melhoramento e seqüenciamento e em estudos evolutivos.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 127 p. (Tese D. S.).
- CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochemistry and Cellular Biology**, 111: 345-358, 1999.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; GASPERAZZO, T. A.; FONTES, M. A. Morfometria dos cromossomos de *Coffea arabica* L. var. Catuaí Vermelho. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; FONTES, M. A. Bandeamento NOR e coloração com laranja de acridina em cromossomos metafásicos de *Coffea canephora*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).
- DOLEZEL, J.; KUBALÁKOVÁ, M.; BARTOS, J.; MACAS, J. Flow cytogenetics and plant genome mapping. **Chromosome Research**, 12: 77-91, 2004.
- DUIJNDAM, W. A. L.; VAN DUIJN, P. The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films. II

Investigations on films containing condensed or swollen chicken erythrocyte nuclei. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 23: 891-900, 1975.

FONTES, B. P. D. **Citogenética, citometria de fluxo e citometria de imagem em *Coffea* spp.** Viçosa, MG: UFV, 2003, 130 p. (Tese D. S.).

FOWLER, M. W.; VASIL, I. K. **Large scale cultures of cells in suspension.** Cell culture and somatic cell genetic of plants: laboratory procedures and their applications. [S. l.: s. n.], 1984, 1: 67-74.

GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size: A Critical Reassessment. **Annals of Botany**, 82: 27-35, 1998.

HARDIE, D. C.; GREGORY, T. R.; HEBERT, P. D. N. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 50: 735-749, 2002.

LEE, J. H.; ARUMUGANATHAN, K.; KAEPLER, S. M.; PARK, S. W.; KIM, K. Y. Variability of chromosomal DNA contents in maize (*Zea mays* L.) inbred and hybrid lines. **Planta**, 215: 666-671, 2002.

LEE, J. H.; ARUMUGANATHAN, K.; YEN, Y.; KAEPLER, S.; KAEPLER, H.; BAENZIGER, P. S. Root tip cell cycle synchronization and metaphase-chromosome isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genoma**, 40: 633-638, 1997.

LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I. J. **In situ hibridization:** a practical guide. Oxford, BIOS Scientific, 1994. 118 p.

LUCRETTI, S.; DOLEZEL, J.; SCHUBERT, I.; FUCHS, J. Flow karyotyping and sorting of *Vicia faba* chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, 85: 665-672, 1993.

- MOSCONE, E.; BARANYI, M.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F.; HUNZIKER, A. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. **Annals of Botany**, 92: 21-29, 2003.
- NEUMANN, P.; LYSAK, M.; DOLEZEL, J.; MACAS, J. Isolation of chromosomes from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. **Plant Science**, 137: 205-215, 1998.
- PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S. Influence of light on DNA content of *Helianthus annuus*. **Proceedings of the National Academy of Science**, 93: 11264-11267, 1996.
- ROSADO, T. B. **Análise citogenética de cromossomos B de milho (*Zea mays* L.) associada às citometrias de fluxo e de imagem**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 71 p. (Dissertação M. S.).
- ROSS, J.S. **DNA ploidy and cell cycle analysis in pathology**. [S. l.]: IGAKU-SHOIN Medical Publishers, 1996, 156 p.
- VILHAR, B.; GREILHUBER, J.; KOCE, J. D.; TEMSCH, E.M.; DERMASTIA, M. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. **Annals of Botany**, 87: 719-728, 2001.
- VOLGMAYR, H.; GREILHUBER, J. Genome size determination in Peronosporales (Oomycota) by Feulgen image analysis. **Fungal Genetics and Biology**, 25: 181-195, 1998.
- ZORINIANTS, S. E.; NOSOV, A. V.; MONFORTE-GONZALEZ, M.; MENDES-ZEEL, M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry. **Plant Science**, 164: 141-146, 2003.

UTILIZAÇÃO DO NÚMERO DE NUCLÉOLOS COMO PARÂMETRO PARA INFERIR A OCORRÊNCIA DE VARIAÇÃO SOMACLONAL EM SUSPENSÕES DE AGREGADOS CELULARES DE *C. canephora* cv. Apoatã

O nucléolo é um corpúsculo nuclear, existente nas células eucarióticas, em que ocorrem o processamento de rRNAs e a estruturação das subunidades ribossomais. Os núcleos das células meristemáticas das espécies diplóides do gênero *Coffea* apresentam, normalmente, um nucléolo. Os objetivos deste estudo foram: (i) verificar se há relação entre os núcleos interfásicos com diferente número de nucléolos e o tempo de manutenção das culturas nas condições *in vitro* de *C. canephora* cv. Apoatã; e (ii) averiguar se o número de nucléolos pode ser utilizado como parâmetro para inferir a ocorrência de variação somaclonal. Amostras de calos embriogênicos friáveis, coletados antes de serem colocados em meio líquido (tempo 0), e de agregados celulares de *C. canephora*, coletados em intervalos de 15 dias (período de subcultivo), foram fixadas em solução de metanol:ácido acético (3:1). As preparações citológicas foram realizadas pela técnica de dissociação celular com digestão enzimática, secagem ao ar e coradas com solução de AgNO₃ (50%) a 34 °C, por 18 horas. Os dados foram submetidos à análise de regressão, tendo como variável independente tempo (dias) e dependente, o número de nucléolos. Em média foram analisados 143 núcleos por lâmina, totalizando 9.439. Núcleos com um, dois, três ou quatro nucléolos foram encontrados, os quais apresentavam tamanho uniforme. A análise de regressão evidenciou que o número de núcleos com um nucléolo diminuiu, ao contrário do que aconteceu com núcleos portando dois, três e

quatro nucléolos. Os resultados indicam que o tempo das suspensões nas condições *in vitro* interfere no número de núcleos com um, dois, três e quatro nucléolos, e que o número de nucléolos pode ser útil na verificação de ocorrência de variação somaclonal.

Palavras-chave: *C. canephora*, nucléolo, variação somaclonal.

1- INTRODUÇÃO

O nucléolo é um corpúsculo nuclear, existente nas células eucarióticas, em que ocorrem o processamento de rRNAs e a estruturação das subunidades ribossomais (GONZÁLES-GARCIA et al., 1995; MOSGOELLER et al., 1996; SHAW et al., 2003). Em *Coffea*, os núcleos das células meristemáticas das espécies diplóides apresentam um nucléolo (SYBENGA, 1960; PINTO-MAGLIO e CRUZ, 1987), raramente dois, medindo de 1,5 a 4,0 μM (SYBENGA, 1960).

O nucléolo pode ser evidenciado pela coloração Ag-NOR. Essa técnica usualmente gera grânulos escuros nesse corpúsculo (SIRRI et al., 2000), resultado da impregnação da prata a proteínas arginofílicas, como a proteína nucleolina, proteína B23, UBF (fator de transcrição da RNA polimerase I) e três subunidades da RNA polimerase I (SIRRI et al., 2000; SUMNER, 2003).

Após a aplicação da coloração Ag-NOR, o número de nucléolos foi utilizado por Vilhar et al. (2002) para estimar o nível de ploidia de *Dactylis glomerata*. Esses autores relataram que a análise de nucléolos representa um método rápido e eficaz para determinar o nível de ploidia, além de ser uma metodologia que pode ser aplicada em tecidos que não possuem células em divisão.

Os objetivos deste estudo foram: (i) verificar se há relação entre os núcleos interfásicos com diferente número de nucléolos e o tempo de manutenção das culturas nas condições *in vitro* de *C. canephora* cv. Apatã; e (ii) averiguar se o número de nucléolos pode ser utilizado como parâmetro para inferir a ocorrência de variação somaclonal.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Material

As suspensões de agregados celulares de *C. canephora* cv. Apatã foram cedidas pelo Dr. Antônio Teixeira Cordeiro, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e pelos técnicos da Embrapa Marcelo Antonio Fontes e Ana Cláudia F. Cruz, do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BIOCAFÉ) da UFV. As análises citológicas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal da UFV.

2.2- Métodos

2.2.1- Obtenção, manutenção e repicagem das suspensões de agregados celulares de *C. canephora* cv. Apatã

O item 2.2.1 foi processado de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.1, do capítulo 1.

2.2.2- Coleta do material

Calos embriogênicos friáveis de *C. canephora* foram coletados antes de serem colocados em meio líquido (tempo 0). Os agregados celulares foram

coletados no dia do subcultivo, que ocorreu em intervalos de 15 dias até o 150^o dia (10^o subcultivo), totalizando 11 amostras.

Os calos e agregados celulares foram fixados em solução de metanol:ácido acético (3:1). Foram realizadas três trocas de fixador, em intervalos de 10 minutos, com a reserva de que, após a última troca, o material foi estocado a -20 °C (CARVALHO e SARAIVA, 1993; CARVALHO, 1995)

2.2.3- Maceração enzimática

A etapa de maceração enzimática foi efetuada de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.3, do capítulo 1.

2.2.4- Técnica de dissociação celular e secagem ao ar

A técnica de dissociação celular e secagem ao ar (CARVALHO, 1995) foi realizada conforme descrito no item 2.2.4 do capítulo 1. Foram feitas seis lâminas para cada tratamento, totalizando 66 lâminas, constituindo cada lâmina uma repetição.

2.2.5- Coloração utilizando solução de AgNO₃

A técnica de coloração Ag-NOR, adaptada da metodologia desenvolvida por Goodpasture e Bloom (1975), foi realizada com o gotejamento de solução de AgNO₃ 50% sobre as lâminas de *C. canephora*. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínula e colocadas em câmara úmida a 34 °C, por 18 horas. Decorrido o tempo de armazenamento, as lamínulas foram retiradas com água e as lâminas, lavadas em água corrente e destilada por dois minutos.

2.2.6- Contagem dos núcleos

As lâminas foram observadas em fotomicroscópio OlympusTM, modelo BH-2, com objetiva de 40X. Os núcleos observados tiveram o número de nucléolos computados de forma otimizada em programa Excel e convertidos em valores percentuais.

2.2.7- Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise de regressão, a fim de se estabelecer uma relação entre o número de nucléolos e o tempo de subcultivo das suspensões de agregados celulares. A análise de regressão foi realizada em programa computacional GENES (CRUZ, 1997).

3- RESULTADOS

Núcleos individuais foram analisados nas 66 lâminas preparadas a partir das 11 amostras de agregados celulares de *C. canephora*. Em média, analisaram-se 143 núcleos por lâmina, totalizando 9.439 (Quadro 1).

Quadro 1 - Números total e médio de núcleos analisados em cada amostra

Amostras (dias)	Número de Núcleos	
	Total	Média/lâmina
0	861,00	143,50
15	827,00	137,83
30	989,00	164,83
45	876,00	146,00
60	919,00	153,17
75	896,00	149,33
90	837,00	139,50
105	765,00	127,50
120	802,00	133,67
135	737,00	122,83
150	930,00	155,00
Total	9.439,00	143,02

Núcleos com um, dois, três, quatro e, em menor número, cinco e seis nucléolos (0,0223% do valor total) foram encontrados, os quais apresentavam tamanho uniforme.

Os resultados foram convertidos em valores percentuais (Quadro 2), para que a análise de regressão pudesse ser aplicada.

Quadro 2 - Porcentagem de núcleos com um, dois, três ou quatro nucléolos (n), observados nas seis lâminas das 11 amostras (subcultivos)

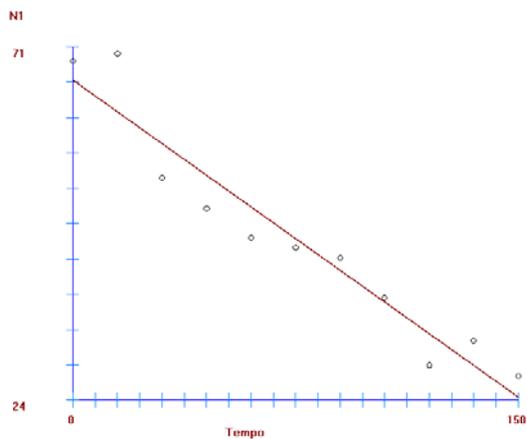
Amostras (dias)	Lâminas	Porcentagem de Núcleos				Total
		1 n	2 n	3 n	4 n	
0	1.1	70,54	28,57	0,89	0,00	100,00
	1.2	66,67	26,28	7,05	0,00	100,00
	1.3	75,76	23,64	0,61	0,00	100,00
	1.4	62,03	37,34	0,63	0,00	100,00
	1.5	68,46	20,13	8,05	3,36	100,00
	1.6	71,07	28,93	0,00	0,00	100,00
15	2.1	70,37	26,67	2,96	0,00	100,00
	2.2	78,68	16,91	1,47	2,94	100,00
	2.3	80,59	17,65	0,59	1,18	100,00
	2.4	70,59	26,89	1,68	0,84	100,00
	2.5	57,78	33,33	5,19	3,70	100,00
	2.6	62,88	30,30	3,79	3,03	100,00
30	3.1	61,86	34,02	0,00	4,12	100,00
	3.2	55,50	24,61	10,47	9,42	100,00
	3.3	52,31	31,28	10,77	5,64	100,00
	3.4	46,94	27,55	14,29	11,22	100,00
	3.5	54,29	28,57	9,29	7,86	100,00
	3.6	50,59	28,82	8,82	11,76	100,00
45	4.1	48,48	27,27	15,15	9,09	100,00
	4.2	57,14	28,57	0,00	14,29	100,00
	4.3	56,91	22,10	14,92	6,08	100,00
	4.4	43,12	38,53	10,09	8,26	100,00
	4.5	48,54	41,75	0,00	9,71	100,00
	4.6	42,70	32,58	11,80	12,92	100,00
60	5.1	42,11	46,05	2,63	9,21	100,00
	5.2	53,55	25,81	8,39	12,26	100,00
	5.3	49,55	42,34	2,70	5,41	100,00
	5.4	44,20	35,36	12,71	7,73	100,00
	5.5	44,20	35,36	12,71	7,73	100,00
	5.6	40,29	35,25	13,67	10,79	100,00
75	6.1	42,86	40,34	5,88	10,92	100,00
	6.2	44,00	38,00	7,33	10,67	100,00
	6.3	48,45	26,71	12,42	12,42	100,00
	6.4	36,42	32,37	19,08	12,14	100,00
	6.5	45,33	30,67	14,00	10,00	100,00
	6.6	48,95	34,97	8,39	7,69	100,00

Continua...

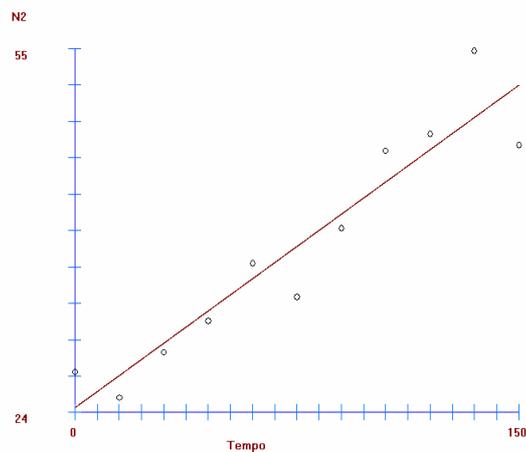
Quadro 2 - Continuação

Amostras (dias)	Lâminas	Porcentagem de Núcleos				Total
		1 n	2 n	3 n	4 n	
90	7.1	48,51	44,55	1,98	4,95	100,00
	7.2	39,87	42,41	10,76	6,96	100,00
	7.3	37,93	40,00	8,28	13,79	100,00
	7.4	45,24	36,51	7,94	10,32	100,00
	7.5	41,61	32,89	14,77	10,74	100,00
	7.6	44,30	41,77	1,90	12,03	100,00
105	8.1	36,08	51,55	8,25	4,12	100,00
	8.2	39,13	52,17	2,61	6,09	100,00
	8.3	35,62	45,21	8,22	10,96	100,00
	8.4	34,27	39,16	9,09	17,48	100,00
	8.5	35,29	47,06	10,08	7,56	100,00
	8.6	45,52	42,76	3,45	8,28	100,00
120	9.1	26,90	60,69	9,66	2,76	100,00
	9.2	27,48	47,33	8,40	16,79	100,00
	9.3	26,61	48,39	5,65	19,35	100,00
	9.4	25,41	49,18	6,56	18,85	100,00
	9.5	27,52	35,78	10,09	26,61	100,00
	9.6	38,01	45,03	5,85	11,11	100,00
135	10.1	31,85	51,11	15,56	1,48	99,29
	10.2	26,83	56,91	11,38	4,88	99,24
	10.3	23,91	71,74	0,00	4,35	100,00
	10.4	35,11	42,75	8,40	13,74	100,00
	10.5	30,34	49,66	4,83	15,17	100,00
	10.6	43,24	56,76	0,00	0,00	100,00
150	11.1	28,29	46,05	13,82	11,84	100,00
	11.2	21,58	48,20	12,23	17,99	100,00
	11.3	29,79	43,09	9,57	17,55	100,00
	11.4	21,88	53,75	13,75	10,63	100,00
	11.5	31,43	38,57	18,57	11,43	100,00
	11.6	30,46	50,99	16,56	1,99	100,00

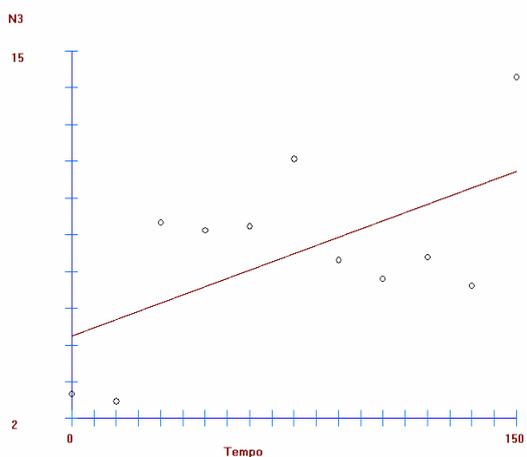
A análise de regressão foi aplicada aos valores percentuais obtidos (Quadro 2), tendo como variável independente o tempo (dias) e dependente, o número de nucléolo (um, dois, três ou quatro). Os resultados indicaram diminuição de núcleos com um nucléolo e aumento de núcleos com dois, três e quatro nucléolos (gráficos 1a – d).



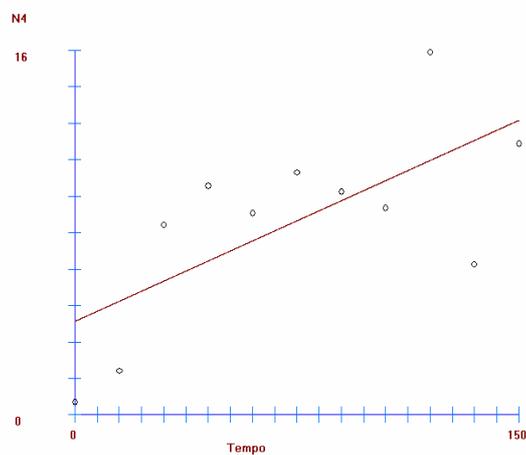
a) $R^2 = 92,23\%$; $Y = 66,5792 - 0,2208X$



b) $R^2 = 88,95\%$; $Y = 24,3994 + 0,1833X$



c) $R^2 = 34,81\%$; $Y = 4,9162 + 0,0388 X$



d) $R^2 = 46,22\%$; $Y = 4,1062 + 0,0588X$

Gráficos 1 (a - d) - Gráficos obtidos da análise de regressão. R^2 (coeficiente de determinação); Y (equação de regressão); N1, N2, N3 e N4 (um, dois, três e quatro nucléolos, respectivamente); e T (tempo, em dias).

4- DISCUSSÃO

A análise de regressão indicou que o tempo das culturas de agregados celulares de *C. canephora* nas condições *in vitro* interfere no número de núcleos com um, dois, três ou quatro nucléolos, existindo uma relação entre essas duas variáveis. A análise de regressão evidenciou que, ao longo dos subcultivos, houve diminuição de núcleos portando um nucléolo (Gráfico 1b) e aumento de núcleos com dois, três e quatro nucléolos (Gráficos 1b - d).

Sybenga (1960) e Pinto-Maglio e Cruz (1987) relataram que os núcleos das células meristemáticas das espécies diplóides do gênero *Coffea* apresentam, normalmente, um nucléolo. Além disso, McClintock (1934), citada por Vilhar et al. (2002), mencionou que o número de regiões organizadoras do nucléolo (RON) ativas indica o número máximo de nucléolos. Devido a esses fatos, *C. canephora*, apresentando nível de ploidia $2x=22$ com um par de cromossomos com RON ativa (CLARINDO et al., 2003), deveria apresentar um ou, no máximo, dois nucléolos.

Tais fatos, associados aos dados encontrados, indicam que o aumento de células com dois, três e quatro nucléolos pode ter sido ocasionado por alterações cromossômicas, euploidias e, ou, aneuploidias (variação somaclonal) que ocorreram nas células constituintes dos agregados celulares.

Assim, como constatado por Vilhar et al. (2002), essa metodologia de monitoramento de ocorrência de variação somaclonal em cultura de tecidos vegetais representa um método rápido de investigação que não requer tecidos que possuem células em divisão, utilização de fluorocromos e equipamentos onerosos.

A incidência de variação somaclonal tem sido associada com longos períodos nas condições *in vitro* (WYMAN et al., 1992; MOYNE et al., 1993; HENRY et al., 1996; BENNICI et al., 2004). Moyne et al. (1993) verificaram, por citometria de fluxo, que suspensões celulares de alfafa mantidas em um longo período de subcultivo (42 dias) apresentaram 15,5% de células poliplóides com conteúdo relativo de DNA equivalente a 16 C, porém suspensões celulares subcultivadas em intervalos de sete dias apresentaram histogramas similares àqueles dos explantes iniciais.

5- CONCLUSÕES

A análise de regressão aplicada aos valores percentuais de núcleos com um, dois, três ou quatro nucléolos evidenciou que há relação entre núcleos com diferentes números de nucléolo e tempo de permanência das suspensões de agregados celulares nas condições *in vitro*.

Os resultados indicaram que o número de nucléolos pode ser utilizado em estudos de variação somaclonal em agregados celulares de *C. canephora*.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNICI, A.; ANZIDEI, M.; VENDRAMIN, G. G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. Regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, 166: 221-227, 2004.
- CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 127 p. (Tese D. S.).
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, 70: 515-519, 1993.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; FONTES, M. A. Bandeamento NOR e coloração com laranja de acridina em cromossomos metafásicos de *Coffea canephora*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).
- CRUZ, C. D. **Programas GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, UFV, 1997. 442 p.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, J. M.; RUFAS, J. S.; ANTONIO, C.; SUJA, J. A.. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. **Chromosoma**, 104: 287-297, 1995.

- GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, 53: 37-50, 1975.
- HENRY, Y.; MARCOTTE, J. L.; BUYSER, J. The effect of aneuploidy on karyotype abnormalities in wheat plants regenerated from short- and long-term somatic embryogenesis. **Plant Science**, 114: 101-109, 1996.
- MOSGOELLER, W.; JORDAN, E. G.; HERNANDEZ-VERDUN, D. News and views on the nucleolus in 1996. Report on the '*Colloquium on the nucleolus*', a meeting at Paris-Grignon, July 18-20, 1996. **Biol Cell**, 88: 1-4, 1996.
- MOYNE, A. L.; SOUQ, F.; YEAN, L. H.; BROWN, S. C.; BOULAY, M.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Relationship between cell ploidy and regeneration capacity of long term *Rosa hybrida* cultures. **Plant Science**, 93: 159-168, 1993.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. da. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. **Caryologia**, 40: 7-23, 1987.
- SHAW, P. J.; ABRANCHES, R.; SANTOS, A. P.; BEVEN, A. F.; STOGER, E.; WEGEL, E.; GONZALEZ-MELENDI, A. The architecture of interphase chromosomes and nucleolar transcription sites in plants. **Journal of Structural Biology**, 140: 31-38, 2003.
- SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron**, 31: 121-126, 2000.
- SUMNER, A.T. **Chromosomes organization and function**. [S. I.]: BlackWell Publishing, 2003, 287 p.
- SYBENGA, J. Genética y citología del café. Una revisión de literatura. **Turrialba**, 10: 82-137, 1960.

VILHAR, B.; VIDIC, T.; JOGAN, N.; DERMASTIA, M. Genome size and the nucleolar number as estimators of ploidy level in *Dactylis glomerata* in the Slovenian Alps. **Plant Systematics and Evolution**, 234: 1-13, 2002.

WYMAN, J.; BRASSARD, N.; FLIPO, D.; LALIBERTE, S. Ploidy level stability of callus tissue, axillary and adventitious shoots of *Larix X eurolepis* Henry regenerated in vitro. **Plant Science**, 85: 189-196, 1992.

UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO MONITORAMENTO DE SUSPENSÕES DE AGREGADOS CELULARES DE *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho

A citometria de fluxo é uma ferramenta caracterizada por ser um método rápido e eficiente utilizado em análises de heterogeneidades em populações celulares. Essa aplicação é particularmente importante, pois a queda do desenvolvimento e diferenciação das células cultivadas *in vitro* pode ser afetada por alterações no genoma. O presente estudo teve como objetivos: (i) estabelecer um método para isolamento e coloração de núcleos de agregados celulares fixados de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho; e (ii) verificar se a citometria de fluxo pode ser empregada para monitorar a ocorrência de variação somaclonal em suspensões de agregados celulares de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho. Amostras de calos embriogênicos friáveis e de agregados celulares de *C. arabica* foram coletadas e fixadas em solução gelada de etanol (95%):ácido acético (3:1), que foi substituída por etanol 70%. Cinco calos, ou agregados celulares, apresentando tamanho uniforme foram lavados em tubos com água destilada e tampão de extração de núcleos OTTO I. Aos tubos foi adicionada solução enzimática, os quais permaneceram por 30 minutos sob agitação. Os calos e agregados digeridos foram lavados em tampão OTTO I e triturados por 15 segundos em homogeneizador Turrax. Os núcleos foram corados por 15 minutos no escuro e, em seguida, transferidos para tubos apropriados à citometria de fluxo. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Partec PAS II/III. As posições dos picos e os coeficientes de variação (CV) foram calculados usando o programa FlowMax Partec.

Foram analisados não menos que 10 mil núcleos de cada teste. Os procedimentos de isolamento e coloração, adaptados no presente estudo, permitiram o estabelecimento de suspensões de núcleos isolados, intactos e corados. Os CVs, abaixo de 3%, obtidos indicaram que a etapa de processamento das suspensões nucleares foi adequada. Foram identificados, nos histogramas, núcleos de células com nível de ploidia equivalente a 4x, 7x e núcleos de células apresentando alterações cromossômicas numéricas. Além disso, em alguns tratamentos foram evidenciados núcleos com elevada atividade de síntese. Os resultados indicaram que a citometria de fluxo é uma ferramenta que pode ser empregada em estudos de variação somaclonal e de ciclo celular.

Palavras-chave: citometria de fluxo, variação somaclonal, *C. arabica*.

1- INTRODUÇÃO

A citometria de fluxo é uma ferramenta que analisa parâmetros ópticos de partículas coradas em suspensão com o auxílio do citômetro de fluxo (DOLEZEL, 1997) e é caracterizada por ser um método rápido e seguro (GALBRAITH et al., 1983).

Além de ser um método eficiente na estimação do conteúdo de DNA em plantas (HELLER, 1973, citado por DOLEZEL, 1997), a citometria de fluxo também tem sido utilizada para analisar heterogeneidades em populações celulares, sendo empregada na identificação de células com diferentes níveis de ploidia. Essa aplicação é particularmente importante, pois alterações no nível de ploidia (euploidias) podem refletir em mudanças no desenvolvimento e diferenciação das células cultivadas *in vitro* (YANPAISAN et al., 1999). Além de euploidias, a citometria de fluxo, segundo Brutovska et al. (1998), é um método útil na detecção de aneuploidias.

O presente estudo teve como objetivos: (i) estabelecer um método adequado para isolamento de núcleos de agregados celulares fixados de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho; e (ii) verificar se a citometria de fluxo pode ser utilizada para monitorar a ocorrência de variação somaclonal em suspensões de agregados celulares de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Material

As suspensões de agregados celulares de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho foram cedidas pelo Dr. Antônio Teixeira Cordeiro, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e pelos técnicos da Embrapa Marcelo Antonioli Fontes e Ana Cláudia F. Cruz, do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BIOCAFÉ) da UFV. As análises citométricas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal da UFV.

2.2- Métodos

2.2.1- Obtenção, manutenção e repicagem das suspensões de agregados celulares de *C. arabica*

O item 2.2.1 foi efetuado como descrito no item 2.2.1, do capítulo 1.

2.2.2- Coleta do material

Calos embriogênicos friáveis de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho foram coletados antes de serem colocados em meio líquido (tempo 0), e os agregados celulares foram no dia do subcultivo, que ocorreu em intervalos de 15 dias até o 240^o dia (16^o subcultivo), totalizando 17 amostras.

Os agregados de *C. arabica* foram lavados em água destilada e fixados com solução gelada de etanol (95%):ácido acético (3:1). O fixador foi trocado três vezes e os agregados, armazenados a -20 °C por 24 horas. A solução fixadora foi substituída por etanol 70%, sendo este fixador trocado por três vezes e os agregados, armazenados (modificado de NEUMANN et al., 1998; OTTO, 2000; ZORINIANTS et al., 2003).

2.2.3- Citometria de fluxo em agregados celulares

2.2.3.1- Extração dos núcleos e coloração com DAPI

Cinco calos ou agregados celulares fixados em etanol 70%, apresentando tamanho uniforme, foram transferidos para tubos de vidro de 5 mL. Foi realizada uma lavagem em água destilada e em seguida, três lavagens, de sete minutos cada, em tampão de extração de núcleos OTTO I com o dobro da concentração de ácido cítrico (ácido cítrico 0,2 M; 0,5 g/100 mL de Tween 20; ditiotreitól 2 mM), segundo sugestão de Otto (2000) para material fixado.

Aos tubos foi adicionado 1 mL de solução enzimática (hemicelulase 1%, celulase 1,5% e pectinase 0,01%), permanecendo por 30 minutos sob agitação orbital de 110 rpm (modificado de CLARINDO et al., 2002).

Os calos e agregados digeridos foram lavados duas vezes em tampão OTTO I, sendo a segunda lavagem feita sob agitação de 110 rpm, por 20 minutos. As preparações foram trituradas por 15 segundos em homogeneizador Turrax (9.500 rpm) e deixadas em repouso por dois minutos, para ação do detergente do tampão. O material foi, então, transferido para tubos de microcentrífuga Eppendorf, passando por filtro de 30 µm, e o volume, completado para 1,5 mL com tampão OTTO I.

Os tubos foram centrifugados por três minutos, a 1.100 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet, ressuspendido em 1,5 mL de tampão de coloração OTTO II (7,1 g de Na₂HPO₄.H₂O; 0,2 mg DAPI). Os núcleos foram corados por 15 minutos, no escuro, e em seguida transferidos, passando por filtro de 20 µm, para tubos apropriados à citometria de fluxo (OTTO, 2000).

Realizaram-se dois processamentos, I e II, para que os resultados pudessem ser comparados.

Para confirmar a eficiência do isolamento dos núcleos, lâminas foram preparadas com amostras do material corado e observadas ao microscópio OlympusTM, modelo BX60, com objetiva de 40X.

2.2.3.2- Processamento no citômetro de fluxo

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Partec PAS II/III (PARTEC GmbH, Munster, Germany), equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO)- 100 W, Laser RG 610, e filtros KG-1, BG-38 e UG-1. As posições dos picos e os coeficientes de variação (CV) foram calculados, usando-se o programa FlowMax Partec. Analisaram-se não menos que 10 mil núcleos de cada teste.

3- RESULTADOS

Os procedimentos de extração e coloração com DAPI resultaram em núcleos intactos, isolados e corados, de agregados celulares fixados de *C. arabica*. As suspensões nucleares foram processadas no citômetro de fluxo, e, com base nos canais dos picos nos histogramas, determinaram-se núcleos em G1, G1', G2 e G2' (Quadros 1 e 2), nos dois processamentos.

Os termos G1 e G2 referem-se aos núcleos de *C. arabica* com nível de ploidia 4x, e G1' e G2' indicam núcleos com nível de ploidia desconhecido. Os picos indicados por G1' apresentaram valores de canais entre G1 e G2 (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 - Valores das leituras dos canais referentes aos picos G1, G1', G2 e G2' obtidos nos histogramas gerados no processamento I das suspensões nucleares de *C. arabica*

Amostras (dias)	Níveis de Ploidia					
	4x			Nível de Ploidia Desconhecido		
	G1	S	G2	G1'	S	G2'
0	Desconsiderado			Desconsiderado		
15	66	n.i.	132	n.i.	n.i.	n.i.
30	71	n.i.	140	n.i.	n.i.	n.i.
45	67	n.i.	134	n.i.	n.i.	n.i.
60	73	n.i.	146	126	n.i.	252
75	73	n.i.	146	128	n.i.	256
90	75	S	149	126	n.i.	253
105	74	S	147	129	n.i.	258
120	79	n.i.	159	130	n.i.	261
135	75	n.i.	148	128	n.i.	257
150	72	n.i.	144	125	n.i.	250
165	72	n.i.	143	126	n.i.	252
180	70	S	140	120	n.i.	n.i.
195	61	n.i.	123	n.i.	n.i.	n.i.
210	n.i.	S	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
225	56	n.i.	112	n.i.	n.i.	n.i.
240	62	S	124	n.i.	n.i.	n.i.

n.i. = fase não identificada e S = região do histograma referente à atividade de síntese.

Quadro 2 - Valores das leituras dos canais referentes aos picos G1, G1', G2 e G2' obtidos nos histogramas gerados no processamento II das suspensões nucleares de *C. arabica*

Amostras (dias)	Níveis de Ploidia					
	4x			Nível de Ploidia Desconhecido		
	G1	S	G2	G1'	S	G2'
0	desconsiderado			desconsiderado		
15	68	n.i.	135	n.i.	n.i.	n.i.
30	63	n.i.	126	n.i.	n.i.	n.i.
45	62	n.i.	124	n.i.	n.i.	n.i.
60	72	n.i.	144	118	n.i.	252
75	80	n.i.	160	127	n.i.	256
90	73	S	149	124	n.i.	248
105	77	S	154	127	n.i.	253
120	74	n.i.	146	127	n.i.	254
135	75	n.i.	150	126	n.i.	252
150	67	n.i.	140	120	n.i.	240
165	75	n.i.	150	126	n.i.	252
180	71	S	142	140	n.i.	n.i.
195	61	n.i.	123	n.i.	n.i.	n.i.
210	n.i.	S	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
225	53	n.i.	109	n.i.	n.i.	n.i.
240	60	S	119	n.i.	n.i.	n.i.

n.i. = fase não identificada e S = região do histograma referente à atividade de síntese.

Os histogramas de cada amostra apresentaram o mesmo perfil nos dois processamentos. Em virtude disso, foi apresentado um histograma de cada amostra (Figura 1 a – p). Além disso, em ambos os processamentos os histogramas referentes à primeira amostra, calos embriogênicos friáveis (tempo 0), foram desconsiderados (Quadros 1 e 2).

Os histogramas a, b, c, m e o (Figura 1) apresentaram um pico relativamente maior, evidenciando os núcleos em G1 com conteúdo de DNA relativo 4 C, um pico menor retratando o número de núcleos em G2 (8 C) e pequenos e numerosos picos evidenciados após o pico G2 formados por núcleos apresentando alterações cromossômicas numéricas.

Nos histogramas d, e, f, g, h, i, j, k, l e n (Figura 1), além do pico G1 foram identificados picos G1' gerados por núcleos com conteúdos de DNA desconhecido. Além do pico G1', nos histogramas d, e, f, g, h, j, k e l (Figura 1) evidenciaram-se picos G2'. As células dos tratamentos referentes aos histogramas f, g, k, l, n e p

(Figura 1) apresentaram um número elevado de núcleos em atividade de síntese (período S da interfase).

A partir dos valores dos canais, referentes aos núcleos em dado período do ciclo celular, obtidos nos histogramas (Quadros 1 e 2), foi calculado o nível de ploidia dos núcleos indicados por G1' para cada processamento (Quadros 3 e 4). Os resultados, descritos nos Quadros 3 e 4, simularam que, em ambos os processamentos, os picos G1' representam núcleos de células heptaplóides.

Quadro 3 - Determinação do possível nível de ploidia dos núcleos G1' do processamento I com base na razão entre o somatório dos canais G1'/4x e dos valores esperados dos níveis de ploidia 5x (1,25), 6x (1,5), 7x (1,75) e 8x (2)

Nível de Ploidia das Células	Valor do Canal Obtido por Citometria de Fluxo
4x	71,00
G1'	126,44
G1'/4x	1,78

Quadro 4 - Determinação do possível nível de ploidia dos núcleos G1' do processamento II com base na razão entre o somatório dos canais G1'/4x e dos valores esperados dos níveis de ploidia 5x (1,25), 6x (1,5), 7x (1,75) e 8x (2)

Nível de Ploidia das Células	Valor do Canal Obtido por Citometria de Fluxo
4x	73,78
G1'	126,11
G1'/4x	1,71

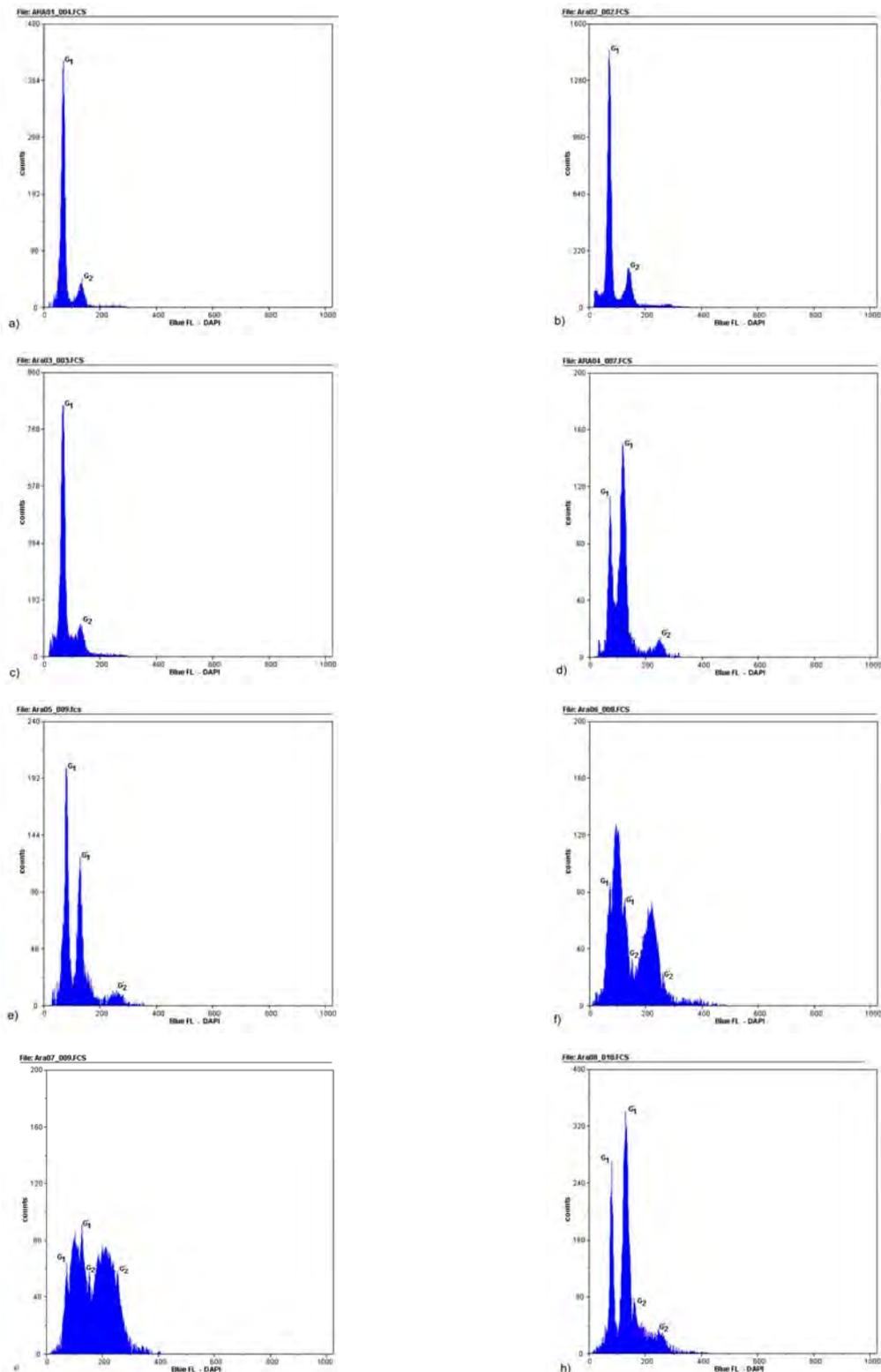


Figura 1 - Histogramas obtidos de suspensões nucleares de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho referentes às amostras: a) 15; b) 30; c) 45; d) 60; e) 75; f) 90; g) 105; e h) 120 dias de subcultivo. Observar os picos após os picos G2 ou G2' referentes a núcleos de células aneuplóides e número elevado de núcleos no período S da interfase, nos histogramas f e g. Continua...

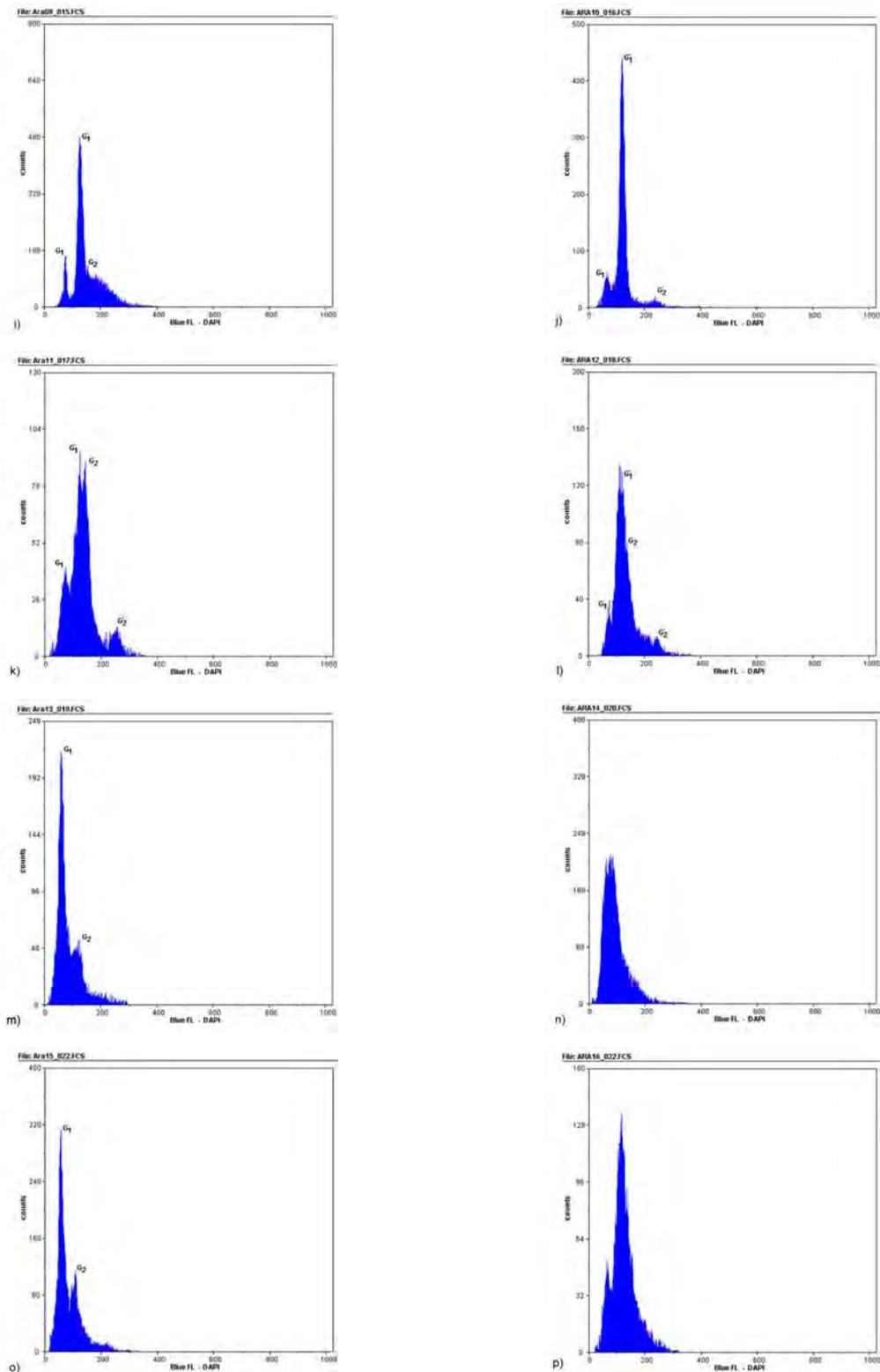


Figura 1 (Continuação) - Histogramas obtidos de suspensões nucleares de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho referentes às amostras: i) 135; j) 150; k) 165; l) 180; m) 195; n) 210; o) 225; e p) 240 dias de subcultivo. Observar os picos após os picos G2 ou G2' referentes a núcleos de células aneuplóides e número elevado de núcleos no período S da interfase, nos histogramas k, l, n e p.

4- DISCUSSÃO

O protocolo de isolamento de núcleos desenvolvido no presente estudo, envolvendo a etapa de maceração enzimática, a utilização de tampão OTTO I com o dobro da concentração de ácido cítrico, a homogeneização em Turrax e os tempos estabelecidos, possibilitou a obtenção de suspensões de núcleos intactos e isolados de agregados celulares fixados de *C. arabica*. Segundo Yanpaisan et al. (1999), análises por citometria de fluxo dependem do fato de as amostras estarem na forma de partículas isoladas, em suspensão líquida, pois a interpretação das informações geradas parte da suposição de que cada partícula analisada pelo equipamento consiste em uma única célula.

Como as amostras de calos e agregados celulares foram coletadas separadamente, em dias distintos e processadas simultaneamente, a etapa de fixação, modificada de Neumann et al. (1998), Otto (2000) e Zorinians et al. (2003), foi fundamental, pois possibilitou a preservação do material armazenado. Leitch et al. (1994) relataram que as soluções fixadoras evitam a perda de fragmentos de DNA e proteínas, por provocarem a precipitação de nucleases e proteases.

O fluorocromo DAPI, utilizado neste estudo para corar as suspensões de núcleos, e as metodologias adotadas na etapa de isolamento de núcleos permitiram a plotagem de histogramas das 16 amostras (Figura 1) e baixos coeficientes de variação, menores que 3%. Segundo Yanpaisan et al. (1999), a produção de partículas isoladas e coradas é um passo essencial no desenvolvimento e aplicação da citometria de fluxo em células de plantas.

Nos dois processamentos, as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento de isolamento e coloração de núcleos. Segundo Dolezel (1997) e Motley et al. (2000), o processamento das amostras deve ser em conjunto, para que todas sejam igualmente afetadas pelas perturbações que ocorrem durante o isolamento e coloração dos núcleos.

Os canais referentes aos picos apresentados nos histogramas (Quadro 1 e 2) diferiram entre os processamentos I e II. A variação no número dos canais das posições dos picos pode ser atribuída a flutuações instrumentais entre as análises, isto é, na intensidade de excitação da lâmpada e no fluxo da amostra (BINO et al., 1993).

Nas amostras de 90, 105, 165, 180, 210 e 240 dias (Figura 1 f, g, k, l, n e p), nota-se um número elevado de células na fase de síntese, o que dificultou e, na Figura 1 n e p, impossibilitou a determinação da posição dos picos. O pico largo indica diminuição na resolução dos picos localizados em canais próximos (YANPAISAN et al., 1999).

Os histogramas da amostra 0, composta por calos embriogênicos friáveis, foram descartados. Os calos embriogênicos friáveis apresentam tamanho e número de células superiores em comparação com os agregados celulares (ZORINIANTS et al., 2003). Em virtude desse fato, as metodologias de extração, isolamento e coloração não foram eficientes no caso dos calos.

Nos histogramas das Figura 1 d, e, f, g, h, i, j, k e l foram observados picos G1, referentes a núcleos 4x e G1', relativos a núcleos 7x (Quadros 3 e 4). De acordo com Yanpaisan et al. (1999), a endomitose pode ocorrer em cultura de células vegetais, sendo a citometria de fluxo útil para analisar heterogeneidades entre populações celulares, por produzir histogramas com múltiplos picos.

5- CONCLUSÕES

O protocolo adaptado de extração e coloração de agregados celulares fixados para citometria de fluxo possibilitou análises com coeficientes de variação inferiores a 3% e gerou histogramas, que evidenciaram a ocorrência de células com alterações cromossômicas numéricas e em diferentes estágios do ciclo celular.

Os resultados indicaram que a citometria de fluxo associada à metodologia desenvolvida nesse estudo podem ser utilizadas no monitoramento de ocorrência de variação somaclonal em culturas de suspensões de agregados celulares de maneira rápida e satisfatória.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BINO, R. J.; LANTERI, S.; VERHOEVEN, H. A.; KRAAK, H. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. **Annals of Botany**, 72: 181-187, 1993.
- BRUTOVSKA, R.; CELLAROVA, E.; DOLEZEL, J. Cytogenetic variability of in vitro regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. **Plant Science**, 133: 221-229, 1998.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; GASPERAZZO, T. A.; FONTES, M. A. Morfometria dos cromossomos de *Coffea arabica* L. var. Catuaí Vermelho. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** (CD-ROM).
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, 38: 285-302, 1997.
- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, J. M.; SHARMA, P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. **Science**, 220: 1049-1051, 1983.
- LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I. J. **In situ hibridization: a practical guide**. Oxford: BIOS Scientific, 1994. 118 p.

MOTLEY, J.; YOKOYA, K.; ROBERTS, A. V. “ D- Flowering” – The Flow Cytometry of Plant DNA. In: DIAMOND, R.A.; DEMAGGIO, S. (Eds). **In living color - Protocols in flow cytometry and cell sorting**. [S. l.]: Springer Lab. Manual, 2000. p. 391-420

NEUMANN, P.; LYSÁK, M.; DOLEZEL, J.; MACAS, J. Isolation of chromosomes from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. **Plant Science**, 137: 205-215, 1998.

OTTO, F. J. Preparation and staining of fixed cells for high –resolution DNA analysis. In: RADBRUCH, A. (Ed.). **Flow cytometry and cell sorting**. 2. ed. Berlin: Springer-Lab Manual, 2000, 355 p.

YANPAISAN, W.; KING, N. J. C.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, 17: 3-27, 1999.

ZORINIANTS, S. E.; NOSOV, A. V.; MONFORTE-GONZALEZ, M.; MENDES-ZEEL, M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry. **Plant Science**, 164: 141-146, 2003.