

BÁRBARA PEREIRA DANTAS FONTES

CITOGENÉTICA, CITOMETRIA DE FLUXO E CITOMETRIA DE
IMAGEM EM *Coffea* spp.

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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2003

Aos meus pais Benigno José Dantas Fontes e Maria de Lourdes Pereira Dantas Fontes, exemplos de perseverança, de simplicidade e de amor ao próximo.

Ao meu marido Wellington, fonte de companheirismo, incentivo, desprendimento e amor incondicional.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao CBP&D- Café, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação.

Aos conselheiros Ney Sussumo Sakiyama e Wagner Campos Otoni, pelo apoio e pelas contribuições.

Ao pesquisador da EPAMIG Dr. Antonio Alves Pereira, pela amizade, pela atenção e pelas consideráveis sugestões.

Aos professores deste Programa de Pós-Graduação, pelos ensinamentos.

Aos integrantes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em especial a Conceição, Rita, Paulo Sávio e Cláudio, pela amizade, atenção e disponibilidade no decorrer do Curso.

Aos meus colegas de curso e de laboratório, pelo convívio e pela descontração.

Aos funcionários Zé Chico, Geraldo, Delfim, José Carlos e Americano, pela amizade e pelo apoio em trabalhos de laboratório e de campo.

Aos meus amigos Kiliana, Lilia, Rose, Daniel, Alberto, Arlindo, Terezinha e Giovana, pelo convívio e pela demonstração de carinho e amizade.

Aos meus pais Maria de Lourdes e Benigno, pelas lições de vida.

À minha sogra e aos meus avós e parentes, pelas incessantes orações.

Aos meus irmãos Bammera, Eduardo e Emerson, pelo carinho e por serem a minha família.

Ao meu marido Wellington Soares, pelo amor.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o êxito desta pesquisa.

BIOGRAFIA

BÁRBARA PEREIRA DANTAS FONTES, filha de Benigno José Dantas Fontes e Maria de Lourdes Pereira Dantas Fontes, nasceu em Salvador, Bahia, no dia 16 de maio de 1970.

Concluiu o segundo grau no Instituto Educacional Águia, em Salvador, BA. Em 1990, ingressou na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, graduando-se Engenheira-Agrônoma em 1995.

Durante o período de graduação, foi bolsista do CNPq, desenvolvendo atividades de pesquisa.

Em 1996, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, concluindo-o em 1998. Em 1999, ingressou no Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em maio de 2003.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Classificação botânica e distribuição geográfica do cafeeiro.....	4
2.2. Origem do genoma de <i>Coffea arabica</i>	6
2.3. Híbridos interespecíficos.....	10
2.4. Aspectos citogenéticos do gênero <i>Coffea</i>	12
2.4.1. Mitose.....	12
2.4.2. Meiose	12
2.4.2.1. Microsporogênese.....	12
2.4.2.2. Macrosporogênese.....	14
2.4.3. Número de cromossomos	14
2.4.4. Morfologia dos cromossomos	18
2.5. Citometria de fluxo em plantas.....	22
2.5.1. Preparação da amostra.....	22
2.5.2. Estimativa do tamanho do genoma nuclear.....	23

	Página
2.5.3. Variação intraespecífica	24
2.5.4. Variação interespecífica	25
2.5.5. Significado da variação intra e interespecífica.....	26
2.6. Citometria de imagem em plantas	28
2.7. Comparação do conteúdo de DNA obtido por densitometria e citometria de fluxo.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CITOGENÉTICA EM <i>Coffea arabica</i>, <i>Coffea canephora</i> e <i>Coffea</i> <i>eugenioides</i>.....	42
RESUMO	42
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1. Material genético	46
2.2. Obtenção de raízes.....	46
2.2.1. Germinação de sementes	46
2.2.2. Hidroponia.....	47
2.3. Desenvolvimento de metodologia citogenética para <i>Coffea</i>	48
2.3.1. Pré-tratamento com antimetabólitos.....	48
2.3.2. Digestão enzimática.....	48
2.3.3. Dissociação celular, secagem ao ar e coloração	51
2.4. Análise do cariótipo.....	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 Desenvolvimento de metodologia citogenética para <i>Coffea</i>	53
3.1.1. Pré-tratamento com antimetabólito	53
3.1.2. Digestão enzimática, dissociação celular, secagem ao ar e coloração	55
3.2. Análise do cariótipo.....	56
4. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

	Página
CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR POR CITOMETRIA DE FLUXO EM ESPÉCIES E HÍBRIDOS DE <i>Coffea spp.</i>	75
RESUMO	75
1.INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1. Material genético	80
2.2. Preparação nuclear.....	82
2.2.1. Extração dos núcleos	82
2.2.2. Purificação dos núcleos	82
2.2.3. Coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole).....	82
2.3. Processamento no citômetro de fluxo.....	83
2.4. Amostra padrão	83
2.4.1. Padrão interno.....	83
2.4.2. Padrão externo	84
2.5. Estimativa do conteúdo de DNA nuclear	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1. Variação do conteúdo de DNA intraespecífico	93
3.2. Variação do conteúdo de DNA interespecífico	96
3.3. Investigação de híbridos	100
4. CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR EM <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i> POR CITOMETRIA DE IMAGEM	112
RESUMO	112
1.INTRODUÇÃO.....	114
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	116
2.1. Material genético	116
2.2. Germinação das sementes.....	116
2.3. Fixação	117
2.4. Hidrólise e coloração com Feulgen	117

	Página
2.5. Esmagamento	117
2.6. Citometria de imagem	118
2.7. Equipamento.....	118
2.8. Controle de qualidade dos dados.....	118
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
4. CONCLUSÕES.....	126
CONCLUSÕES GERAL.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

RESUMO

FONTES, Bárbara Pereira Dantas, D. S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2003. **Citogenética, citometria de fluxo e citometria de imagem em *Coffea* spp.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Conselheiros: Ney Sussumu Sakiyama e Wagner Campos Otoni.

Com o objetivo de obter cromossomos morfológicamente adequados para serem caracterizados citogeneticamente e identificados para montagem do kariograma de *C. canephora* ($2n=2x=22$), *C. arabica* ($2n=4x=44$) e *C. eugenioides* ($2n=2x=22$), empregaram-se novas técnicas citogenéticas associadas às metodologias computacionais de análise de imagens. As metodologias utilizadas possibilitaram a obtenção do kariograma das três espécies com cromossomos definidos e resolução adequada para caracterização de cada par de homólogos, aparentemente semelhantes quando obtidos por meio de técnicas convencionais. A análise citogenética revelou que *C. canephora* possui um par de cromossomos metacêntricos (m) e 10 pares submetacêntricos (sm). Foi observada a presença de satélites no braço curto do cromossomo 6, e o comprimento absoluto de seus cromossomos variou de 1,58 a 3,30 μm . A citometria de fluxo foi usada para estimar a quantidade de DNA (valor 2C), na fase G0/G1, em *Coffea*. Foram analisadas amostras das espécies de *C. canephora*

(2x), *C. eugenoides* (2x), *C. racemosa* (2x) e *C. arabica* (4x); do Híbrido de Timor, híbrido natural triplóide entre *C. arabica* e *C. canephora* (4x); dos supostos híbridos interespecíficos naturais entre *C. racemosa* e *C. arabica*, denominados UFV 557; e de plantas resultantes do retrocruzamento entre *C. arabica* e UFV 557. A diferença na quantidade do conteúdo de DNA entre espécies diplóides foi de até 0,50 pg = 45% (*Coffea racemosa* 1,11 pg; *Coffea eugenoides* 1,40 pg e *Coffea canephora* cv. 'Robusta' 1,61 pg). Considerando-se os valores intraespecíficos (*Coffea canephora* 1,43 a 1,61 pg e *Coffea arabica* 2,40 a 3,04 pg), estas diferenças foram de 0,18 pg (12,59%) e 0,64 pg (26,67%), respectivamente. A citometria de fluxo também revelou-se uma ferramenta importante no monitoramento e identificação de híbridos interespecíficos de *Coffea*. A citometria de imagem foi empregada para determinação do índice de densidade óptica de preparações de pontas de raízes esmagadas e coradas com reação de Feulgen. O método prófase/telófase (mensuramento de 10 núcleos em prófase e 10 em telófase por lâmina) foi empregado nesta pesquisa. Assim, valores 4C e 2C, referentes aos núcleos em prófase e telófase, foram estimados, e as razões entre os genomas de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho (2n=44) e *Coffea canephora* cv. Conillon (2n=22) e entre *Coffea arabica* cv. Mundo Novo e cv. Catuaí Vermelho puderam ser estabelecidas. As estimativas do índice entre as cultivares obtidas pelo método de citometria de imagem foram comparadas com valores obtidos previamente usando a citometria de fluxo e apresentaram diferenças inferiores a 2,27%.

ABSTRACT

FONTES, Bárbara Pereira Dantas, D. S., Universidade Federal de Viçosa, May 2003. **Cytogenetics, flow cytometry and image cytometry in *Coffea* spp.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Committee Members: Ney Sussumu Sakiyama and Wagner Campos Otoni.

New cytogenetic techniques together with methods of computer image analyses were utilized to set up the karyogram of *C. canephora* ($2n=2x=22$), *C. arabica* ($2n=4x=44$), and *C. eugenioides* ($2n=2x=22$). Thereby, morphologically appropriate chromosomes were obtained for cytogenetic characterization and identification. These methodologies brought forth a karyogram of the three species with defined chromosomes and a suitable resolution for the characterization of each homologous pair, which, when obtained by conventional techniques, are apparently similar. The cytogenetic analysis indicated that *C. canephora* owns one metacentric (m) and 10 submetacentric chromosome pairs (sm). Satellites were localized on the short arm of chromosome 6, while the absolute chromosomes length varied between 1,58 and 3,30 μm . Flux cytometry was used to estimate the quantity of the DNA (value 2C) in the G₀/G₁ phase, for *Coffea*. Samples of the following species were analyzed: *C. canephora* (2x), *C.*

eugenioides (2x), *C. racemosa* (2x), and *C. arabica* (4x); the Timor Hybrid, natural triploid hybrid of *C. arabica* and *C. canephora* (4x); the suspected interspecific natural hybrids of *C. racemosa* and *C. arabica*, designated UFV 557; and the backcrosses of *C. arabica* and UFV 557. The difference in the content quantity of the DNA among the diploid species reached 0,50 pg = 45% (*Coffea racemosa* 1,11 pg, *Coffea eugenioides* 1,40 pg, and *Coffea canephora* cv. 'Robusta' 1,61 pg). These differences were 0,18 pg (12,59%) and 0,64 pg (26,67%), respectively, in the intra-species values (*Coffea canephora* 1,43 to 1,61pg and *Coffea arabica* 2,40 to 3,04 pg). Flux cytometry proved to be of great usefulness to monitor and identify the interspecific hybrids of *Coffea*. Picture cytometry was employed in the determination of the optical density index in slide preparations of root tips pressed and dyed by the Feulgen reaction. The prophase/telophase method (measurement of 10 nuclei in prophase and 10 in telophase per slide) was used in this study. The values 4C and 2C of the nuclei in prophase and telophase were estimated, and the genome ratios of *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho (2n=44) and *Coffea canephora* cv. Conillon (2n=22), as well as of *Coffea arabica* cv. Mundo Novo and cv. Catuaí Vermelho could be established. In a comparison between the estimate indices of the cultivars obtained by the picture cytometry method and the values established previously by flux cytometry, the differences lay below 2,27%.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de café concentra-se em duas espécies: *Coffea arabica* L. (café arábica), espécie alotetraplóide e autocompatível; e *Coffea canephora* Pierre et Froenher (café robusta), diplóide e auto-incompatível (CHARRIER e BERTHAUD, 1985; CARVALHO, 1988; CARVALHO et al., 1991).

Muitas espécies de *Coffea* têm sido objeto de estudos citogenéticos, os quais contribuem para o entendimento dos mecanismos evolutivos e fornecem subsídios para programas de melhoramento genético. Entretanto, as técnicas citogenéticas convencionais empregadas (MENDES, 1938; Bouharmont, 1959, citado por SYBENGA, 1960; BOUHARMONT, 1963; PIEROZZI et al., 1999) e a falta de metodologias adequadas para a preparação de lâminas com metáfases morfológicamente preservadas têm sido obstáculos que dificultam a caracterização cromossômica das espécies de café, o que resulta em preparações cromossômicas com poucas possibilidades de identificação dos pares homólogos. A similaridade morfológica, o tamanho relativamente pequeno dos cromossomos e os baixos índices metafásicos obtidos em meristemas radiculares também têm dificultado a caracterização citogenética mais adequada dos cromossomos de café.

Novas técnicas citogenéticas, desenvolvidas para estudo do genoma de plantas, associadas a metodologias computacionais de análise de imagem (CARVALHO, 1995), têm possibilitado resolver, com maior definição, pequenas diferenças morfológicas entre cromossomos, aparentemente semelhantes, de muitas plantas, principalmente daquelas com cariótipos homomórficos.

O valor C de DNA tem um significado biológico fundamental, e o conhecimento da quantidade de DNA nuclear de um grupo de organismos pode ser útil em vários campos da genética. A densitometria com base na reação de Feulgen DNA específico fornece, por meio de um citofotômetro, uma proporcionalidade entre a quantidade de DNA existente e a quantidade de corante que o núcleo incorporou. Com o advento da citometria de imagem, o citofotômetro utilizado em densitometria passou a ser substituído por um sistema de análise que capta imagens do microscópio, via vídeo ou câmera digital. Esses dados são calculados a partir da densidade óptica de valores cinzas de pixels dos núcleos corados (VILHAR e DERMASTIA, 2002). A citometria de fluxo envolve a análise das densidades ópticas de partículas em fluxo. Em plantas, basicamente consiste no isolamento dos núcleos, na coloração destes com um fluorocromo DNA específico e na leitura da intensidade de fluorescência emitida. As grandes vantagens dessa técnica, em relação à densitometria, são a relativa facilidade e rapidez da preparação das amostras, o grande número de núcleos que podem ser analisados, o uso de pequena quantidade de tecidos e a possibilidade de detecção de pequenas diferenças na quantidade de DNA.

Determinações de conteúdos de DNA, por diferentes autores, evidenciam a ocorrência de variabilidade intra-específica (BENNETT, 1985) e interespecífica no tamanho do genoma de plantas (CROS et al., 1994, 1995; BUITENDIJK et al., 1997; THIBAUT, 1998; VOGLMAYR, 2000). Cruzamentos intra-específicos e interespecíficos são freqüentemente realizados em melhoramento de plantas, e a citometria de fluxo tem sido empregada, com sucesso, no estudo dessas hibridações (KELLER et al., 1996; BUITENDIJK et al., 1997; BARRE et al., 1998; THIBAUT, 1998).

Assim, este trabalho objetivou desenvolver técnicas citogenéticas para a obtenção de preparações com cromossomos morfológicamente mais definidos em células mitóticas de *Coffea arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* para caracterizar, com melhor resolução, o cariótipo dessas espécies; empregar a citometria de fluxo para determinar o conteúdo de DNA nuclear de espécies e variedades de café; investigar híbridos e supostos híbridos interespecíficos pertencentes ao banco de germoplasma UFV/EPAMIG; introduzir a citometria de imagem na estimação da quantidade de DNA nuclear em espécies de *Coffea* (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*); e comparar tais resultados com valores obtidos previamente por citometria de fluxo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação botânica e distribuição geográfica do cafeeiro

A primeira classificação botânica da planta foi feita em 1591, e o cafeeiro foi considerado como pertencente ao gênero *Euonymos* (Celastraceae). Mais tarde foi classificado como *Zanthoxylum* (Rutaceae) e, posteriormente, como *Jasminum* (Oleaceae), conforme TAUNAY (1945), sendo em 1753 classificado por Linnaeus como *Coffea* (Rubiaceae).

LEROY (1982) reconheceu três gêneros de cafeeiros: *Coffea*, *Psilanthus* e *Nostolachma*, este último restrito à Ásia e Indonésia. Ele também distinguiu três subgêneros de *Coffea* e dois de *Psilanthus*. Com base na literatura, conclui-se que as verdadeiras espécies de *Coffea* são oriundas da parte central e equatorial da África, de Madagascar e ilhas próximas do oceano Índico. As demais espécies que foram descritas como pertencentes ao gênero *Coffea* e oriundas de regiões asiáticas já não são consideradas como espécies verdadeiras de *Coffea* (FAZUOLI et al., 1999).

A última classificação apresentada agrupa os cafeeiros em dois gêneros: *Coffea* e *Psilanthus*. O gênero *Psilanthus*, por sua vez, é dividido nos subgêneros *Psilanthus* e *Afrocoffea*, e o gênero *Coffea* compreende os subgêneros: *Coffea* e *Barocoffea*. Enquanto o subgênero *Barocoffea* é representado por sete espécies, o

subgênero *Coffea* abriga 80 espécies, sendo aproximadamente 25 oriundas da África continental e cinco de Madagascar (BRIDSON, 1982).

Chevalier (1942), citado por CARVALHO (1957), apresentou uma proposta de classificação das espécies do gênero *Coffea*, segundo a qual esse gênero seria constituído por 60 espécies, sendo seis de posição incerta ou mal conhecida e as demais, agrupadas nas seções *Eucoffea*, *Mascarocoffea*, *Argocoffea*, *Paracoffea* e subseção *Mozambicoffea*, respectivamente com 14, 18, 9, 8 e 5 espécies. CHEVALIER (1947) apresentou uma nova lista relatando 65 espécies. Purselove (1968), citado por FAZUOLI et al. (1999), relatou 50 espécies do gênero *Coffea*, sendo 33 da África tropical, 14 de Madagascar e 3 das Ilhas Maurício e Reunião, enquanto 56 espécies provenientes de Madagascar foram listadas por CHARRIER (1978). Ao que parece, essas espécies estão sendo estudadas, notando-se divergências quanto ao número de espécies verdadeiras de Madagascar (FAZUOLI et al., 1999). Novas espécies de *Coffea* foram descritas por BRIDSON (1982), principalmente da parte oriental africana, algumas, até então, não caracterizadas o suficiente para serem descritas (FAZUOLI et al., 1999).

As dificuldades de classificação das espécies de *Coffea* decorrem do fato de não existir, nos países produtores, uma coleção completa das espécies, em que estudos comparativos possam ser efetuados (MELO, 1998). Isso se deve à ampla distribuição geográfica das espécies do gênero no continente africano, à dificuldade de coleta do germoplasma existente e à sua introdução e manutenção nos centros de investigação (LOPES et al., 1984; FAZUOLI et al., 1999). Além disso, a maior parte dos países africanos têm imposto sérias limitações à saída de material nativo (FAZUOLI et al., 1999).

Dentro do subgênero *Coffea*, a seção *Eucoffea* é a mais importante economicamente, pois contém as duas espécies (*Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre) mais cultivadas nos grandes centros produtores de café (CHARRIER e BERTHAUD, 1985). Segundo CHARRIER (1978), estão incluídas também nessa seção as espécies *Coffea congensis*, *C. eugenoides* e *C. moka*. Além dessas, destacam-se as espécies *C. dewevrei*, *C. salvatrix* e *C.*

stenophylla, tanto pelo valor comercial em algumas regiões da África quanto pela possibilidade de serem utilizadas em cruzamentos no melhoramento genético.

No Brasil, também são as mais cultivadas *C. arabica*, que produz o café comercialmente conhecido por Arábica, e *C. canephora*, chamada de Robusta. *C. arabica* reúne um maior número de características agrônômicas desejadas, como melhor aparência do fruto, uniformidade do tamanho das sementes, reduzida quantidade de grãos moca, película prateada clara e não aderente, torração uniforme e bebida de melhor qualidade. *C. canephora* geralmente apresenta sementes com maior variabilidade no tamanho, película aderente de cor marrom e quantidade elevada de grãos moca. A bebida é considerada de qualidade menos aceitável, o que tem como reflexo as menores cotações do produto no mercado (BOAVENTURA e CRUZ, 1987).

As informações quanto ao número de espécies de café existentes no mundo são divergentes. Entretanto, sabe-se que, apesar de existir elevada quantidade, pouco se conhece sobre o potencial econômico que possuem e as possibilidades de sua utilização em programas de melhoramento (MELO et al., 1998). Entre as diversas espécies existentes podem ser encontradas características altamente vantajosas do ponto de vista de resistência a pragas e doenças, resistência à seca e outras condições adversas de clima e solo (FAZUOLI et al., 1999).

2.2. Origem do genoma de *Coffea arabica*

A espécie *C. arabica* é tetraplóide ($2n=4x=44$) e autocompatível, multiplicando-se predominantemente por autofecundação, com taxa de fecundação cruzada da ordem de 10% (KRUG, 1936, 1937a; SYBENGA, 1960; BOUHARMONT, 1963; LEROY e PLU, 1966; CHARRIER e BERTHAUD, 1985; CARVALHO, 1988). As demais espécies do subgênero *Coffea* são diplóides ($2n=2x=22$) e auto-incompatíveis, multiplicando-se na natureza exclusivamente por fecundação cruzada (KRUG, 1936; KRUG, 1945; CARVALHO e KRUG, 1949; CARVALHO, 1988; CARVALHO et al., 1991).

A hipótese mais provável para a origem do genoma tetraplóide de *C. arabica* é a hibridação de espécies diplóides seguida de duplicação do número de cromossomos e diferenciação (CARVALHO et al., 1991).

Com o intuito de esclarecer a relação entre as espécies diplóides com a espécie tetraplóide *C. arabica*, muitas pesquisas foram conduzidas para investigar as afinidades genéticas entre as principais espécies de *Coffea*. Foram conduzidos estudos de compatibilidade de cruzamentos, quimiotaxonomia, serologia, caracteres morfológicos, citológicos, polimorfismo enzimático, análise de seqüência de DNA, DNA citoplasmático e também sobre a distribuição geográfica das espécies (CARVALHO e MONACO, 1967; LONGO, 1972; CHARRIER, 1978; BERTHOU et al., 1980; HÖFLING e OLIVEIRA, 1981; BERTHOU et al., 1983; LOPES et al., 1984; PINTO-MAGLIO e CRUZ, 1987; BERTHAUD e CHARRIER, 1988; LASHERMES et al., 1996; OROZCO-CASTILLO et al., 1996; CROS et al., 1998). Segundo esses trabalhos, *C. eugenioides* talvez seja a espécie diplóide mais relacionada a *C. arabica* e, portanto, um dos progenitores. Outras espécies como *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica* e *C. dewevrei* também parecem bem relacionadas.

Além de mostrar-se autocompatível e autógama, *C. arabica* tem uma distribuição geográfica distinta em relação a outras espécies do gênero e limitada ao sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia. De acordo com CHARRIER (1978), de um centro de diversificação na África central, alguns tipos se diferenciaram: a oeste, dando origem a *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. stenophylla*; ao sul, as espécies de Mozambicoffea e Mascarocoffea; e ao norte, *C. arabica*. Como as espécies diplóides apresentam relação apenas com um genoma de *C. arabica*, CHARRIER (1978) julgou que o outro genoma poderia ter derivado de uma espécie desconhecida e menos relacionada de *Coffea* ou, mesmo, de gênero diferente. Algumas espécies de Madagascar também parecem ter afinidade com *C. arabica*.

As análises, inclusive investigações bioquímicas de pigmentos flavonóides e sistemas enzimáticos (LONGO, 1972), indicaram que *C. eugenioides* deve ter contribuído com um dos genomas, podendo o outro ser da seção *Eucoffea* (*C.*

canephora, *C. congensis*, *C. liberica*, *C. dewevrei*) ou das várias espécies de *Mascarocoffea* (CARVALHO e MONACO, 1967; CARVALHO et al., 1984).

Utilizando taxonomia numérica, LOPES et al. (1984) analisaram, do ponto de vista quimiotaxonômico, a composição de pigmentos flavonóides e compostos fenólicos, quanto às relações genéticas entre 10 espécies de *Coffea*. Os referidos autores constataram a participação de *C. eugenioides* na origem de *C. arabica*, enquanto a outra espécie envolvida poderia ser tanto *C. liberica* quanto *C. canephora*, não havendo, contudo, dados suficientes que justificassem a identificação definitiva entre uma das duas espécies. Eles excluíram a participação de *C. congensis* como possível genitor de *C. arabica*.

HÖFLING e OLIVEIRA (1981) realizaram investigações de afinidades serológicas em algumas espécies do gênero *Coffea*. Foi verificado que *C. arabica* apresenta maior afinidade por *C. eugenioides* e *C. congensis* e depois por *C. canephora*. Esses resultados indicam que as espécies *C. eugenioides* e *C. congensis* exibem maior possibilidade de terem participado da formação de *C. arabica*.

BERTHOU et al. (1980), utilizando eletroforese, estudaram a variação do DNA mitocondrial de *C. eugenioides*, *C. canephora* e *C. arabica*, acreditando que *C. arabica* tem maior afinidade com *C. eugenioides* e que ambos podem ser descendentes do mesmo ancestral próximo a *C. eugenioides*. BERTHOU et al. (1983), analisando o DNA de cloroplasto, concluíram que não há diferença entre *C. arabica* e *C. eugenioides* e nem entre *C. canephora* e *C. congensis*. Padrões de restrição de DNA da mitocôndria apontaram similaridades entre *C. arabica*, *C. eugenioides* e *C. congensis*. Segundo esse trabalho, *C. congensis* e *C. canephora* podem ter tido origem comum, correspondendo às séries robustóides, sendo, entretanto, levemente diferentes com relação ao padrão de DNA mitocondrial, o que evidencia a diversificação desse grupo filogenético, antes da separação de *C. arabica* e *C. eugenioides*.

OROZCO-CASTILLO et al. (1996), utilizando RAPD em DNA de cloroplastos e mitocôndrias, analisaram a relação entre 18 acessos de *Coffea*, representando 11 das mais importantes espécies do gênero empregadas em

melhoramento. *C. eugenoides* exibiu grande similaridade com *C. arabica*, podendo representar o genitor materno.

Análises de variação de DNA de cloroplastos (CROS et al., 1998) e DNA ribossomal nuclear (LASHERMES et al., 1997) deram suporte a análises de amostras representando 23 taxa de *Coffea*. DNA citoplasmático de *C. arabica* mostrou-se similar ao DNA citoplasmático de *C. eugenoides* e *C. sp. Moloundou* (recentemente descoberta no Congo), indicando que *C. arabica* pode ter divergido maternalmente dessas espécies. Os segmentos intercalares transcritos (ITS2) e as regiões do DNA ribossomal de *C. arabica* são marcadamente divergentes das seqüências correspondentes em *C. eugenoides* e *C. sp. Moloundou* e parecem ser quase idênticos às seqüências das espécies *C. canephora*, *C. congensis* e *C. brevides* (LASHERMES et al., 1997).

Técnicas de citogenética molecular têm sido empregadas com sucesso em estudos filogenéticos sobre *Coffea*. RAINA et al. (1998) utilizaram, em preparações cromossômicas de *C. arabica*, o DNA total de quatro espécies diplóides (*C. eugenoides*, *C. congensis*, *C. canephora* e *C. liberica*) como sonda; *C. eugenoides* e *C. congensis* marcaram, cada, 22 cromossomos da espécie tetraplóide *C. arabica*. A natureza alotetraplóide e a similaridade entre *C. arabica* e as duas espécies diplóides foram confirmadas pela técnica de FISH (hibridização fluorescente *in situ*), usando dois genes ribossômicos. Em hibridização *in situ* realizada em preparações cromossômicas de *C. arabica*, usando como sonda DNA total de *C. canephora*, LASHERMES et al. (1999) relataram que *C. arabica* é formado pela hibridação entre *C. eugenoides* e *C. canephora*, ou ecótipos relacionados com essas espécies. Uma vez que RAINA et al. (1998) utilizaram o DNA genômico total de *C. canephora* e *C. congensis* como sondas e LASHERMES et al. (1999) empregaram apenas o DNA de *C. canephora* em sua investigação, fica a dúvida se o resultado encontrado por eles seria o mesmo, caso sonda de *C. congensis* estivesse presente na preparação. Assim, os dados mais consistentes, até o momento, parecem ser aqueles obtidos por RAINA e colaboradores (1998), que relataram que *C. arabica* tenha sido formado pela combinação das espécies diplóides *C. eugenoides* e *C. congensis*.

Como se pode depreender, ainda existem controvérsias sobre a provável origem do *C. arabica*, havendo necessidade de se obter maior número de informações filogenéticas entre as espécies diplóides, para poder assegurar os prováveis ancestrais de *C. arabica*. Especulações sobre a origem deverão continuar até que haja mais dados experimentais sobre as populações naturais, bem como de outras espécies de *Coffea* e gêneros afins. Para esse fim, há necessidade de programas para troca de germoplasma, estimulado por organizações mundiais (IBPGR, 1980). As espécies de Mascarocoffea são pouco freqüentes nas coleções existentes, ao passo que as recentemente encontradas no Quênia são também de grande interesse (BRIDSON, 1982; LEROY, 1982).

2.3. Híbridos interespecíficos

As hibridações interespecíficas são de grande importância para o esclarecimento da filogenia das espécies, além de contribuírem, de modo significativo, para o aproveitamento de espécies silvestres no plano geral de melhoramento de *C. arabica* (CARVALHO e FAZUOLI, 1987).

No estudo das relações entre espécies de café, em hibridações interespecíficas, os resultados indicaram que o sucesso das hibridações entre espécies de uma mesma subseção nem sempre é maior do que entre as hibridações com cafeeiros de subseções diferentes. Também, parece não ocorrer relação entre o número de plantas híbridas obtidas e a distribuição geográfica ou semelhanças morfológicas das espécies usadas nas hibridações (CARVALHO e MONACO, 1967).

Híbridos entre espécies diplóides e entre diplóides e tetraplóide de *Coffea* foram obtidos e estudados no Central Coffee Research Institute and Elsewhere, sendo a fertilidade desses híbridos freqüentemente baixa (CARVALHO e MONACO, 1967; SYBENGA, 1960).

Os híbridos entre *C. arabica* e *C. canephora* (MENDES, 1951) e entre *C. arabica* e as espécies diplóides *C. dewevrei* e *C. liberica* são triplóides ($2n=33$) estéreis (MENDES, 1958). Os retrocruzamentos dos híbridos interespecíficos

com a espécie *C. arabica* são difíceis, e, quando obtidos, o seu produto é muito variável, em razão, principalmente, da sua constituição genética. Assim, aneuplóides e, sobretudo, tetraplóides ($2n=44$) e pentaplóides ($2n=55$) foram observados. Para MENDES (1951), seria teoricamente possível obter retrocruzamentos que possuíssem em sua constituição um agrupamento homogêneo de cromossomos, em que predominassem os genes que determinam as boas qualidades de *C. arabica* e existissem genes desejáveis da outra espécie.

Plantas F_1 obtidas pelo cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora* tetraplóides mostraram fertilidade baixa, mas com grande variabilidade, conforme OWUOR e VOSSSEN (1981). Nesse caso, a restauração da fertilidade foi conseguida já na primeira e segunda gerações de retrocruzamento, tendo *C. arabica* como progenitor recorrente. BOAVENTURA e CRUZ (1987), procurando verificar as causas da baixa fertilidade nesses híbridos, observaram instabilidade já nas divisões somáticas, com o número de cromossomos variando de 42 a 46 por célula. Na anáfase I, 24,8% das células apresentaram disjunção normal, ao passo que na anáfase II foram encontrados 18 tipos de distribuição cromatídica diferentes e presença de retardatários. Apenas em 25,3% das células ocorreu distribuição normal de 22 cromossomos para cada pólo. Verificou-se que 30,7% dos grãos de pólen eram viáveis.

O tratamento de sementes de *C. arabica* ($2n=44$), *C. canephora* ($2n=22$) e *C. dewevrei* ($2n=22$) com soluções de colchicina 0,15% a 0,60% possibilitou a produção de plantas com número de cromossomos duplicados ($2n=44$ em *C. canephora* e *C. dewevrei*; e $2n=88$ em *C. arabica*). A partir de híbridos triploides, uma planta com $2n=66$ cromossomos foi obtida, e a partir do monosperma ($2n=22$) também se obteve uma planta com $2n=44$ cromossomos. No primeiro caso, eliminou-se a esterilidade quase que completamente; no segundo caso, obteve-se uma transformação completa de esterilidade em fertilidade (MENDES, 1939, 1947).

2.4. Aspectos citogenéticos do gênero *Coffea*

2.4.1. Mitose

SYBENGA (1960) apresentou uma descrição da mitose em *Coffea*, com base no trabalho de Bouharmont (1959). Na intérfase, os núcleos de células meristemáticas apresentaram diâmetro de 6,0 a 7,0 μm , contendo geralmente um nucléolo, raramente dois, de 1,5 a 4,0 μm , e grânulos cromáticos. Núcleos de outras partes da raiz variaram em forma e tamanho.

Na prófase, os grânulos condensaram-se em cromossomos. Os nucléolos desorganizaram-se antes da metáfase e formaram-se novamente na telófase. A anáfase ocorreu normalmente, e na telófase os cromossomos agruparam-se. Gradualmente, os cromossomos tornaram-se menos sensíveis aos corantes até voltarem à forma de grânulos cromáticos, no final da mitose (SYBENGA, 1960).

Segundo KRUG (1937a), a mitose não é sempre regular, e variações cromossômicas numéricas podem, às vezes, ser observadas. Há, também, a possibilidade de ocorrerem redução e duplicação somáticas, originando ramos com células poliplóides em plantas normais e ramos com células diplóides em plantas poliplóides, como resultado da mitose anormal.

2.4.2. Meiose

2.4.2.1. Microsporogênese

Conforme SYBENGA (1960), os estudos de microsporogênese em café foram iniciados por Faber em 1912, em *C. liberica*. Posteriormente, foi verificado por Leliveld (1939), citado por SYBENGA (1960), que em *C. canephora* o início da meiose ocorreu aproximadamente 36 horas após uma chuva, e os estádios iniciais puderam ser observados. Segundo esse autor, se chuva ocorre após uma estiagem longa, a meiose inicia-se mais cedo e é completada em quatro horas, ocorrendo simultaneamente em praticamente todas as plantas. Conforme MENDES (1950ab), em *C. canephora* var. Nana a meiose

começou há algum tempo antes, e o estudo das fases iniciais da meiose foi dificultado, pois os cromossomos apresentaram muitas regiões que se coravam fracamente. Ainda conforme esse autor, o nucléolo corou-se mais intensamente no início da meiose. Nas fases posteriores ao paquíteno, os cromossomos coraram-se mais facilmente, o centrômero apareceu como uma região clara e ocorreu uma condensação rápida até a metáfase I. Na anáfase I, a separação foi normal e, na telófase I, os cromossomos voltaram a ficar menos corados, dificultando sua observação; não houve intercinese observável. Os cromossomos condensaram-se novamente, voltando a separar-se na anáfase II. Após a meiose houve desenvolvimento dos micrósporos para formar os grãos de pólen.

A redução meiótica pode ser afetada por choque térmico, como observou LANAUD (1983). O resfriamento de ramos destacados de *C. canephora* provocou a formação de micrósporos haplóides, diplóides, triplóides, tetraplóides e aneuplóides em frequências diferentes, dependendo da fase em que o tratamento foi aplicado.

BOAVENTURA et al. (1988), estudando a microsporogênese de *C. eugenioides* com o número de cromossomos duplicados, constataram que, em diacinese, os cromossomos se apresentam nas formas monovalente, bivalente, trivalente e tetravalente.

FORNI-MARTINS e CRUZ (1989), estudando a microsporogênese e a formação de semente de uma planta monossômica de *C. arabica*, verificaram diversas irregularidade meióticas, como ausência de pareamento de segmentos de alguns bivalentes em certos estádios da prófase I, ocorrência de monovalentes e de tetravalentes em prófase I e pró-metáfase I, além de pontes e de cromossomos retardatários na anáfase I. Apesar dessas irregularidades, a análise de grãos de pólen evidenciou 80% de viabilidade, e o estudo da formação de frutos indicou boa porcentagem de fertilização de óvulos.

2.4.2.2. Macrosporogênese

Conforme descrição de SYBENGA (1960), o processo meiótico é idêntico ao da microsporogênese e ocorre quatro a cinco dias antes da floração. Numa etapa preliminar, verificou-se o aparecimento de pró-metáfase e de um fuso multipolar, que precedeu o fuso normal na metáfase I. A segunda divisão aconteceu também sem uma intercinese definida. Não houve a formação de paredes celulares, pois as tétrades apresentavam-se bem-separadas. Em *C. arabica*, o desenvolvimento completo do saco embrionário ocorreu antes da abertura da flor. Quando não fertilizado, o saco embrionário persistiu por 15 dias.

2.4.3. Número de cromossomos

Inicialmente, pensou-se que o número de cromossomos do cafeeiro fosse $2n=16$, como havia sido reportado por Faber (1912), citado por SYBENGA (1960). Porém, estudos citológicos realizados por Krug (1934), citado por esse mesmo autor, evidenciaram que o número básico do gênero *Coffea* é 11. Ele analisou espécies diplóides ($2n=2x=22$) e cinco variedades de *C. arabica* (Amarelo de Botucatu, Nacional, Bourbon, Laurina e Maragoipe) com relação ao número de cromossomos metafásicos somáticos e metafásicos meióticos. Nesse trabalho, através da homogeneidade do número de cromossomos encontrados nas cinco variedades ($2n=4x=44$), o referido autor constatou a condição tetraplóide de *C. arabica* e questionou a natureza dessa poliploidia diante da impressionante normalidade da divisão meiótica nessa espécie. KRUG (1937b) analisou 13 variedades de *C. arabica*, além de outras quatro. Novamente, ele verificou $2n=4x=44$ para 10 das variedades, com três exceções: uma forma haplóide (variedade monosperma) e formas hexaplóides e octaplóides para a variedade bullata Cramer, as quais foram, então, estudadas em detalhes por KRUG (1937c) e MENDES (1958).

Distingue-se, assim, um grupo diplóide com $2n=2x=22$ e um grupo tetraplóide com $2n=4x=44$ cromossomos, como pode ser visto no Quadro 1.

Quadro 1 – Número de cromossomos em *Coffea*, conforme SYBENGA (1960)

Espécies, Variedades e Híbridos	Número de Cromossomos		Autor
	2n	n	
Espécies Diplóides			
<i>C. abeakutae</i>	22	11	Krug, 1936; Heyn, 1938; Leliveld, 1938; Bouharmont, 1959
<i>C. bengalensis</i>	22	11	Fagerlind, 1937
<i>C. canephora</i> var. Robusta	22	11	Krug, 1934, 1945; Heyn, 1938; Leliveld, 1938, 1939, 1949a; Lebrun, 1941; Bouharmout, 1959
<i>C. congensis</i>	22	11	Krug, 1934, 1945; Heyn, 1938; Leliveld, 1938, 1939, 1949a; Lebrun, 1941; Bouharmout, 1959
<i>C. dewevrei</i> var. Excelsa	22	11	Krug, 1934, 1945; Heyn, 1938; Leliveld, 1938, 1939, 1949a; Lebrun, 1941; Bouharmout, 1959
<i>C. eugenioides</i>	22	11	Bouharmont, 1959; Doughty, 1939
<i>C. liberica</i>	22	11	Leliveld, 1938; 1940a; Mendes, 1938; Lebrun, 1941; Bouharmont, 1959; Fagerlind, 1937
<i>C. stenophylla</i>	22	11	Lebrun, 1941; Bouharmont, 1959; Fagerlind, 1937
Espécie tetraplóide			
<i>C. arabica</i>	44	22	Krug, 1934, 1936, 1945; Fagerlind, 1934; Leliveld, 1938, 1940a; Bouharmont, 1959
Híbridos diplóides			
<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>	22	11	Krug, 1945
<i>C. liberica</i> x <i>C. canephora</i>	22	11	Leliveld, 1938, 1940a
Híbridos triplóides			
<i>C. arabica</i> x <i>C. congensis</i>	33		Krug, 1945
<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>	33		Krug, 1937, 1945
<i>C. arabica</i> x <i>C. liberica</i>	33		Krug, 1945
Híbridos tetraplóides			
<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>	44	22	Leliveld, 1938, 1940a; Heyn, 1938; Krug, 1945
<i>C. liberica</i> x <i>C. arabica</i>	44	22	Heyn, 1938; Leliveld, 1938, 1940a; Bouharmont, 1959
<i>C. arabica</i> x <i>C. congensis</i>	44		Krug, 1945
<i>C. arabica</i> x <i>C. dewevrei</i>	44		Krug, 1945
Outros			
<i>C. arabica</i> bullata	66		Krug, 1945
<i>C. arabica</i> bullata	88		Krug, 1945
<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i> (duplicado)	66		Krug, 1945; Mendes, 1947; Leliveld, 1940a
<i>C. arabica</i> x (<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>)	39-40 40-42 44-45		Krug, 1945

Segundo CONAGIN e MENDES (1961), *Coffea arabica* é a única espécie tetraplóide de *Coffea* já descrita que apresenta $2n=4x=44$ cromossomos, sendo autocompatível e multiplicando-se predominantemente por autofecundação, que ocorre em aproximadamente 90% das flores. A fertilização acontece 24 horas após a polinização e a primeira divisão do zigoto, 60-70 dias após a polinização (MENDES, 1958). As demais espécies são diplóides, com $2n=2x=22$ cromossomos, auto-incompatíveis e multiplicam-se por fecundação cruzada. Excepcionalmente, são encontradas plantas haplóides, poliplóides e aneuplóides, consideradas anormais.

A ocorrência de haplóides é relativamente freqüente em muitas variedades de *C. arabica*. Nas espécies diplóides, o aparecimento de haplóides é mais raro. CARVALHO (1958) verificou que, em muitas variedades diplóides, uma em cada 10.000 plantas foi haplóide. Cafeeiros haplóides apresentam folhas finas e estreitas, porte reduzido, ramos delgados e flores pequenas. Suas sementes são produzidas em pequena quantidade e, normalmente, ocorre apenas uma por fruto, o que constitui a sua característica monosperma.

Plantas haplóides, com 22 cromossomos, conhecidas por monospermas e poliplóides com 66 e 88 cromossomos, respectivamente, e denominadas bullata, já foram encontradas espontaneamente em *C. arabica*, bem como em plantas monossômicas e trissômicas, com 43 e 45 cromossomos, respectivamente (CARVALHO et al., 1991). Entre diferentes plantas aneuplóides são bastante comuns aquelas com folhas alongadas, semelhantes às da variedade angustifolia, o que deve significar que a falta de um dos diferentes cromossomos pode resultar em fenótipo semelhante. Em progênie de uma planta trissômica do cultivar Mundo Novo foi observado um cafeeiro com 42 cromossomos, nulissômicos ou duplomonossômicos e de aspecto quase normal, bem como uma planta com 46 cromossomos (ALVES, 1981). O fenótipo mucronata, com folhas pequenas e ápice bem-destacado, como o da variedade mucronata, é também encontrado com certa freqüência entre aneuplóides, bem como em plantas com folhas pequenas, lisas e brilhantes. Na descendência de plantas monossômicas, essa variação se transmite em até 35% dos descendentes, enquanto na das trissômicas a percentagem é menor, da ordem de 6,4% (ALVES, 1981). Em plantas com

número anormal de cromossomos é comum a ocorrência de sementes moca (uma única semente por fruto), o que deve ser resultante de anomalias na formação do saco embrionário.

A duplicação espontânea do número de cromossomos já foi verificada em *C. arabica* e a duplicação química, conseguida por colchicina (MENDES, 1947). Assim, obtiveram-se plantas tetraplóides em *C. arabica* (a partir de diaplóides) e também em *C. canephora*, *C. congensis*, *C. dewevrei*, *C. eugenioides*, *C. racemosa* e *C. salvatrix*, bem como no híbrido interespecífico *C. arabica* x *C. canephora*, resultando, neste último caso, em planta hexaplóide, que se revelou auto-incompatível e de produção reduzida.

De acordo com MENDES e BACCHI (1940), as primeiras fases da meiose em haplóides são semelhantes às que ocorrem nas plantas normais. Porém, o pareamento é menos freqüente, e forma-se um ou mais bivalentes. Em 21 células estudadas, 29% apresentaram apenas univalentes e 71% tinham de 1–6 bivalentes, o que demonstra a existência de alguma homologia dentro do genoma de *C. arabica*.

As formas poliplóides são freqüentes em *C. arabica*. Plantas triplóides e tetraplóides que correspondem a hexaplóides e octaplóides em relação ao número básico, respectivamente, podem ser encontradas em muitas variedades. Apresentam folhas coriáceas e crescimento compacto e são denominadas “bullata”. Conforme Cramer (1957), citado por SYBENGA (1960), plantas “bullata” também têm sido encontradas em *C. canephora*. Cruzamentos espontâneos ou artificiais entre espécies tetraplóides e diplóides produzem indivíduos triplóides.

Cruzamentos e autofertilização envolvendo triplóides ou também haplóides podem produzir indivíduos aneuplóides. MENDES (1955) encontrou cafeeiros monossômicos, com $2n=43$ cromossomos. Duas dessas plantas eram fenotipicamente diferentes, o que levou esse autor a concluir que nesses dois casos foram perdidos cromossomos diferentes. Plantas monossômicas apresentaram diferenças de características fenotípicas em relação às encontradas em plantas com número cromossômico normal. Tais diferenças foram associadas ao tamanho do cromossomo ausente ou à quantidade de heterocromatina presente

no homólogo. Em alguns vegetais, os monossômicos têm sido utilizados na transferência de cromossomos inteiros ou de segmentos cromossômicos de uma variedade para outra ou de uma espécie para outra.

2.4.4. Morfologia dos cromossomos

Os cromossomos de *C. arabica*, em mitose, são difíceis de identificar individualmente. Segundo Mendes (1938), citado por SYBENGA (1960), em *C. dewevrei* existem três pares de cromossomos, com 2,0 a 3,3 μm de comprimento facilmente distinguíveis, os únicos que puderam ser diferenciados morfológicamente. O par mais longo apresentou uma constrição secundária. Quatro pares tinham comprimento de 2,0 μm , aproximadamente, enquanto os pares restantes, entre 1,0 e 2,0 μm . Ainda, conforme esse autor, o cromossomo I exibiu centrômero submediano e uma constrição secundária no braço mais longo. O cromossomo II apresentou também centrômero submediano, enquanto o cromossomo III, centrômero mediano. Os demais mostram-no mediano e submediano. Verificou-se também que os cromossomos de *C. arabica* eram mais curtos que os das espécies diplóides, o que não foi confirmado por Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960).

SYBENGA (1960) apresentou um ideograma médio para o gênero *Coffea*, obtido por Bouharmont (1959), que efetuou o estudo mais extenso sobre a morfologia de cromossomos somáticos em *Coffea*, com base em 13 espécies desse gênero, entre elas o *C. arabica*. As características desses cromossomos são apresentadas, resumidamente, no Quadro 2.

Os resultados obtidos por Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), não concordaram com os de MENDES (1938), pois ele constatou uma grande uniformidade no comprimento e na morfologia dos cromossomos das várias espécies, acreditando ser impossível a individualização dos cariótipos de acordo com as diferentes espécies. Assim, o referido autor optou pela construção de um cariótipo médio padrão para o gênero *Coffea*, em que se destacaram apenas cinco dos 11 cromossomos constituintes do complemento básico do gênero. Os cromossomos de V a X possuíam comprimento muito semelhante e

Quadro 2 – Características dos cromossomos do gênero *Coffea*

Cromossomo	Comprimento Médio (μm)	% Correspondente do Genoma
I	1,92 - 2,41	13,6
II	1,61 - 1,98	10,9
III	1,50 - 1,88	10,2
IV	1,46 - 1,79	9,8
V, VI, VII, VIII, IX e X	1,09 - 1,62	7,2 a 9,2
XI	0,97 - 1,18	6,4

Fonte: SYBENGA (1960).

não puderam ser distinguidos facilmente, apresentando centrômero mediano a submediano. Segundo aquele autor, o cromossomo XI provavelmente exibe centrômero submediano, mas raramente visível.

PINTO-MAGLIO e CRUZ (1987) realizaram um estudo morfológico dos cromossomos paquitênicos contendo região organizadora do nucléolo (NOR) de 10 espécies de *Coffea* (Quadro 3), porém, devido à falta de constância no padrão cromomérico em *C. stenophylla*, os mensuramentos dos cromossomos dessa espécie não foram realizados por essas autoras. As análises indicaram que os cromossomos diferiram quanto ao comprimento total, razão da existência de braços e padrões de cromômeros entre as espécies. Entre as diplóides ($2n=2x=22$) estudadas, sete apresentaram um cromossomo nucleolar ligado a somente um nucléolo. Em duas espécies foram observados dois cromossomos associados a um único nucléolo. A espécie poliplóide ($2n=4x=44$) *C. arabica* também apresentou dois cromossomos associados a um único nucléolo. Semelhanças morfológicas entre esses dois cromossomos indicaram uma provável similaridade entre os genomas que constituem o *C. arabica*. Conforme as referidas autoras, o número de cromossomos contendo região organizadora do nucléolo indica o nível de ploidia de um grupo taxonômico. Elas observaram que os cromossomos contendo NOR, dessas 10 espécies de *Coffea*, possuem algumas características morfológicas comuns e outras exclusivas de uma ou outra espécie.

Quadro 3 – Comprimento dos cromossomos nucleolares em *Coffea*

Espécies	Nível de Ploidia	Número de Cromossomo Nucleolar	Comprimento Total (µm)	Posição do Centrômero
<i>C. arabica</i>	4n	2 (I-II)	22,00 ± 2,29 / 22,65 ± 2,89	Sm
<i>C. canephora</i>	2n	1	32,17 ± 2,31	St
<i>C. congensis</i>	2n	1	28,50 ± 10,37	m
<i>C. dewevrei</i>	2n	1	25,84 ± 4,10	Sm - St
<i>C. eugenioides</i>	2n	1	26,46 ± 4,19	St
<i>C. kapakata</i>	2n	1	36,39 ± 2,79	St
<i>C. liberica</i>	2n	1	38,04 ± 4,25	Sm
<i>C. racemosa</i>	2n	2 (I-II)	38,09 ± 15,80 / 21,78 ± 6,06	m - Sm / sm
<i>C. salvatrix</i>	2n	2 (I-II)	22,92 ± 2,85 / 24,37 ± 2,47	St / Sm
<i>C. stenophylla</i>	-	-	-	-

m = metacêntrico, Sm = submetacêntrico e St = subtelocêntrico.

Fonte: PINTO-MAGLIO e CRUZ (1987).

Utilizando a análise da morfologia de cromossomos paquitênicos na meiose, PINTO-MAGLIO e CRUZ (1998) identificaram os 22 bivalentes de *C. arabica* (Quadro 4), concluindo que esta espécie é um alotetraplóide segmental, pois 54% dos bivalentes do complemento possuem padrão de cromômeros extremamente semelhantes. Essas autoras ainda constataram uma grande variação no número de cromossomos associados ao nucléolo (denominados cromossomos nucleolares) e outros com morfologia típica de cromossomos nucleolares, porém nunca vistos, ligados ao nucléolo. Segundo elas, tais observações indicam a ocorrência de relações de dominância entre esses cromossomos, o que, associado à natureza aloploplóide de *C. arabica*, indica que nesta espécie esteja ocorrendo a supressão da função organizadora do nucléolo em alguns cromossomos do complemento, os quais teriam potencialmente essa função. Tais dados só poderão ser confirmados através da comparação de resultados obtidos do emprego de técnicas de bandeamento NOR e hibridização *in situ*.

Embora existam divergências entre os resultados quanto à identificação e ao número de cromossomos nucleolares de *C. arabica*, nos dois trabalhos publicados por PINTO-MAGLIO e CRUZ (1987, 1998) nenhuma observação nesse sentido foi relatada por essas autoras.

Quadro 4 – Comprimento dos cromossomos paquitênicos em *Coffea arabica*

Cromossomo	Comprimento Total**	
1	41,56 ± 4,02	m
2	40,34 ± 6,97	Sm
3	34,88 ± 3,46	Sm
4	29,68 ± 7,04	Sm
5	29,28 ± 7,91	Sm
6	28,45 ± 3,32	Sm
7	27,29 ± 2,87	Sm
8	27,02 ± 4,55	m
9	26,90 ± 5,10	Sm
10	26,70 ± 7,10	Sm
11	25,49 ± 4,35	m
12	25,37 ± 5,80	Sm
13	27,27 ± 3,31	St
14*	24,30 ± 5,90	St
15	24,22 ± 3,60	Sm
16	23,94 ± 2,71	Sm
17	23,91 ± 4,51	Sm
18	23,61 ± 2,86	m
19	23,33 ± 3,74	Sm
20*	21,12 ± 2,84	Sm
21*	19,26 ± 2,50	St
22	17,27 ± 3,20	St

* Cromossomos organizadores do nucléolo.

** Comprimento total em μm .

m = mediano, Sm = submediano e St = Subterminal.

Fonte: PINTO-MAGLIO e CRUZ (1998).

2.5. Citometria de fluxo em plantas

A análise do conteúdo de DNA nuclear, por citometria de fluxo (CF), é baseada no uso de fluorocromos DNA específicos e na análise da intensidade de fluorescência do núcleo corado. Um citômetro de fluxo consiste de alguns componentes básicos: uma fonte de luz, um câmbio de fluxo, fotodetectores, processadores (transformam sinais luminosos em impulsos elétricos), convertidores (convertem impulsos elétricos em sinais digitais) e um computador para análise e armazenamento dos dados digitalizados (DOLEŽEL, 1991).

2.5.1. Preparação da amostra

O espécime a analisar pelo CF deve ser preparado de forma que suas células fiquem em suspensão. Fluorocromos DNA específicos apresentam baixa penetração nas células, problema que pode ser evitado quando o núcleo da célula é isolado antes da exposição ao fluorocromo. Tal procedimento também elimina o problema de fluorescência, que pode ser exibida pelo DNA citoplasmático. Dessa forma, alguns métodos para o isolamento de núcleos foram desenvolvidos (DOLEŽEL, 1991, 1997). GALBRAITH et al. (1983) descreveram um método simples e rápido para o isolamento direto do núcleo de tecidos de plantas. Uma pequena quantidade de tecido vegetal é fragmentado com uma lâmina de barbear em placa de Petri contendo solução-tampão hipotônica com detergentes não-iônicos (tampão de lise). O método é simples e rápido e apresentou bons resultados em muitas variedades de plantas (DOLEŽEL, 1991, 1997). Histogramas de alta resolução podem ser obtidos em muitas espécies com procedimentos mais sofisticados de isolamento (DOLEŽEL e GÖHDE, 1995), o que envolve a fragmentação do tecido, filtragem, centrifugação e ressuspensão, para a extração do núcleo intacto. Esses procedimentos foram originalmente desenvolvidos para células humanas (OTTO, 1990).

Vários tampões têm sido usados para liberar os núcleos das células de plantas. Sua composição é geralmente formulada de acordo com a sensibilidade de cada material, para preservar a integridade do núcleo, proteger o DNA da

degradação e fornecer condições ótimas para coloração do DNA. Em algumas espécies de plantas, a adição de um agente redutor, como mercaptoetanol, ditioneitol ou polivinilpirrolidone, é necessária para inibir a ocorrência de componentes fenólicos (DOLEŽEL, 1994).

Durante ou após o isolamento, os núcleos são corados pelo fluorocromo, o qual se liga específica e estequiometricamente ao DNA. Iodeto de propídio e brometo de etídio intercalam na dupla fita de DNA; Hoechst 3328 e DAPI ligam-se preferencialmente a regiões de DNA ricas em AT, enquanto mitramicina e cromomicina A3 se ligam preferencialmente a regiões ricas em GC. A seleção do fluorocromo apropriado dependerá do tipo de análise (DOLEŽEL, 1991).

2.5.2. Estimativa do tamanho do genoma nuclear

A análise da intensidade de fluorescência relativa de núcleos de tecidos de folhas jovens produz um histograma com um pico dominante correspondendo aos núcleos na fase G1 do ciclo celular e um pico menor correspondendo aos núcleos em G2. Para estimar o nível de ploidia, a posição do pico G1 da planta investigada é comparada com a posição do pico de uma planta-referência (padrão) com nível de ploidia conhecido. A comparação pode ser feita entre histogramas individuais, obtidos em condições idênticas, procedimento chamado de padrão externo. Outro procedimento, mais confiável, envolve a comparação das posições do pico G1 de duas amostras (padrão + espécime), processado em um único tubo. Este é chamado de padrão interno e elimina erros de instabilidade da leitura e variabilidade na preparação da amostra. A estimativa do tamanho do genoma por CF é dada em pg de DNA ou Mbp (milhões de pares de base), em que 1 pg = 0,960 Mbp (CROS et al., 1994; DOLEŽEL, 1997).

A seleção do padrão adequado é crucial para a correta estimativa do tamanho do genoma nuclear. DOLEŽEL et al. (1992) calibraram o tamanho do genoma de algumas cultivares para serem usadas como padrão interno em plantas: *Raphanus sativum* (2C=1,11 pg), *Lycopersicon esculentum* (2C=1,96 pg), *Zea mays* (2C=5,72 pg), *Pisum sativum* (2C=9,07 pg), *Vicia faba* (2C=26,90

pg) e *Allium cepa* ($2C=34,76$ pg), usando como padrão de calibração para essas espécies leucócitos humanos ($2C=7,0$ pg de DNA, Tiersch et al., 1989).

O conhecimento do tamanho do genoma é importante em muitas áreas de pesquisa. É empregado em estudos visando resolver relações filogenéticas, em análise e correlação entre o tamanho do genoma e características fisiológicas ou agronômicas e para estimar o efeito de fatores ambientais no conteúdo de DNA. Embora essas informações sejam de grande importância, BENNETT e LEITCH (1995) relataram que o tamanho do genoma não é conhecido em aproximadamente 99% das espécies de angiospermas.

2.5.3. Variação intra-específica

Estudos indicaram que o tamanho do genoma é constante para determinada espécie (Swiff, 1950). Porém, desde o início da década de 1980, pesquisas relatando significantes variações intra-específicas no tamanho do genoma foram apresentadas, e, desde então, essa constância tem sido questionada (BENNETT e LEITCH, 1995). Plantas como *Helianthus annuus* L., *Bulbine bulbosa* L. e *Collinsia verna* Nutt. apresentaram considerável variação intra-específica no tamanho do genoma de 64%, 116% e 288%, respectivamente (BENNETT, 1985). Em contraste, espécies como *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* e *Festuca pratensis* não exibiram polimorfismo (BENNETT e LEITCH, 1995).

Em reavaliação de alguns acessos de *Glycine max*, OBERMAYER e GREILHUBER (1998) não confirmaram variação, previamente estimada em 1,12 vez, no tamanho do genoma. Os referidos autores relataram que a variação intra-específica no conteúdo de DNA pode ser em parte metodológica, uma vez que muitos valores são obtidos em diferentes laboratórios e, segundo DOLEŽEL et al. (1998), podem, provavelmente, ser explicados pelo uso de diferentes instrumentos e padrões internos. Porém, a variação intra-específica biológica pode ser claramente demonstrada em muitas espécies (OHRI, 1998). Em cereais (RAYBURN et al., 1989), espécies do gênero *Salix* (THIBAUT, 1998) e em

Sesleria albicans (LYSÁK et al., 2000), a CF mostrou-se confiável e altamente sensível para detectar pequenas diferenças no conteúdo de DNA intra-específico. Entre os muitos processos moleculares que podem ser considerados, os mais substanciais podem envolver ampliações ou perda de heterocromatina, processos que finalmente resultam em especiação (MARTEL et al., 1997).

2.5.4. Variação interespecífica

No que diz respeito à variação interespecífica no conteúdo de DNA, PRICE (1988) mostrou que diferenças de duas a três vezes são comuns entre espécies diplóides pertencentes a um mesmo gênero. No gênero *Alstroemeria* ($2n=2x=16$), o conteúdo de DNA total variou mais que duas vezes, de 36,5 pg a 78,9 pg (2,16 vezes) (BUITENDIJK et al., 1997), e entre espécies de mosses (Bryatae) esta variação chegou a 12 vezes, de 0,174 a 2,16 pg (VOGLMAYR, 2000).

CROS et al. (1995), observando uma variação de duas vezes, no conteúdo de DNA nuclear entre espécies diplóides de *Coffea* nativas da África, discutiram essas diferenças em termos de adaptação evolutiva; o conteúdo de DNA nuclear variou de 0,95 pg (*C. racemosa*) a 1,78 pg (*C. humilis*). Com base nos valores médios de DNA nuclear apresentados pelas espécies, três grupos foram propostos. No grupo 1, com conteúdo de DNA entre 0,90 e 1,30 pg, estão as espécies *C. sessiliflora*, *C. racemosa* e *C. pseudozanguebariae*; no grupo 2, com conteúdo de DNA de 1,31 a 1,60 pg, foram incluídos *C. eugenioides*, *C. stenophylla* e *C. sp. F* (um genótipo de *C. pseudozanguebariae*); e no grupo 3, com conteúdo de DNA de 1,61 a 1,80 pg, estão os genótipos de *C. humilis*, *C. liberica*, *C. congensis*, *C. brevides*, *C. canephora* e *C. sp.* Moloundou (encontrado na Guinéa – África). Esses autores acreditam ter ocorrido aumento de DNA em *Coffea* durante sua evolução. Foi observado que espécies de *Coffea* com alto conteúdo de DNA são nativas de florestas (Guinéa – região do Congo) e espécies com pouco DNA nuclear são nativas de regiões secas no leste da África. O *C. arabica* (tetraplóide) apresentou um alto valor de DNA (2,5 pg por núcleo)

em comparação com as espécies diplóides. Duas hipóteses foram sugeridas para explicar esse valor: a adição de dois genomas de aproximadamente 1,3 pg ou a soma de um de 1 pg e outro de 1,5 pg (CROS et al., 1994).

Quando espécies parentais diferem muito em seu conteúdo de DNA nuclear, a CF pode detectar híbridos interespecíficos de acordo com seu valor de DNA intermediário (KELLER et al., 1996). Em café, híbridos obtidos entre duas espécies com o mesmo número de cromossomos ($2n=22$), porém com diferente conteúdo de DNA nuclear, *C. pseudozanguebariae*, $2C=1,13$ pg, e *C. liberica* var. 'dewevrei', $2C=1,42$ pg, puderam ser identificados pelo monitoramento do conteúdo de DNA, o qual foi intermediário aos dos genitores (entre 1,28 e 1,32 pg) (BARRE et al., 1998).

2.5.5. Significado da variação intra e interespecífica

A variabilidade intra-específica no tamanho do genoma, com o número básico de cromossomo constante, representa um assunto de grande interesse. Pesquisas têm evidenciado que variações no tamanho do genoma podem estar associadas a condições ambientais e estágios de desenvolvimento da planta, afetando diferentes populações ou até mesmo plantas individuais (NATALI et al., 1993; PRICE e JOHNSTON, 1996). Mudanças intra-específicas no tamanho do genoma estão, todavia, sujeitas à seleção natural, o que conduz a divergência e evolução das espécies (OHRI, 1998).

CROS et al. (1995) propuseram o agrupamento das espécies de *Coffea* em três classes, com base nos valores baixo, médio e alto do conteúdo de DNA nuclear apresentado. A hipótese levantada por esses autores é de que a quantidade de DNA foi aumentando durante a evolução do subgênero *Coffea*, e as três espécies *C. pseudozanguebariae*, *C. sessiliflora* e *C. racemosa*, com menores quantidades de DNA, são endêmicas no leste da África, centro de origem deste gênero. Além disso, espécies de café adaptadas a condições secas apresentam menor conteúdo de DNA que aquelas crescidas em regiões de florestas úmidas da Guinéa, região do Congo. Correlações entre conteúdo de

DNA e “habitat” e distribuições geográfica e ecológica têm evidenciado a natureza adaptativa do conteúdo de DNA (PRICE e JOHNSTON, 1996).

Em *Poa annua* foi observada uma alta variação ($2C=2,9$ a $5,2$ pg, 80%), com o número de cromossomo constante (MOWFORTH e GRIME, 1989). Foi mostrado que essa variação apresentava correlação positiva com o tamanho da célula, porém foi negativamente correlacionada com a taxa de crescimento da plântula e, portanto, com o acúmulo de matéria seca. Similarmente, uma diferença de 32,3% do hexaplóide *Festuca arundinaceae* foi positivamente correlacionada com a média de temperatura durante o ano e negativamente correlacionada com latitude, poder de germinação das sementes e taxa de crescimento (CECCARELLI et al., 1997). Essas correlações indicam que variações intra-específicas na quantidade de DNA nuclear podem estar ligadas a adaptações ambientais.

LAPITAN (1992) e FURUTA e NISHIKAWA (1991), em revisão sobre variações em DNA cromossomal nuclear, em diferentes espécies de plantas, levantaram algumas hipóteses para explicar as variações intra e interespecíficas. A primeira hipótese foi de que diferenças no comprimento dos cromossomos alteram o tamanho do genoma e podem ser geradas por deleções ou duplicações de alguns segmentos cromossômicos. BOUHARMONT (1963) relatou que diferentes espécies de café, com mesmo número de cromossomos, diferiram quanto ao comprimento de seus cromossomos. Isso é uma evidência de que diferenças interespecíficas em *Coffea*, quanto ao conteúdo de DNA, sejam conseqüências da diferença no tamanho dos cromossomos entre as espécies.

Outra possível hipótese para explicar tal variação foi a presença de seqüências repetitivas. Segundo CECCARELLI et al. (1995), muitos resultados, obtidos em diferentes materiais, indicaram que domínios fluídos, os quais são capazes de rápida mudança quantitativa, podem ocorrer no genoma. Esses domínios, que são em geral seqüências repetitivas, possivelmente ocorrem mais comumente em genomas de plantas do que de animais. Segundo esses autores, a variação no tamanho do genoma em *Vicia faba* (34,6%) apresentou correlação positiva entre conteúdos de DNA e número de cópias de seqüências de DNA

repetitivas entre populações. Observou-se uma família de seqüências repetitivas, a qual representará considerável porção do genoma nuclear. Todavia, essas mudanças quantitativas no conteúdo de DNA têm pouco efeito na habilidade dos cromossomos em parear e formar quiasmas na meiose (PRICE e JOHNSTON, 1996).

O número de seqüências repetitivas de DNA muitas vezes aumenta com o tamanho do genoma, como observado em *Helianthus annuus* (NATALI et al., 1993) e *Pisum sativum* (CAVALLINI et al., 1993). Em *Arabidopsis*, verificou-se uma diferença de 14% devido a seqüências repetitivas; em *Lycopersicum*, de 15-20%; e em *Zea mays*, de 60 a 80% (GANAL et al., 1991).

O efeito da quantidade de DNA no fenótipo tem sido referido como nucleótipo. O nucleótipo é determinado pela quantidade total de DNA, codificante e não-codificante, que influencia alguns parâmetros celulares e seu desenvolvimento, incluindo tamanho dos cromossomos, volume nuclear, volume celular, tempo do ciclo mitótico e duração da meiose (PRICE e JOHNSTON, 1996). Alterações genômicas, geradas por agentes físico, químico ou ambiental, podem causar desestabilização e rearranjo do genoma de plantas. A indução da variabilidade entre ou dentro de populações de plantas, como resposta ao estresse, pode ser parte da estratégia evolucionária para adaptação às mudanças ambientais (NATALI et al., 1993; PRICE e JOHNSTON, 1996).

A organização cromossômica e a variação na seqüência do DNA, assim como os mecanismos pelos quais alterações no tamanho do genoma e na organização são produzidas e controladas, são ainda inteiramente desconhecidas (CECCARELLI et al., 1995).

2.6. Citometria de imagem em plantas

Os métodos de citometria usados para o mensuramento do conteúdo do DNA nuclear podem ser classificados em dois grupos, fluorimetria e densitometria. Fluorimetria baseia-se na coloração do DNA com fluorocromos, e a quantidade de DNA é estimada pela intensidade de fluorescência emitida,

mensurada através de microscópio citofotômetro ou, mais freqüentemente, de um citômetro de fluxo (DOLEŽEL, 1997; DOLEŽEL et al., 1998). A densitometria inclui métodos para quantificar o conteúdo de DNA nuclear pela densidade óptica das regiões coradas. Nesse caso, o procedimento normalmente utilizado é a reação de Feulgen (Feulgen e Rossenbeck, 1924, citados por VILHAR et al., 2001).

A reação de Feulgen, proposta por Feulgen e Rossenbeck em 1924, é uma das reações cito-histoquímicas mais amplamente usadas em biologia e medicina. Permite que o DNA *in situ* possa ser especificamente corado com base no reativo de Schiff, sendo a intensidade de coloração proporcional à concentração de DNA. A principal aplicação, baseada nessa reação, está direcionada na quantificação do DNA do núcleo da célula, para avaliação da ploidia em tumores patológicos (CHIECO e DERENZINI, 1999). Tal metodologia também possibilita o mensuramento da quantidade de DNA em cromossomos individuais, além da comparação do conteúdo de DNA nuclear em diferentes espécies de plantas e animais.

Dois métodos densitométricos são usados para avaliar o tamanho do genoma de plantas: citometria citofotométrica e citometria de imagem (GREILHUBER e EBERT, 1994; BENNETT e LEITCH, 1995; BENNETT e LEITCH, 1997; BENNETT et al., 2000). O método densitométrico clássico, o qual vem sendo usado em pesquisa vegetal por muitas décadas, envolve o mensuramento da densidade óptica com instrumentos que combinam um microscópio com um fotômetro e têm sido referidos como microdensitômetros, citofotômetros e microspectofotômetros (VILHAR et al., 2001). O uso de microscópios citofotométricos apresenta o inconveniente de requerer especialistas técnicos altamente treinados (CHIECO e DERENZINI, 1999). Com o advento da citometria de imagem, o citofotômetro, utilizado em densitometria, passou a ser substituído por um sistema de análise que capta imagens do microscópio, via câmera, e o “software” calcula a densidade óptica a partir de valores cinzas de pixels dos núcleos corados. Usando espécies-padrões com o tamanho do genoma conhecido (quantidade de DNA nuclear expresso em valor-

C), a densidade óptica integrada (IOD) é convertida em picograma (pg) (VILHAR e DERMASTIA, 2002). Os problemas de custo e de complexidade de instrumentação, que envolvem o emprego do citofotômetro e que por muito tempo dificultaram o uso da reação de Feulgen, também foram superados com o uso da citometria de imagem (CHIECO e DERENZINI, 1999).

Considerando que a citometria citofotométrica e a citometria de fluxo são métodos estabelecidos para o mensuramento do conteúdo de DNA nuclear em plantas (GREILHUBER e EBERT, 1994; BENNETT e LEITCH, 1995; DOLEŽEL et al., 1998), a citometria de imagem tem sido raramente empregada (TEMSCH et al., 1998; VOGLMAYR, 2000). Já em ciências médicas, a citometria de imagem tem sido uma ferramenta muito importante no diagnóstico de patologias e tem sido amplamente utilizada (BÖCKING et al., 1995; PUECH e GIROUD, 1999). No entanto, segundo VILHAR e DERMASTIA (2002), devido ao rápido desenvolvimento de tecnologias de imagem digital, sistemas de análise de imagem poderão brevemente substituir a citometria citofotométrica em pesquisas vegetais.

A padronização interlaboratório, o controle de qualidade da reação de Feulgen e de mensuramento e a padronização de instrumentação para citometria de imagem em plantas têm sido discutidos (PUECH e GIROUD, 1999; VILHAR et al., 2001). VILHAR e DERMASTIA (2002) argumentaram sobre a necessidade de resolver os problemas relacionados com as avaliações e análises no processo de mensurar, por densitometria, o conteúdo de DNA nuclear em plantas. Esses autores propuseram que padrões metodológicos, empregados na citometria de imagem aplicada na medicina, fossem adotados para o mensuramento em plantas até que padrões botânicos internacionais sejam estabelecidos. Alguns “softwares” de análise de imagem, utilizados para diagnóstico de rotina médica, foram avaliados por VILHAR et al. (2001) e, segundo eles, podem ser usados para mensuramento de DNA em material vegetal.

Alguns autores, preocupados em comprovar a confiabilidade da citometria de imagem para o mensuramento do tamanho do genoma em vegetais, têm

comparado seus resultados com aqueles obtidos por outros métodos (TEMSCH et al., 1998; VOGLMAYR, 2000). Nesse sentido, VILHAR et al. (2001) conduziram, em laboratórios distintos, experimentos usando diferentes instrumentos de citometria de imagem. O método pico-intérfase (mensuramento de centenas de núcleos por lâminas) foi comparado ao método prófase/telófase (mensuramento de 10 prófases iniciais e 10 telófases terminais por lâmina). Os resultados foram reproduzíveis e similares àqueles obtidos previamente por DOLEŽEL et al. (1998) empregando citometria citofotométrica e citometria de fluxo. *Pisum sativum*, utilizada por VILHAR et al. (2001), foi incluída como candidata à espécie-padrão, para a análise de citometria de imagem em plantas.

2.7. Comparação do conteúdo de DNA obtido por densitometria e citometria de fluxo

Embora a citometria de fluxo e a citometria citofotométrica, baseadas na reação de Feulgen, sejam metodologias consagradas para o mensuramento do conteúdo de DNA nuclear em plantas (GREILHUBER e EBERT, 1994; BENNETT e LEITCH, 1995; DOLEŽEL et al., 1998), poucos trabalhos correlacionaram os valores de DNA determinados por esses dois procedimentos (PRICE e JOHSTON, 1996). Em 10 espécies de plantas, valores de DNA entre $2C = 1,7$ pg e $36,1$ pg, mensurados por citometria de fluxo e citometria citofotométrica, foram concordantes (MICHAELSON et al., 1991). BARANYI e GREILHUBER (1996) analisaram a variação no tamanho do genoma de 38 acessos de *Pisum sativum* por citometria de fluxo e citometria citofotométrica, sendo os valores obtidos por ambos os métodos correlacionados. Em várias cultivares de *Glycine Max* investigadas (GREILHUBER e OBERMAYER, 1997; OBERMAYER e GREILHUBER, 1999), nenhuma diferença significativa entre as duas metodologias foi detectada quanto aos valores de DNA nuclear. Com citometria de imagem, os valores do conteúdo de DNA também foram similares aos obtidos por citometria citofotométrica e citometria de fluxo (TEMSCH et al., 1998; VOGLMAYR, 2000; VILHAR et al., 2001).

Embora a citometria citofotométrica ainda seja o método mais empregado para a análise do conteúdo de DNA (PRICE e JOHNSTON, 1996; HARDIE et al., 2002), a citometria de imagem, por combinar as vantagens da densitometria tradicional (poucos núcleos, fácil preparação, baixo custo), sem o grande consumo de tempo dessa técnica, associada às vantagens da tecnologia de imagem e computador, tem tornado esse método uma alternativa em relação à citometria citofotométrica (HARDIE et al., 2002).

Apesar de o alto custo do citômetro de fluxo representar barreira para a sua ampla utilização, esse método é o mais rápido, eficiente e confiável para o mensuramento de genoma (DOLEŽEL, 1991; DOLEŽEL et al., 1994; DOLEŽEL, 1997; DOLEŽEL et al., 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L.A.L.V. **Transmissão da aneuploidia em *Coffea arabica* L. var. Mundo Novo.** Rio Claro, SP: UNESP, 1981. (Tese de Mestrado).

BARANYI, M.; GREILHUBER, J. Flow cytometric and Feulgen densitometric analysis of genome size variation in *Pisum*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, p. 297-307, 1996.

BARRE, P.; LAYSSAE, M.; D'HONT, A.; LOUARN, J.; CHARRIER A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Relationship between parental chromosomal contribution and nuclear DNA content in the Coffee interespecific hybrid: *C. pseudozanguebariae* x *C. liberica* var. *dewevrei*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 96, p. 301-305, 1998.

BENNETT, M.D. Intraspecific variation in DNA amount and the nucleotypic dimension in plant genetics. In: FREELING, M. (Ed.). **Plant genetics.** UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. [S.l.: s.n.], 1985. v. 35, p. 283-302.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amount in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 76, p. 113-176, 1995.

BENNETT, M.D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. **Ann. Bot.**, v. 86, p. 859-909, 2000.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Ann. Bot.**, v. 76, p. 113-176, 1995.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms – 583 new estimates. **Ann. Bot.**, v. 80, p. 169-196, 1997.

BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetics resources of *Coffea*. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Eds.). **Coffee – Agronomy**. London: Elsevier Applied Science, 1988. v. 4, p. 141.

BERTHOU, F.; MATHIEU, C.; VEDEL, F. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. **Theor. Appl. Genet.**, v. 65, p. 77-84, 1983.

BERTHOU, F.; TROUSLOT, P.; HAMON, S.; VEDEL, F.; QUETIER, F. Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers: Variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages. Variation de l' DNA mitochondrial dans les espèces: *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*. **Café Cacao Thé**, v. 24, n. 4, p. 313-326, 1980.

BOAVENTURA, Y. M. S.; CRUZ, N. D. Citogenética do híbrido interespecífico (*Coffea arabica* L. var. Bourbon x *C. canephora* Pierre ex Froehner var. Robusta (Linden Chev.) que originou o café Icatu. **Turrialba**, v. 37, n. 2, p. 171-178, 1987.

BOAVENTURA, Y. M. S.; CRUZ, N.D.; GOMES, C. R. B. Observações na microsporogênese de *Coffea eugenioides* com número de cromossomos duplicados. **Turrialba**, v. 38, n. 1, p. 31-38, 1988.

BÖCKING, A.; GIROUD, F.; REITH, A. Consensus report of the ESACP task force on standardisation of diagnostic DNA image cytometry. **Anal. Cell. Pathol.**, v. 8, p. 67-74, 1995.

BOUHARMONT, J. Somatic chromosomes of some *Coffea* species. **Euphytica**, v. 12, p. 254-257, 1963.

BUITENDIJK, J. H.; BOON, E.; RAMANNA, M.S. Nuclear DNA content in twelve species *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. **Annals of Botany**, v. 79, p. 343-353, 1997.

BRIDSON, D. M. Studies in *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae subfam. *Cinchonoideae*) for part 2 of flora of tropical east Africa: *Rubiaceae*. **Kew Bulletin**, v. 36, n. 4, p. 817-859, 1982.

CARVALHO, A. **Coffee genetics and breeding**. Campinas, SP: Inst. Agron., 1958. 13 p. (Bulletin).

CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Eds.). **Coffee** – Agronomy, London: Elsevier Applied science, 1988. v. 4, p. 129-165.

CARVALHO A. Sistemática do gênero *Coffea* e descrição e das variedades econômicas de *Coffea arabica*. In: **Curso de cafeicultura**, 1. Campinas, SP: IAC, 1957. p.17-36. (Apostila).

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. Espécies silvestres de *Coffea* no melhoramento de *Coffea arabica*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 39., 1987, Brasília. **Anais...** Brasília: [s.n.], 1987. p.737-738.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M.; GUERREIRO FILHO, O. Transferência de fatores que determinam a resistência a *Hemileia vastatrix* no cultivar Catuaí de *Coffea arabica*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 3., 1984, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 1984. p. 799.

CARVALHO, A.; MONACO, L. C. Genetic relationships of selected *Coffea* species. **Ciência e Cultura**, v. 19, n. 1, p. 161-165, 1967.

CARVALHO, A.; MONACO, L. C. Relaciones geneticas de especies seleccionadas de *Coffea* . **Cafe**, v. 9, n. 4, p. 1-19, 1968.

CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H. P.; FAZUOLI, L. C.; GUERREIRO FILHO, O.; LIMA, M. M. A. Aspectos genéticos do cafeeiro. **Rer. Brasil. Genet.**, v. 14, n. 1, p. 135-183, 1991.

CARVALHO, A.; KRUG, C.A. Genética de *Coffea*. XII hereditariedade da cor amarela da semente. **Bragantia**, v. 9, p. 193-203, 1949.

CARVALHO, C. R. DE. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1995. 127 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CAVALLINI, A.; NATALI, L.; CIONINI, G.; GENNAI, D. Nuclear DNA variability within *Pisum sativum* (Leguminosae): nucleotypic effects on plant growth. **Heredity**, v. 70, p. 561-6, 1993.

CECCARELLI, M.; MINELLI, S.; MAGGINI, F.; CIONINI, P.G. Genome size variation in *Vicia faba*. **Heredity**, v. 74, p. 180-187, 1995.

CECCARELLI, M.; GIORDANI, T.; NATALI, L.; CAVALLINI, A.; CIONINI, P.G. Genome plasticity during seed germination in *Festuca arundinaceae*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 94, p. 309-315, 1997.

CONAGIN, C. H. T. M.; MENDES, A. J. T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. **Bragantia**, v. 20, n. 34, p. 787-804, 1961.

CHARRIER, A. **La structure genetique des cafeiers spontanés de la region Malgashe (Mascarocofea)**. Leur relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). Paris: Memoires ORSTOM, 97, 1978. 223 p.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N.; WILLSON, K.C. **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. Inc. Westport, Connecticut, USA: The AVI Publishing Company, 1985. p. 13-47.

CHEVALIER, A. **Lés caféiers du globe**. III. Systematique des caféiers et fauxcaféiers, maladies et insectes nuisibles. Paris: Paul Lechevalier, 1947.

CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochem Cell Biol.**, v. 111, p. 345-358, 1999.

CROS, J.; COMBES, M. C.; CHABRILLANGE, N.; DUPERRAY, C.; MONNOT DES ANGELES, A.; HAMON, S. Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (Rubiaceae): inter- and intra-specific variation in African species. **Can. J. Bot.**, v. 73, p. 14-20, 1995.

CROS, J.; COMBES, M. C.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; HAMON, S.; CHARRIER, A.; LASHERMES, P. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. **Mol. Phylog. Evol.**, v. 9, p. 109-117, 1998.

CROS, J.; GAVALDA, M. C.; CHABRILLANGE, N.; RÉCALT, C.; DUPERRAY, C.; HAMON, S. Variation in the total nuclear DNA content in African *Coffea* species (Rubiaceae). **Café Cacao Thé**, v. 38, n. 1, p. 3-10, 1994.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 143-154, 1991.

DOLEŽEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal Applied Genetics**, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEŽEL, J.; GÖHDE, W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* usino high-resolution flow cytometry. **Cytometry**, v. 19, p. 103-106, 1995.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSÁK, M.A.; NARDI, L.; OBERMAYER. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory Comparison. **Annals of Botany**, v. 82 (Supplement A), p. 17-26, 1998.

DOLEŽEL, J.; LUCRETTI, S.; SCHUBERT, I. Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 13, n. 3, p. 275-309, 1994.

FAZUOLI, L.C.; MALUF, M.P.; GUERREIRO-FILHO, O.; MEDINA-FILHO, H.P.; SILVAROLLA, M.B. **Melhoramento clássico do cafeeiro relacionado com a biotecnologia moderna – III SIBAC**. Londrina, PR: [s. n.], 1999. p. 217-229,

FORNI-MARTINS, E. R.; CRUZ, N. D. Estudo da microsporogênese e formação de sementes de uma planta monossômica de café (*Coffea arabica*). **Turrialba**, v. 39, n. 3, p. 323-327, 1989.

FURATA, Y.; NISHIKAWA, K. Variation in nuclear chromosomal DNA content and its role in evolution of plants. In: GUPTA, P.K.; TSUCHIYA, T. (Eds.). **Chromosome engineering in plants**. Part A. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 71-85.

GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDOX, J.M.; AYRTS, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, p. 1049-101, 1983.

GANAL, M.W.; LAPITAN, N.L.V.; TANKSLEY, S.D. Macrostructure of the tomato telomeres. **Plant Cell**, v. 3, 1991. p. 87-94.

GREILHUBER, J.; EBERT, I. Genome size variation in *Pisum sativum*. **Genome**, v. 37, p. 646-655, 1994.

GREILHUBER, J.; OBERMAYER, R. Genome size and maturity group in *Glycine max* (Soybean). **Heredity**, v. 78, p. 574-551, 1997.

HARDIE, D.C.; GREGORY, R.; HEBERT, P.D.N. From pixels to picograms: A beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **The Journal of Histochemistry & Citochemistry**, v. 50, n. 6, p. 735-749, 2002.

HÖFLING, J.F.; OLIVEIRA, A.R. A serological investigation of some *Coffea* species with emphasis on the origin of *C. arabica* L. **Ciência e Cultura**, v. 33, n. 1, p. 66-72, 1981.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETICS RESOURCES. **IBPGR working group on genetic resources of *Coffea arabica*** FAO. Rome: IBPGR, 1980.

KELLER, E.R.J.; SCHUBERT, I.; FUCHS, J.; MEISTER, A. Interspecific cross of onion with distant *Allium* species and characterization of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic in Situ Hybridization. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, p. 417-424, 1996.

KRUG, C. A. Melhoramento do cafeeiro. Doze anos (1933-1944) de pesquisas básicas e aplicações realizadas nas Seções de Genética, Café e Citologia do Instituto Agrônomo. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, v. 20, p. 863-872; 979-992; 1038-1046, 1945.

KRUG, C. A. **Plano de estudos em execução no Departamento de Genética do Instituto Agrônomo**. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, 1936. 39 p. (Boletim técnico, 26).

KRUG, C. A. Variações somáticas em *Coffea arabica*. I. **Sep. Da Revista de Agric.**, v. 12, n. 3-4, p. 101-109, 1937a. (Bol. Tec. 20).

KRUG, C. A. Estudos citológicos em *Coffea* II. **Bol. Inst. Agron.**, n. 22, 1937b.

KRUG, C. A. Observações citológicas em *Coffea* III. **Bol. Inst. Agron.**, n. 27, 1937c.

LANAUD, C. Non-reduction processes caused by chilling during coffee tree microsporogenesis. **Café Cacao Thé**, v. 27, n. 4, p. 259-274, 1983.

LAPITAN, N.L.V. Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. **Genome**, v. 35, p. 171-181, 1992.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; TROUSLOT, P.; CHARRIER, A. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. **Theor. Appl. Genet.**, v. 94, p. 947-955, 1997.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Mol. Gen. Genet.**, v. 266, p. 261-259, 1999.

LASHERMES, P.; COUTURON, E.; MOREAU, N.; PAILLARD, M.; LOUARN, J. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theor. Appl. Genet.**, v. 93, p. 458-462, 1996.

LEROY, J.F. L'Origine Kenyane du genre *Coffea* L. et la radiation des espèces à Madagascar. **Colloque Scientifique International sur le Café**, Salvador, Bahia, Brasil, v. 10, p. 413-442, 1982.

LEROY, J.F.; PLU, A. Sur les nombres chromosomiques des *Coffea* malgaches. **Café Cacao Thé**, v. 10, p. 216-217, 1966.

LONGO, C.R.L. **Estudo de pigmentos flavonóides e sua contribuição à filogenia do gênero *Coffea***, 1972. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo, São Paulo.

LOPES C.R.; CUNHA, R. A.; BLOTTA, L.F. Estudo taxonômico do gênero *Coffea* com emprego de métodos numéricos. **Turrialba**, v. 34, n. 4, p. 421-430, 1984.

LYSÁK, M.A.; ROSTKOVÁ, A.; DIXON, J.M.; ROSSI, G.; DOLEŽEL, J. Limited genome size variation in *Sesleria albicans*. **Annals of Botany**, v. 86, p. 399-403, 2000.

MARTEL, E.; NAY, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S.; SARR, A. Genome Size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **The Journal of Heredity**, v. 88, p. 139-143, 1997.

MELO, B.; BARTHOLO, G.F.; MENDES, A.N.G. Café: Variedade e cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 92-96, 1998.

MENDES, A.J.T. Duplicação do número de cromossômios em café, algodão e fumo, pela ação da colchicina. **Bol. Inst. Agron.**, n. 57, 1939.

MENDES, A.J.T. Morfologia dos cromossômos de *Coffea excelsa*. Inst. Agron. de Campinas. **Bol. Técn.**, v. 56, p. 10, 1938.

MENDES, A.J.T. Advances in coffee production technology. Recent advances in our knowledge of coffee trees 3. Cytology. **Coffee and Tea Ind.**, v. 18, p. 37-42, 1958.

MENDES, A.J.T. A hibridação interespecífica no melhoramento do cafeeiro. **Bragantia**, v. 11, n. 10-12, p. 297-306, 1951.

MENDES, A.J.T. Observações citológicas em *Coffea*. XI. Métodos de tratamento pela colchicina. **Bragantia**, v. 7, p. 221-230, 1947.

MENDES, C. T. H. Observações citológicas em *Coffea*. XVI. Microsporogênese em *C. canephora* Pierre ex Froehner. **Bragantia**, v. 10, p. 97-104, 1950a.

MENDES, C. T. H. Observações citológicas em *Coffea*. XVII. O saco embrionário em *C. canephora* Pierre ex Froehner. **Bragantia**, v. 10, p. 105-111, 1950b.

MENDES, A. J. T. Observações citológicas em *Coffea*. XIX. Monossômicos. **Bragantia**, v. 14, n. 14, p. 137-140, 1955.

MENDES, A. J. T.; BACCHI, O. Observações citológicas em *Coffea*. V. Uma variedade haplóide (di-haplóide) de *C. arabica* L. Inst. Agron. Campinas. **Bol. Tec.**, v. 77, p. 26, 1940.

MICHAELSON, M.J.; PRICE, H.J.; ELLISON, J.R.; JOHNSTON, J.S. Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. **American Journal of Botany**, v. 787, n. 2, p. 183-188, 1991.

MOWFORTH, M.A.; GRIME, P.P. Intra-population variation in nuclear DNA amount, cell size and growth rate in *Poa annua* L. **Functional Ecology**, v. 3, p. 289-295, 1989.

NATALI, L.; CAVALLINI, A.; CIONINI, G.; SASSOLI, O.; CIONINI, P.G.; DURANTE, M. Nuclear DNA changes within single progenies and their relationships with plant development. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 506-512, 1993.

OBERMAYER, R.; GREILHUBER, O. Genome size in chinese soybean accessions-stable or variable?. **Annals of Botany**, v. 84, p. 259-262, 1999.

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

OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; POWEL, W.; WAUGH, R. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 337-341, 1996.

OTTO, F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: CRISSMAN, H.A.; DARZYNKIEWIEZ, Z. (Eds.). **Methods in Cell Biology**. New York: Academic Press, 1990. v. 33, p. 105-110.

OWUOR, J. B. O.; VOSSEN, H. A. Intererspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P. ex Fr. I. Fertility in F1 hybridas and backcrosses to *C. arabica*. **Euphytica**, v. 30, p. 861-866, 1981.

PIERROZI, N. I.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; CRUZ, N. D. Characterization of somatic chromosomes of two diploid species of *Coffea* L. with acetic and C-band techniques. **Caryologia**, v. 52, n. 1-2, 1999.

PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. P. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. **Caryologia**, v. 40, p. 7-23, 1987.

PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. P. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. **Caryologia**, v. 51, n. 1, p. 19-35, 1998.

PRICE, H.J.; JOHNSTON, S. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: JAUHAR, P.P. **Methods of genome analysis in plants**. [S. l.]: Ed. Boca Raton, 1996. 386 p.

PUECH, M.; GIROUD, F. Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. **Cytometry**, v. 36, p. 11-17, 1999.

RAINA, S.N.; MUKAI, Y.; YAMAMOTO, M. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). **Theor. Appl. Genet.**, v. 97, p. 1204-1209, 1998.

RAYBURN, AL.; AUGER, J.A.; BENZINGER, E.A.; HEPBURN, A.G. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 220, p. 1179-1183, 1989.

SYBENGA, J. Genética y citología del café. Una revisión de literatura. **Turrialba**, v. 10, n. 3, p. 82-137, 1960.

TAUNAY, A. E. **Pequena história do café no Brasil**. Rio de Janeiro: DNC, 1945. 557 p.

TEMSCH, E.M.; GREILHUBER, J.; KRISAI, R. Genome size in *Sphagnum* (peat moss). **Bot. Acta.**, v. 111, p. 325-330, 1998.

THIBAUT, J. Nuclear DNA amount in pure species and hybrids willow (*Salix*): a flow cytometric investigation. **Can. J. Bot.**, v. 76, p. 157-165, 1998.

VILHAR, B.; GREILHUBER, J.; KOCE, J.D.; TEMSCH, E.M.; DERMASTIA, M. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. **Annals of Botany**, v. 87, p. 719-728, 2001.

VILHAR, B.; DERMASTIA, M. Standardisation of instrumentation in plant DNA image cytometry. **Acta Bot. Croat.**, v. 61, n. 1, p. 11-26, 2002.

VOGLMAYR, H. Nuclear DNA amounts in Mosses (Musci). **Annals of Botany**, v. 85, p. 531-546, 2000.

CITOGENÉTICA EM *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea eugenioides*

RESUMO

A espécie *C. canephora* ($2n=2x=22$), juntamente com o *C. arabica* ($2n=4x=44$), constitui as espécies de maior importância econômica no gênero. Essas duas espécies, bem como *C. eugenioides* ($2n=2x=22$), vêm sendo objeto de estudos citogenéticos e moleculares, com o objetivo de subsidiar programas de melhoramento e estudos evolutivos no gênero. No entanto, os estudos dos cromossomos mitóticos têm sido dificultados devido aos baixos índices metafásicos obtidos e à qualidade insuficiente para uma análise adequada do cariótipo. Com o intuito de obter cromossomos dessas três espécies, morfologicamente adequados para serem caracterizados citogeneticamente e identificados para montagem do kariograma, empregaram-se técnicas citogenéticas associadas às metodologias computacionais de análise de imagens. Para acúmulo de metáfase, foram testados diferentes inibidores do fuso mitótico, em condições variadas de temperatura, tempo e concentração dos agentes. As lâminas foram preparadas por dissociação celular do meristema, simultaneamente com gotejamento da solução fixadora (metanol:ácido acético 3:1), e, em seguida, secadas ao ar. A coloração foi obtida com solução de Giemsa 5%, em tampão

fosfato pH 6,8. As imagens dos cromossomos foram observadas com objetiva de imersão de 100 X e digitalizada por videocâmera conectada ao computador provido de *softwares* específicos para análise e montagem do kariograma e idiograma. As metodologias empregadas possibilitaram a obtenção do kariograma de *C. arabica*, *C. eugenioides* e *C. canephora*, com cromossomos definidos e resolução adequada para caracterização de cada par de homólogos, aparentemente semelhantes quando obtidos por meio de técnicas convencionais. A análise citogenética revelou que *C. canephora* possui um par de cromossomos metacêntricos (m) e 10 submetacêntricos (sm). Foi observada a presença de satélites no braço curto do cromossomo 6, e o comprimento absoluto de seus cromossomos variou de 1,58 a 3,30 μm e o comprimento relativo, de 3,26 a 6,81%.

1. INTRODUÇÃO

Das espécies descritas de café, apenas duas, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* P. ex F., têm maior interesse econômico (CHARRIER e BERTHAUD, 1985). No Brasil, também são as mais cultivadas, sendo *C. arabica* e *C. canephora* as que produzem os cafés comercialmente conhecidos por Arábica Robusta, respectivamente. *C. arabica* reúne um maior número de características agronômicas desejadas, como melhor aparência do fruto, uniformidade no tamanho das sementes, reduzida quantidade de grãos moca, película prateada clara e não aderente, torração uniforme e bebida de melhor qualidade. *C. canephora* geralmente apresenta sementes com maior variabilidade no tamanho, película aderente de cor marrom e quantidade elevada de grãos moca. A bebida é considerada de qualidade menos aceitável, o que tem como reflexo as menores cotações do produto no mercado (TEIXEIRA et al., 1979).

A espécie *C. arabica* é tetraplóide ($2n=4x=44$) e autocompatível, multiplicando-se predominantemente por autofecundação, com taxa de fecundação cruzada da ordem de 10% (KRUG, 1936, 1937; SYBENGA, 1960; BOUHARMONT, 1963; LEROY e PLU, 1966; CHARRIER e BERTHAUD, 1985; CARVALHO, 1988). As demais espécies desse gênero são diplóides ($2n=2x=22$) e auto-incompatíveis, multiplicando-se na natureza por fecundação

cruzada (KRUG, 1936; KRUG, 1945; CARVALHO e KRUG, 1949; CARVALHO, 1988; CARVALHO et al., 1991).

Muitas espécies de *Coffea* têm sido objeto de estudos citogenéticos, o que contribui para entender os mecanismos evolutivos, bem como dar subsídio aos programas de melhoramento genético. As investigações iniciaram-se em 1912, com Faber, porém somente em 1959 foi efetuado, por Bouharmont, um estudo mais amplo sobre a morfologia de cromossomos somáticos em *Coffea*, com elaboração de um idiograma médio para o gênero (SYBENGA, 1960). O comprimento relativo de cada cromossomo e a localização de seus centrômeros foram tidos como similares em todas as espécies estudadas (BOUHARMONT, 1963).

As técnicas citogenéticas convencionais empregadas (MENDES, 1938; BOUHARMONT, 1963; PIEROZZI et al., 1999) e a falta de metodologias adequadas para a preparação de lâminas com metáfases morfológicamente adequadas é um grande obstáculo que tem dificultado a caracterização cromossômica das espécies de café, o que resulta em preparações cromossômicas com poucas possibilidades de identificação dos pares homólogos. A similaridade morfológica, o tamanho relativamente pequeno dos cromossomos e os baixos índices metafásicos obtidos em meristemas radiculares também têm dificultado a caracterização citogenética mais adequada dos cromossomos de café. Novas técnicas citogenéticas desenvolvidas para estudo do genoma de plantas, associadas a metodologias computacionais de análise de imagem (CARVALHO, 1995), têm possibilitado resolver, com mais definição, pequenas diferenças entre cromossomos morfológicamente semelhantes, de muitas plantas, principalmente daquelas com cariótipos homomórficos.

Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver e adaptar técnicas citogenéticas, utilizadas com sucesso em outras plantas, para obtenção de preparações com cromossomos morfológicamente mais definidos em células mitóticas de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea eugenioides*. Essas técnicas permitirão caracterizar, com melhor resolução, o cariótipo destas espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

O estudo citogenético de *Coffea arabica* (var. Catuaí Vermelho) e *C. canephora* (var. Robusta) foi realizado em amostras de sementes obtidas da coleção de plantas pertencentes ao banco de germoplasma da UFV/EPAMIG, mantida pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As sementes de *C. eugenioides* foram cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas e os procedimentos citogenéticos, desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Vegetal da UFV, em Viçosa, MG.

2.2. Obtenção de raízes

2.2.1. Germinação de sementes

As sementes de café tiveram seu pergaminho removido, como recomendado por Bendaña (1962), uma vez que este pode afetar a permeabilidade de água e também, segundo Huxley (1964), restringir a passagem de oxigênio, além de esse procedimento ser recomendado por Huxley (1965) como padrão em testes de germinação. Após a remoção do pergaminho, as sementes foram deixadas de molho por 24 a 48 horas, em água corrente, o que

para Guiscafré (1946) pode aumentar a capacidade de germinação das sementes de café (BARROS et al., 1999). Após esse tratamento, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo papel de germinação (GERMILAB) umedecido com água destilada, a cerca de 29 °C, em estufa. Sementes de café, com viabilidade alta, germinam bem em altas temperaturas, com o ótimo variando entre 25 °C e 35 °C (BAUMANN e GABRIEL, 1984). Ao atingirem cerca de 1,0 cm, as radículas foram submetidas aos tratamentos necessários para a análise citogenética.

2.2.2. Hidroponia

Mesmo com todos os cuidados, o armazenamento das sementes do cafeeiro só pode ser feito por até seis meses, pois a partir desse período a viabilidade, que gradativamente diminui durante a estocagem, tende a declinar acentuadamente (GENTIL, 2001). Mesmo oferecendo condições ótimas de temperatura e umidade, as sementes perdem o poder de germinação (POPINIGIS, 1977). Essa característica genética enquadra as sementes de café como de comportamento intermediário ao das categorias ortodoxa e recalcitrante (ELLIS et al., 1990). Para investigações citogenéticas em plantas, são obtidas células mitóticas de tecido meristemático radicular. Portanto, um segundo critério foi adotado para o procedimento de germinação, a hidroponia, no intuito de obter raízes continuamente durante todo o ano.

Para a condução da hidroponia, o “kit” comercial, denominado Kit Hidroponia Residencial[®], comercializado pela Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE), foi adquirido. Os copos plásticos que acompanham o “kit” receberam 10 a 12 furos no fundo e foram completados com substrato vermiculita. Sementes de café sem pergaminho foram colocadas sobre o substrato e cobertas com 2 a 3 mm deste. Os copos foram colocados no orifício da tampa do “kit”, fazendo com que 1 a 2 cm da base dos copos ficassem submersos na água contida no vaso. Assim que as sementes começaram a germinar, elas foram nutridas com soluções NUTRIAQUA[®]A e NUTRIAQUA[®]B, que acompanham o “kit”, conforme recomendação do

fabricante. Ao atingirem cerca de 1 cm, as radículas foram removidas e as plântulas, mantidas na solução para produção de novas radículas.

2.3. Desenvolvimento de metodologia citogenética para *Coffea*

Com o objetivo de obter preparações cromossômicas do cafeeiro com cromossomos morfológicamente mais preservados, espalhados e sem sobreposição, foi necessário o desenvolvimento de técnicas citogenéticas para preparações de lâminas que fornecessem cromossomos com tais características.

2.3.1. Pré-tratamento com antimitóticos

Os meristemas radiculares de *C. arabica* e *C. canephora* com aproximadamente 1,0 cm foram pré-tratados com diferentes agentes bloqueadores de metáfase ou despolimerizadores de microtúbulo, preparados com água destilada, em diferentes temperaturas, tempos de exposição e concentrações (Quadro 1). Os melhores resultados foram testados em *C. eugenioides*, cujo objetivo foi padronizar um protocolo para as espécies de café estudadas.

Após o pré-tratamento, as pontas de raízes foram retiradas e lavadas durante 20 minutos em água destilada e secadas em papel-toalha. As células foram fixadas com solução gelada de metanol: ácido acético (3:1), com três trocas a cada 15 minutos, e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

2.3.2. Digestão enzimática

Foi realizado um experimento visando à determinação das condições ótimas para a eliminação da parede celular de meristemas radiculares de café. Concentrações da enzima Flaxzyme™ (NOVO FERMENT) de 1:12 a 1:70 e tempos de exposição de cinco minutos a uma hora a 34 °C foram testados. Embora concentrações de 1:50 a 1:65 e tempos de 8 a 12 minutos tenham apresentado resultados satisfatórios, apenas uma combinação foi adotada na rotina, conforme descrição no parágrafo subsequente.

Quadro 1 – Antimitóticos utilizados em diferentes concentrações, tempos de exposição e temperaturas, visando padronizar um protocolo para as espécies de café

Agente Antimitótico *	Concentração	Tempo de Exposição		
		a 29 °C	a 4 °C	
Colchicina**	0,06 mM	30'; 40'; 50'; 1 h (esm)	-	
	0,12 mM	2 h (esm)	-	
	0,25 mM	6 h (esm)	24 h; 27 h; 30 h; 51 h	
	0,40 mM	2 h; 3 h; 3 h 15; 4 h; 4 h 15; 5 h 15; 6 h 15	24 h	
	0,50 mM	5 h; 6 h; 6 h 30; 7 h	5 h; 7 h; 18 h; 21 h; 23 h; 24 h; 25 h; 26 h; 30 h; 51 h	
		3 h; 5 h; 6 h (rz HU e sol)	24 h; 51 h (pl sol)	
		3 h; 5 h; 6 h; 7 h (pl sol)	25 h (pl HU e sol)	
		3 h; 5 h (pl HU e sol)	24 h (rz HU e sol)	
		6 h (rz HU e sol)	5 h (rz meio)	
	0,75 mM	6 h (esm)	3 h 15; 4 h 15; 5 h 15; 6 h 15	-
		0,80 mM	3 h; 5 h (HU)	24 h; 26 h
	1 mM	2 h; 3 h; 4 h; 6 h; 7 h	30'; 40'; 1 h; 1 h 30; 2 h; 6 h (esm)	-
		1 mM	2 h (esm)	-
		1,25 mM	30'; 40'; 50'; 1 h; 2 h (esm); 4 h	24 h
		1,5 mM	4 h	24 h
2,0 mM		4 h	-	
2,5 mM		4 h	-	
Amiprofos metila (APM)	2,5 µM	6 h (esm)	24 h	
	3 µM	3 h; 5 h; 6 h; 7 h (pl sol)	24 h (pl sol)	
		5 h; 6 h (pl cult)	24 h; 30 h	
	5 µM	4 h; 5 h; 6 h	15 h; 18 h; 21 h; 24 h; 28 h; 30 h	
		4 h; 8 h	24 h	
	10 µM	4 h	17 h; 24 h; 26 h	
	15 µM	6 h	17 h; 24 h	
	20 µM	3 h	24 h	
25 µM	3 h	24 h		
30 µM	3 h	24 h		
Trifluralina	2 e 3 µM	2 h, 3 h, 4 h, 5 h	12 h, 16 h, 18 h, 21 h e 24 h	
	5 µM	4 h; 8 h	15 h; 18 h; 21 h; 24 h; 25 h; 28 h; 30 h	
	10 µM	4 h; 8 h; 10 h; 13 h	15 h; 18 h; 21 h; 24 h; 25 h; 26 h; 28 h; 30 h	
	15 µM	3 h; 4 h	24 h; 26 h	
	20 µM	3 h; 4 h	24 h; 25 h	
	25 µM	3 h; 4 h	-	
	30 µM	3 h; 4 h	24 h; 25 h	
	Orizalina	1 µM	15'; 30'; 40'; 1 h	-
2 µM		15'; 30'; 40'; 1 h; 1 h 30; 2 h (esm)	-	
2,5 µM		3 h; 4 h; 6 h; 7 h (esm)	-	
3 µM		1 h; 1 h 30; 2 h (esm)	-	

Continua...

Quadro 1, Cont.

Agente Antimitótico *	Concentração	Tempo de Exposição		
		a 29 °C	a 4 °C	
	5 µM	3 h; 4 h; 5 h; 6 h; 8 h 6 h; 7 h (esm) 3 h; 5 h (pl HU e sol)	15 h; 18 h; 21 h; 24 h; 28 h; 30 h 25 h (pl HU e sol)	
	10 µM	3 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h; 13 h	15 h; 17 h; 18 h; 21 h; 24 h; 26 h; 28 h; 30 h	
	15 µM	3 h; 4 h	24 h; 26 h	
	20 µM	3 h; 4 h	24 h	
	30 µM	3 h; 5 h (rz sol)	24 h	
	Brometo de etídio**	0,5 µM	3 h; 5 h, 6 h (esm)	-
1,0 µM		3 h; 5 h, 6 h (esm)	-	
2,0 µM		3 h; 5 h, 6 h (esm)	-	
3 µM		3 h; 5 h; 6 h (esm)	48 h	
5 µM		3 h; 6 h	23 h; 24 h;	
10 µM		2 h; 3 h; 4 h; 5 h; 6 h; 8 h (HU)	3 h; 5 h; 24 h; 27 h (HU)	
		2 h; 3 h; 4 h; 4 h 30; 6 h; 6 h 30; 7 h	23 h; 24 h; 25 h; 26 h; 27 h; 29 h	
15 µM		2 h; 3 h; 4 h;	23 h; 24 h;	
20 µM		4 h30; 6 h 30;	23 h; 24 h; 25 h; 30 h; 37 h; 42 h; 48 h	
25 µM		3 h; 4 h; 18 h; 24 h	15 h; 23 h; 24 h	
30 µM		3 h; 4 h; 6 h 30;	25 h (rz sol)	
			15 h; 18 h; 23 h; 24 h; 25 h	
		40 mM	3 h; 4 h	25 h (rz sol)
				15 h; 18 h; 23 h; 24 h; 25 h
Hidroxiquinoleína	0,03%	3 h; 4 h; 5 h; 6 h; 8 h	15 h; 17 h; 18 h; 21 h; 24 h; 28 h; 30 h,	
	2 mM	3 h; 4 h	22 h; 27 h; 32 h; 47 h; 50 h; 59 h	
Brometo de etídio+ ciclohexamida	5 µM + 0,20 mM	4 h; 4 h 30; 5 h; 5 h 30; 6 h; 6 h 30;	-	
	5 µM + 0,10 mM	6 h 30	-	
	5 µM + 0,05 mM	6 h 30	-	
	10 µM+ 0,35 mM	4 h; 4 h 30; 6 h 30	27 h	
	10 µM+ 0,20 mM	6 h 30	27 h; 29 h	
	10 µM+ 0,18 mM	2 h; 3 h; 4 h; 6 h; 6 h 30;	24 h; 29 h	
	10 µM+ 0,10 mM	4 h; 6 h 30	24 h	
	10 µM+ 0,05 mM	4 h; 6 h 30	24 h	
	15 µM+ 0,50 mM	3 h; 4 h	24 h; 27 h; 29 h	
	15 µM+ 0,35 mM	3 h; 3 h 30	24 h	
	15 µM+ 0,17 mM	3 h; 3 h 30	24 h	
20 µM +0,20 mM	3 h; 4 h 30; 6 h 30	24 h		
30 µM +0,20 mM	3 h; 6 h 30	-		

* = em todas as soluções foi adicionada uma gota de DMSO (dimetilsulfóxido) 10% para cada 10 ml de solução.

** = algumas concentrações foram preparadas com cicloexamida.

' = minutos.

h= hora.

rz = raiz; rz sol= raiz em solução nutritiva; rz meio = raiz em meio de cultura.

pl = plântula; pl sol= plântula em solução nutritiva; pl cult = plântula em meio de cultura.

HU = tratadas com hidroxiuréia (HU) 1,25 mM e 2,5 mM.

esm = raízes submetidas à técnica de esmagamento.

As raízes foram retiradas do fixador e lavadas por 30 minutos em água destilada, a fim de retirar toda a solução fixadora do tecido. Em seguida, as pontas das raízes foram digeridas, enzimaticamente, para eliminação da parede celular, em solução de FlaxzymeTM na proporção 1:60 (v/v), por 10 minutos, a 34 °C. As raízes digeridas foram lavadas em três banhos de 10 minutos em água destilada e fixadas em solução metanol:ácido acético (3:1), com três trocas em intervalos de 15 minutos. As raízes foram armazenadas a -20 °C por, pelo menos, 24 horas.

2.3.3. Dissociação celular, secagem ao ar e coloração

Após o período de 24 horas, a raiz digerida e fixada foi transferida para a extremidade de uma lâmina bem limpa apoiada sobre um suporte com um ângulo de inclinação de aproximadamente 45°, para auxiliar o espalhamento das células, sob um microscópio estereoscópio. Uma gota de solução fixadora metanol:ácido acético (3:1) foi gotejada sobre a raiz, e, com o auxílio de uma pinça de ponta fina e um bisturi, a ponta da raiz foi cortada e o restante do material, descartado. O tecido meristemático de cada raiz foi dissociado com leves e coordenadas batidas com um bisturi, ao mesmo tempo em que foram adicionadas duas a três gotas de solução fixadora gelada para espalhar as células ao longo da lâmina, bem como propiciar a liberação de núcleos e cromossomos. Tal procedimento foi executado com cuidado para que, em tempo hábil, o material não secasse antes da completa dissociação celular. Em seguida, as lâminas foram secadas em movimentos rápidos contra o ar, para propiciar um melhor espalhamento do material, e o término da secagem foi realizado em uma placa aquecedora a 50 °C (CARVALHO, 1995).

Para a coloração, as lâminas foram imersas diretamente em solução de Giemsa 5% com tampão fosfato pH 6,8, em temperatura ambiente, por cinco minutos. Foram, então, lavadas, passando por dois recipientes, com água destilada. A secagem foi realizada ao ar e em placa aquecedora com temperatura de 50 °C.

2.4. Análise do cariótipo

A observação das lâminas e da análise do cariótipo das três espécies de café foi realizada com o uso de microscópio Olympus BX 60, sob iluminação de campo claro, usando objetivas de aumentos de 20, 40 e 100 X (imersão a óleo). As imagens de interesse foram capturadas diretamente, por meio de microcâmara acoplada ao microscópio e a um microcomputador MacintoshTM (modelo G3), equipado com placa digitalizadora.

As figuras cromossômicas armazenadas foram processadas por meio do software de domínio público, o NIH imagem program (RASBAND, 1998), que possibilita a análise das imagens capturadas.

Foram obtidas as medidas do comprimento total dos cromossomos, do comprimento do braço curto (c) e do comprimento do braço longo (l) de *Coffea canephora*. A partir dessas medidas foram obtidos o comprimento total (μm), o comprimento relativo (CR%), o índice centromérico (ic) e a relação de braços (r), em que:

$$ic = c \times 100/c+l \quad e \quad r = l/c$$

Em ambos os casos, obtém-se um valor que indica precisamente a posição do centrômero. Quanto maior (r) ou menor o (ic), mais afastado o centrômero da posição mediana, tendendo à posição terminal. Esses dados foram usados para classificar os cromossomos do complemento de acordo com a nomenclatura descrita por GUERRA (1988).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desenvolvimento de metodologia citogenética para *Coffea*

3.1.1. Pré-tratamento com antimitótico

A maioria dos agentes bloqueadores de metáfase, empregados com sucesso na maioria das espécies de plantas, mostrou-se aparentemente prejudicial ao tecido meristemático das espécies de *Coffea* estudadas. As células meristemáticas tratadas por diferentes concentrações, tempo e temperatura de exposição tiveram, na maioria dos casos, seu ciclo paralisado em interfase. As substâncias mais eficientes foram trifluralina (3 μM por 18 h a 5 °C, Figura 1) e brometo de etídio (10 μM por 24 h a 5 °C, Figuras 2 e 3). No entanto, a quantidade de figuras metafásicas obtidas foi ainda pequena, porém elas apresentaram morfologia adequada para análise citogenética. Menores concentrações e tempos de exposição (principalmente abaixo de 2 h a 29 °C), empregando estes e outros agentes testados (Quadro 1), mostraram-se menos prejudiciais às células, propiciando a obtenção de maior número de figuras mitóticas, porém a definição de seus cromossomos ainda não foi adequada para análise cariotípica.

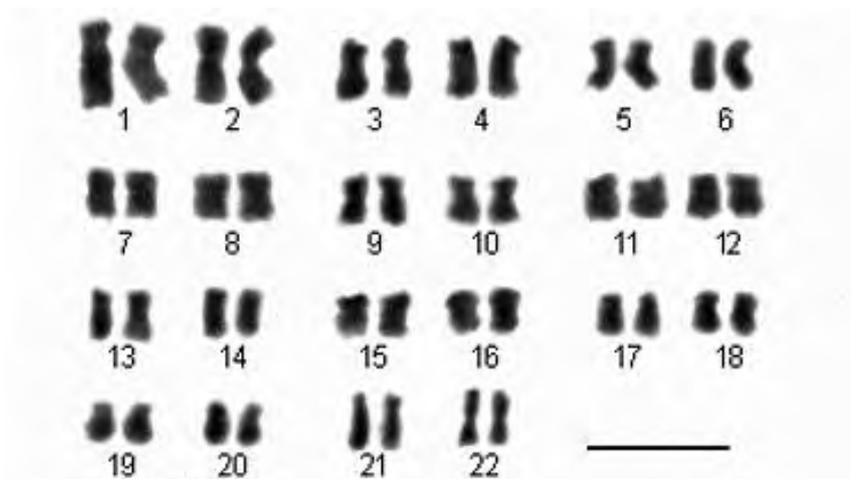


Figura 1 – Cariograma mitótico com $2n=4x=44$ cromossomos dispostos em 22 pares de homólogos de *Coffea arabica*. Barra = 5 μ m.



Figura 2 – Cariograma mitótico com $2n=2x=22$ dispostos em 11 pares de homólogos de *Coffea eugenioides*. Barra = 5 μ m.



Figura 3 – Metáfase mitótica e cariógrama com $2n=2x=22$ cromossomos dispostos em 11 pares de homólogos de *Coffea canephora*. Observe-se a presença de satélites no par de homólogos 6. Barra = 10 μ m.

Investigações mitóticas em *Coffea* (KRUG, 1938; MENDES, 1938; MEDINA, 1949; Bouharmont, 1953, citado por SYBENGA, 1960; BOUHARMONT, 1963; SELVARAJ, 1987; PIEROZZI et al., 1999) foram, até então, realizadas sem o emprego de antimitóticos. Pode-se deduzir que, talvez, as dificuldades em estabelecer um agente químico, concentração, tempo e temperatura apropriados para o tratamento do cafeeiro, além da alta sensibilidade destas plantas às mais variadas substâncias, podem ter induzido esses autores a suprimir o uso desses produtos, e, em parte, os resultados morfológicos insatisfatórios devem-se também à ausência desse procedimento.

3.1.2. Digestão enzimática, dissociação celular, secagem ao ar e coloração

A eliminação da parede celular das células vegetais é uma etapa importante para o sucesso da técnica, e a obtenção de lâminas de boa qualidade, com um bom espalhamento das células, depende da adequação desse procedimento.

A eficiência da digestão enzimática em macerar a parede celular foi obtida utilizando uma solução de Flazyme:água destilada diluída na proporção de 1:60 e

com tempo de exposição de 10 minutos a 34 °C. A otimização da digestão permitiu uma total destruição da parede sem, contudo, afetar a morfologia dos núcleos e cromossomos.

A remoção da parede celular, associada a uma adequada dissociação celular e secagem ao ar, propiciou figuras mitóticas espalhadas e totalmente desprovidas de citoplasma e membranas. Essa situação favorece muito a reação dos cromossomos com corantes, permitindo uma boa definição. Além disso, foi possível observar menor heterogeneidade de qualidade dentro e entre lâminas. Outro fator de incremento de qualidade, proveniente destes procedimentos, foi a pequena profundidade de campo das preparações. As células espalharam-se praticamente no mesmo plano focal, característica raramente observada quando as lâminas são preparadas pelo método convencional de esmagamento devido à presença dos fragmentos celulares que envolvem os núcleos e as figuras mitóticas. Assim, o espalhamento das células e, conseqüentemente, dos cromossomos foi satisfatório.

3.2. Análise do cariótipo

Os procedimentos descritos anteriormente, usando agentes bloqueadores, digestão enzimática, dissociação celular e secagem ao ar, resultaram em metáfases, morfologicamente definidas e espalhadas no mesmo plano de foco na lâmina. Considerando o tamanho reduzido dos cromossomos de *Coffea*, a análise de imagem, associada a essas características, favoreceu um incremento de qualidade para a resolução e interpretação das figuras cromossômicas obtidas, facilitando a identificação de cada par de homólogos e montagem do kariograma de *Coffea arabica* ($2n=4x=44$) (Figura 1), *Coffea eugenoides* ($2n=2x=22$) (Figura 2) e *Coffea canephora* ($2n=2x=22$) (Figura 3). O uso da análise de imagens é um recurso que vem sendo amplamente utilizado em citogenética, ampliando as possibilidades de análise e, muitas vezes, viabilizando-as (BAUCHAN e CAMPBELL, 1994; CARVALHO, 1995; AARESTRUP, 2001; TORRES, 2001).

C. arabica apresentou complemento diplóide com $2n=44$ cromossomos, número estabelecido pela contagem efetuada por Krug (1934), citado por SYBENGA (1960) e confirmado em exames posteriores realizados por KRUG (1937ab), MENDES (1938), MEDINA (1949), RIJO (1974), SELVARAJ (1987) e PINTO-MAGLIO e CRUZ (1987, 1998), entre outros autores. Esse número só é diferente em plantas conhecidas como monospermas com 22 cromossomos e poliplóides com 66 e 88 cromossomos, denominadas “bullata”, de ocorrência espontânea em muitas variedades de *C. arabica* (KRUG, 1938). Eventualmente, aneuplóides também são relatados (ALVES, 1981).

Quanto à morfologia dos cromossomos de *C. arabica*, os pares 1 e 2 são facilmente identificados por serem bem maiores em relação aos demais (Figura 1). Os pares 21 e 22, propositadamente fora da ordem, uma vez que os pares de 1 a 20 estão em ordem decrescente de tamanho, foram assim dispostos por serem bem compridos, porém são visivelmente menos robustos que os outros. Em ordem de tamanho, esses cromossomos ocupam a quinta e sexta posições. Os pares de 5 a 20 não apresentaram, aparentemente, nenhuma característica acentuada que os destacasse. Dessa forma, tais cromossomos revelaram uma relativa similaridade morfológica, e a identificação dos pares de homólogos, muitas vezes, foi facilitada pelo emprego da análise de imagem.

Em comparação com o cariótipo de cromossomos metafásicos de *C. arabica*, obtido por CLARINDO (2003), a partir de agregado celular (células em suspensão obtidas sob algumas condições de cultura), os pares 21 e 22 parecem corresponder, morfológicamente, aos pares de cromossomos 5 e 6 descritos por esse autor, os quais apresentam constrições secundárias, possivelmente relacionadas às NORs. A caracterização proposta foi de um par de cromossomos metacêntricos (par 21), 17 pares submetacêntricos (pares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 19, 20 e 22) e quatro pares acrocêntricos (15, 16, 17 e 18), com um comprimento entre 4,50 e 1,40 μm . Ainda, conforme esse mesmo autor, a diferenciação morfológica entre alguns pares de cromossomos também só pôde ser constatada pelo emprego de análise de imagem.

Em observações de cromossomos somáticos de *C. arabica*, KRUG (1938) relatou que estes são muito pequenos (1 a 2 μm), arredondados e, com poucas exceções, não podem ser diferenciados morfológicamente. MENDES (1938) acrescentou que são menores que os cromossomos de qualquer outra espécie, o que não foi confirmado por Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), que verificou que a morfologia e o tamanho dos cromossomos entre as espécies de *Coffea* são muito similares. Contudo, em um híbrido entre *C. arabica* e *C. canephora*, com $2n=33$ cromossomos, KRUG (1937 b) já havia observado que alguns cromossomos de *C. canephora* podiam ser reconhecidos por serem maiores que os cromossomos de *C. arabica*. Tais divergências não deixam dúvida de que a utilização de métodos de análises convencionais muitas vezes são insuficientes para distinguir os cromossomos de espécies, em que os mesmos apresentam tamanhos reduzidos e grande similaridade (FUKUI e MUKAI, 1988). Uma caracterização mais detalhada dos cromossomos, empregando a análise de imagem, foi possível em milho (CARVALHO, 1995), pimentão (AARESTRUP, 2001), baru (TORRES, 2001) e em café arábica (FONTES e CARVALHO, 2000; CLARINDO, 2003). No presente estudo, observou-se que o complemento cromossômico de *C. arabica* ($2n=44$) pôde ser subagrupado em 11 conjuntos de dois pares de homólogos (Quadro 2), considerando sua similaridade morfológica ressaltada pelos recursos computacionais. Os agrupamentos com dois conjuntos diplóides reforçam a hipótese da herança tetraplóide de *C. arabica*, defendida por muitos autores.

Quadro 2 – Agrupamento dos dois conjuntos diplóides do *Coffea arabica*, considerando-se a similaridade morfológica entre pares homólogos

	GRUPOS										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Pares de	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
Cromossomos	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22

O núcleo interfásico de *C. arabica* (Figura 4a) apresenta regiões heterocromáticas evidentes. Imagens digitalizadas, por meio de programa computacional específico, foram analisadas com os recursos e filtros para realçar essas regiões (Figura 4b). Gráficos em três dimensões também foram gerados para auxiliar a contagem automática, pelo computador, dessas regiões heterocromáticas correspondentes aos cromossomos (Figura 4c). O número de picos, nesse gráfico, representa as 44 regiões.

A espécie *C. eugenioides* apresentou $2n=2x=22$ cromossomos, número estabelecido para as espécies diplóides do subgênero *Coffea* (KRUG, 1936; KRUG, 1945; CARVALHO e KRUG, 1949; CARVALHO, 1988; CARVALHO et al., 1991). A coloração com Giemsa foi importante para elaboração do kariograma da espécie, com base em cromossomos metafásicos (Figura 2). É possível observar que os cromossomos estão muito semelhantes, dificultando a identificação dos pares de homólogos e as medições. Fica evidente também a dificuldade de detectar características morfológicas que não a contração primária, ou centrômero. Pode-se, porém, observar a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. PINTO-MAGLIO e CRUZ (1987), em estudo sobre morfologia dos cromossomos nucleolares em *C. eugenioides*, no paquíteno, encontraram apenas um bivalente associado ao nucléolo, o qual, segundo essas autoras, é subteloentríco.

A qualidade morfológica dos cromossomos de *C. canephora* ($2n=22$) permitiu a obtenção de dados morfométricos com resolução suficiente para montagem do kariograma (Figura 3) e do idiograma (Figura 5), sendo este construído com base nas medidas e índices apresentados no Quadro 3.

A fórmula cariotípica, para os cromossomos de *C. canephora*, foi representada por um par de cromossomos metacêntricos (1 m) e 10 submetacêntricos (10 sm), cromossomo 1 e os pares restantes, respectivamente. Identificou-se a presença de satélite, associada à região de contração secundária, no braço curto do cromossomo número 6, indicando que essa contração seja a região organizadora do nucléolo (NOR) (Figuras 5 e 6). A confirmação da presença de NOR, ou sua detecção em outro cromossomo, cuja contração não

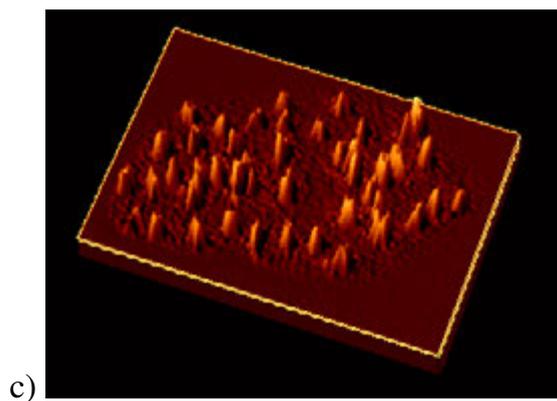
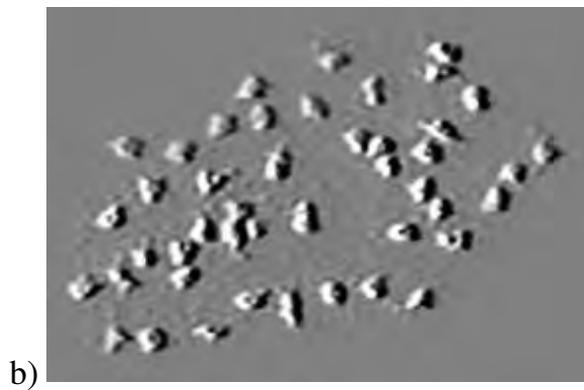
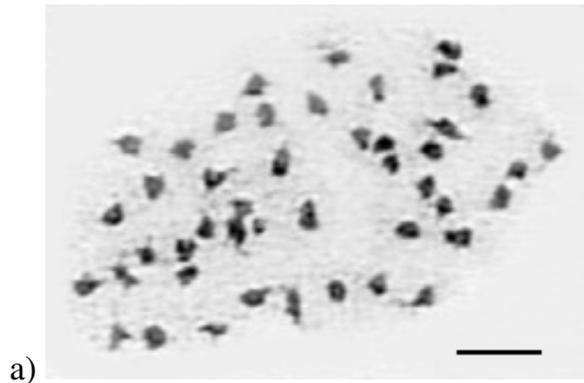


Figura 4 – a) Interfase do *C. arabica* mostrando regiões heterocromáticas correspondentes a 44 cromossomos; b) Núcleo interfásico com imagem filtrada por ferramentas do software que realça as regiões heterocromáticas; e c) Gráfico 3D, pseudocolorizado, das regiões heterocromáticas da intérfase, com picos representando as 44 regiões heterocromáticas. Barra = 5 μ m.

Quadro 3 – Dados morfométricos dos cromossomos de *C. canephora* var. Robusta, referente à Figura 3

Número do Cromossomo	Comprimento (µm)				r	ic	Classe	Comprimento Relativo (%)
	Braço		Total	Média				
	Curto	Longo						
1A	1,50	1,80	3,30	3,33	1,20	45,45	m	6,80
1B	1,52	1,83	3,35		1,20	45,37	m	6,91
2A	1,00	1,81	2,81	2,90	1,81	35,59	sm	5,79
2B	0,95	2,03	2,98		2,14	31,88	sm	6,14
3A	0,90	1,70	2,60	2,49	1,89	34,62	sm	5,36
3B	0,80	1,58	2,38		1,98	33,61	sm	4,91
4A	0,90	1,46	2,36	2,38	1,62	38,14	sm	4,86
4B	0,95	1,45	2,40		1,53	39,58	sm	4,95
5A	0,60	1,50	2,10	2,11	2,50	28,57	sm	4,33
5B	0,60	1,52	2,12		2,53	28,30	sm	4,37
*6A	0,50	1,41	1,91	1,96	2,82	26,18	sm	3,94
*6B	0,59	1,41	2,00		2,39	29,50	sm	4,12
7A	0,75	1,15	1,90	1,95	1,53	39,47	sm	3,92
7B	0,70	1,29	1,99		1,84	35,18	sm	4,10
8A	0,70	1,20	1,90	1,91	1,71	36,84	sm	3,92
8B	0,67	1,24	1,91		1,85	35,08	sm	3,94
9A	0,60	1,26	1,86	1,88	2,10	32,26	sm	3,83
9B	0,75	1,14	1,89		1,52	39,68	sm	3,90
10A	0,71	1,09	1,80	1,81	1,54	39,44	sm	3,70
10B	0,70	1,12	1,82		1,60	38,48	sm	3,75
11A	0,60	0,95	1,55	1,57	1,58	38,71	sm	3,20
11B	0,60	0,98	1,58		1,63	37,97	sm	3,26

* medidas não se considerando os satélites.

r = razão entre os braços longo e curto.

ic = índice centromérico.

m = metacêntrico e sm = submetacêntrico.



Figura 5 – Idiograma do cariótipo mitótico de *Coffea canephora* ($2n=2x=22$), conforme os dados obtidos do Quadro 3.

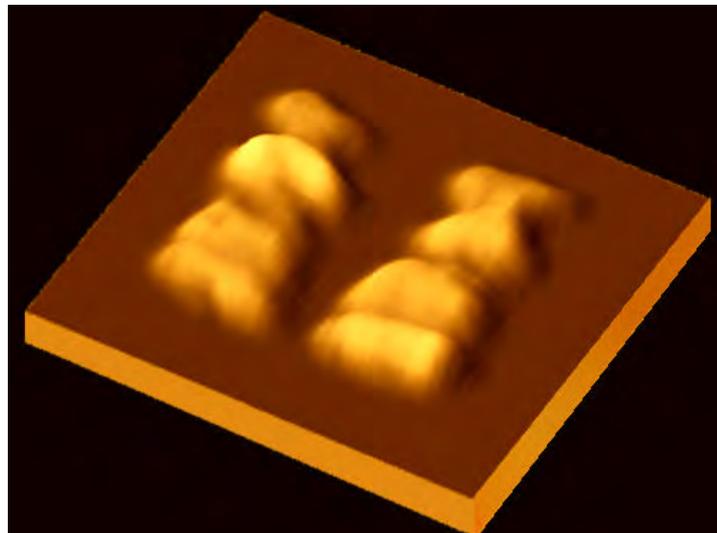


Figura 6 – Gráfico 3D pseudocolorizado, do par de cromossomos 6, ressaltando a presença de satélites, com base na Figura 3.

estivesse visível, só pode ser verificada com técnicas específicas para esse tipo de heterocromatina. Em estudo sobre a morfologia dos cromossomos nucleolares em *C. canephora*, em fase de paquíteno, PINTO-MAGLIO e CRUZ (1987) encontraram apenas um bivalente associado ao nucléolo. Em cromossomos metafásicos obtidos a partir de agregado celular de *C. canephora*, CLARINDO (2003) também observou a presença de constrição secundária no par

cromossômico número 6. Bandas NORs positivas e o bandejamento laranja de acridine, que evidenciou regiões flangeadoras da NOR, confirmaram a presença destas no braço curto do sexto par de cromossomos. LANGER e KOUL (1983) revelaram a existência de uma correlação positiva entre o número de constrições secundárias e o de nucléolos em *Lilium*, indicando que as várias constrições secundárias observadas estão potencialmente envolvidas com a organização nucleolar. Essa informação permite relatar que o sexto par cromossômico provavelmente possui genes que codificam para RNA ribossômico (rRNA), o qual forma e mantém o nucléolo no núcleo interfásico.

Os valores de comprimento absoluto dos cromossomos de *C. canephora* variaram de 3,33 μm (cromossomo 1) a 1,57 μm (cromossomo 11) e os de comprimento relativo, de 6,86 a 3,23%. Os dados morfométricos, a relação de braços (r) e o índice centromérico (ic) também foram determinados (Quadro 3).

A determinação da qualidade citogenética de uma lâmina é uma característica subjetiva, o que muitas vezes dificulta ou até mesmo pode promover equívocos na classificação cariotípica de uma espécie. No entanto, alguns autores acreditam que algumas características sejam consideradas, a fim de maximizar a qualidade das preparações e diminuir erros provocados por preparações de má-qualidade. Resíduos de parede celular, sobreposição, espalhamento, constrições primárias e secundárias bem-definidas e preservação morfológica dos cromossomos são alguns dos aspectos que devem ser considerados (MURATA, 1983; SINGH, 1993; LEITCH et al., 1994). Esses cuidados, além do refinamento de técnicas, são necessários para fornecer preparações cromossômicas com qualidade conveniente para estudos citogenéticos e análise de imagem computadorizada.

Em cafeeiro, a falta de metodologias adequadas para a obtenção de preparações com metáfases mitóticas com morfologia preservada é um grande obstáculo para a análise citogenética, o que provavelmente seja responsável pelos poucos estudos nesse sentido. MENDES (1938), KRUG (1938) e MEDINA (1949) foram uns dos pioneiros a realizar estudos mitóticos em cafeeiro. A qualidade das preparações pelo método de inclusão em parafina e cortes

citológicos permitiu apenas a contagem do número de cromossomos. Duas décadas se passaram até que Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960) e BOUHARMONT (1963), tentou caracterizar o cariótipo de *Coffea*, porém sem muito sucesso devido, principalmente, às dificuldades técnicas. A partir de então, as atenções foram voltadas para estudos meióticos. O método clássico para a obtenção de preparações de cromossomos em plantas é o esmagamento de células em solução de ácido acético 45%, sob lamínula. SELVARAJ (1987) empregou essa técnica em estudos mitóticos em *C. arabica* e *C. canephora*, representando seus cromossomos por desenhos esquemáticos, enquanto PIEROZZI et al. (1999), em *C. canephora*, apresentaram fotomicrografias de cromossomos com baixa resolução e em diferentes profundidades de campo, certamente devido à persistência de citoplasma. Em documentação fornecida, algumas preparações apresentavam cromossomos com alto nível de compactação, quase arredondados, como descrito por KRUG (1938), não permitindo identificação de constrições primárias e secundárias, enquanto em outras as terminalizações cromossômicas se apresentavam completamente descompactadas, não permitindo a identificação de seus limites. Os cortes citológicos e o esmagamento de tecido meristemático, além das limitações conferidas pelas características do próprio material, muitas vezes fornecem figuras cromossômicas com características morfológicas desconfiguradas, o que deixa poucas possibilidades de análises confiáveis. Esses conjuntos de fatores, impostos pelas metodologias empregadas, podem gerar dados que possivelmente conduzem a diferentes interpretações e dificultam a correta caracterização cariotípica de uma espécie. Assim, uma nova metodologia, para a obtenção de cromossomos com morfologia mais preservada, que envolve o preparo das lâminas por dissociação celular e secagem ao ar, tem sido usada por alguns autores, com sucesso, em espécies que apresentam cromossomos pequenos (SUMNER, 1990; CARVALHO e SARAIVA, 1993; CARVALHO, 1995; FUKUI e NAKAYAMA, 1996; AARESTRUP, 2001; TORRES, 2001).

Neste estudo, a qualidade do material biológico para análise citogenética foi fornecida pelo uso de algumas dessas ferramentas, cujas vantagens, embora

salientadas por alguns autores (SUMNER, 1990; CARVALHO e SARAIVA, 1993; CARVALHO, 1995) em relação a técnicas clássicas, são pouco difundidas entre os citogeneticistas vegetais.

A aplicação de soluções fixadoras é necessária para a preservação das células, no estado de divisão, sem causar a distorção dos cromossomos (SINGH, 1993). Particularmente, o uso de solução fixadora de metanol:ácido acético tem sido conveniente por proporcionar aumento relativo no número de preparações de boa qualidade (GOSDEN, 1994). Segundo LEITCH et al. (1994), a etapa de fixação preserva a morfologia dos cromossomos pela minimização da perda de ácidos nucléicos. Esses autores relataram também que a solução fixadora de metanol: ácido acético proporciona a precipitação de proteínas prejudiciais à manutenção da morfologia cromossômica.

Segundo SYBENGA (1992), a maceração é necessária para auxiliar o espalhamento dos cromossomos sobre a lâmina. Emsweller e Stuart (1994), citados por FUKUI e NAKAYAMA (1996), salientaram a importância do uso de maceração enzimática para preparar boas amostras de cromossomos de plantas. Entretanto, segundo SYBENGA (1992), a maceração de longa duração destroem ou reduzem a estabilidade cromossômica. A combinação dessa metodologia com a técnica de secagem ao ar é usada, com sucesso, em muitas investigações científicas.

Em cafeeiro, a total remoção da parede celular sem, contudo, afetar a morfologia dos núcleos e dos cromossomos, promovida pela adequação da digestão enzimática; e a preservação da estrutura e morfologia, atribuída à utilização do fixador metanol:ácido acético, em diferentes etapas da técnica, bem como o emprego da dissociação celular e secagem ao ar, favoreceram a obtenção de preparações de boa qualidade, em que a morfologia dos cromossomos foi bem-preserveda e a resolução final permitiu a detecção de características morfológicas, geralmente distorcidas pelo método de esmagamento.

Os dados das análises cromossômicas em *C. canephora* confirmaram que essa espécie tem cromossomos relativamente pequenos, com valores entre 3,33 e

1,57 μm , conforme as observações prévias de Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960) e PIEROZZI et al. (1999).

Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), também analisou a morfologia de cromossomos somáticos em *Coffea*, com base em 13 espécies desse gênero, entre elas *C. canephora* e *C. dewevrei* (café Excelsa), em que os valores dos comprimentos para o gênero variaram de 2,41 μm para o cromossoma 1 a 0,97 μm para o cromossomo 11, enquanto as porcentagens correspondentes do genoma variaram de 13,6% a 6,4%. Os resultados obtidos por Bouharmont não estavam de acordo com aqueles de Mendes (1938), citado por SYBENGA (1960), para *C. dewevrei*. Ambos trabalharam com pontas de raízes fixadas em Crafi e inclusas em parafina, coradas com hematoxilina ou com violeta genciana e seccionadas para análise. Essas técnicas que utilizam cortes seriados limitam e dificultam a interpretação, não sendo mais utilizadas em análises citogenéticas.

PIEROZZI et al. (1999), analisando os cromossomos de *C. canephora*, observaram uma variação no comprimento absoluto de $2,38 \pm 0,07 \mu\text{m}$ a $0,85 \pm 0,03 \mu\text{m}$, bem como de comprimento relativo de $14,00 \pm 0,23\%$ a $5,03 \pm 0,19\%$ do cromossomo 1 para o 11, respectivamente. Entretanto, essas observações diferem das de SELVARAJ (1987), em que o comprimento dos cromossomos de *C. canephora* var. Robusta variou de 2,8 a 5,5 μm , apresentando um comprimento absoluto de 40,1 μm . Tais valores também diferiram dos de LOUARN (1976), que citou uma variação de comprimento de 1,0 a 1,94 μm . Os diferentes valores dos cromossomos mitóticos relatados na literatura (Quadro 4) podem ter sido obtidos de análises realizadas em cromossomos, provenientes de tratamentos que resultam em diferentes níveis de compactação e, ou, devidos ao uso de sementes de diferentes variedades ou de diferentes procedências, equivocadamente classificadas como de *C. canephora*. A nitidez dos contornos dos cromossomos é uma característica importante para maximizar a exatidão do mensuramento. Pré-tratamento, fixação e coloração afetam não somente os contornos, mais também o tamanho relativo e absoluto dos cromossomos (SYBENGA, 1992).

Quadro 4 – Estudos de cromossomos somáticos em *C. canephora*, realizados por diferentes autores

	Comprimento (μm)	Fórmula Cariotípica	Crom. com Satélite	Metodologia	Documentação
Bouharmont, 1959	0,97 a 2,41	2 M+2 SM+ 7 não identificados	4	Corte citológico	Ilustração
Louarn, 1976	1,00 a 1,94	-	1 e 4	Esmagamento	Fotografia
Selvaraj, 1987	2,80 a 5,55	8 M+1 SM+1 ST	-	Esmagamento	Ilustração
Pierozzi et al., 1999	0,85 a 2,38	3 M+8S M	3	Esmagamento	Fotografia
Clarindo, 2003	-	-	6	Dissociação de agregados celulares	Análise computacional de imagem
Presente estudo	1,57 a 3,33	1 M+10 SM	6	Dissociação celular	Análise computacional de imagem

SYBENGA (1992) afirmou que técnicas de preparação, especialmente esmagamento, geram efeitos pronunciados no tamanho dos cromossomos. Isso não ocorre em detrimento da análise do cariótipo, desde que todos os cromossomos sejam igualmente afetados. Porém, o esmagamento pode causar efeitos consideráveis e não homogêneos. Esse mesmo autor, comparando diferentes intensidades de esmagamento em centeio, concluiu que os cromossomos mais achatados, após um intenso esmagamento, ficaram mais alongados do que aqueles que sofreram um esmagamento mais brando. Mais importante foi a observação de que os braços longos, após esse tratamento, aumentaram mais em comprimento, proporcionalmente em comparação com os braços curtos. É possível que essa diferença seja devida à heterocromatina, a qual pode ser mais compacta e, conseqüentemente, mais resistente ao esmagamento. Alguns braços curtos dos cromossomos não metacêntricos do centeio têm, usualmente, um longo segmento heterocromático, enquanto os braços longos podem ser praticamente livres de heterocromatina visível (SYBENGA, 1992).

No presente estudo, a utilização de brometo de etídio em *C. canephora* permitiu obter cromossomos metafásicos relativamente mais alongados, o que auxiliou a observação de detalhes morfológicos, principalmente das constrições primárias e secundárias. A análise de imagem possibilitou medições do comprimento total de cada braço, em micrômetros.

A classificação dos cromossomos de *C. canephora*, relatada na literatura, não é consenso quanto aos aspectos morfológicos e à relação de braços. Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), constatou uma grande uniformidade no comprimento e morfologia dos cromossomos das várias espécies, relatando ser impossível a individualização dos cariótipos das diferentes espécies. O referido autor optou pela construção de um cariótipo médio padrão para o gênero *Coffea*, em que se destacam apenas cinco dos 11 cromossomos constituintes do complemento básico do gênero. Os cromossomos (1, 2 e 11) foram classificados como submetacêntricos, os (3 e 4) como metacêntricos e os demais (5, 6, 7, 8, 9 e 10) não puderam ser distinguidos por esse autor, que apenas relatou que esses cromossomos oscilaram de metacêntricos a submetacêntricos. A proposta de criar um mesmo ideograma, sem o respaldo da documentação fotográfica original dos cromossomos, para as diferentes espécies pode ter dificultado a classificação do cariótipo de *C. canephora*, além de os dados terem sido obtidos dentro da limitação imposta pela técnica utilizada, considerando-se que os cortes citológicos seccionam os cromossomos em vários planos.

PIEROZZI et al. (1999) e SELVARAJ (1987), utilizando técnica de esmagamento, chegaram a conclusões quase antagônicas quanto à classificação dos cromossomos de *C. canephora*. PIEROZZI et al. (1999) relataram a ocorrência de três cromossomos metacêntricos (5, 10 e 11) e oito submetacêntricos, enquanto SELVARAJ (1987) representou os cromossomos por desenhos com tinta nanquim, sem documentação fotográfica, e a ocorrência de oito cromossomos metacêntricos, um submetacêntrico e dois acrocêntricos, não especificando quais deles se enquadravam em cada classe.

A presença de satélite nos cromossomos da espécie em foco também foi relatada por Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), no cromossomo número 4, enquanto SELVARAJ (1987) identificou dois satélites, mas não especificou em quais cromossomos, os quais também não podem ser comprovados pela documentação apresentada.

CLARINDO (2003), concordando com os dados apresentados no presente trabalho, observou uma constrição secundária no braço curto do par de cromossomos 6. Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), notificou a presença dessa constrição no braço longo do cromossomo 1, ao passo que PIEROZZI et al. (1999) o fizeram nos cromossomos 1 e 3, com identificação de NOR no cromossomo 3.

4. CONCLUSÕES

Preparações citogenéticas, desenvolvidas para o cafeeiro, empregando inibidores mitóticos (trifluralina 3 μM por 18 h a 5 °C e brometo de etídio 10 μM por 24 h a 5 °C), digestão enzimática da parede celular com solução de Flazyme:água destilada na proporção de 1:60 por 10' a 34 °C e preparo das lâminas pelo método de dissociação celular e secagem ao ar. Isso possibilitou a preservação morfológica dos cromossomos e a análise de imagem, fornecendo um incremento de qualidade que favoreceu a montagem do cariótipo de *C. arabica*, *C. eugenioides* e *C. canephora* e do idiograma de *C. canephora*.

Foram possíveis a identificação e o pareamento dos respectivos homólogos do *C. arabica* em dois grupos, indicando sua origem tetraplóide, conforme dados da literatura.

A caracterização citogenética e a obtenção de dados morfométricos revelaram que *C. canephora* possui um par de cromossomos metacêntricos (m) e 10 pares submetacêntricos (sm), um satélite associado à constrição secundária no braço curto do sexto par de cromossomos e um comprimento absoluto de 3,33 a 1,57 μm e um comprimento relativo de 6,86 a 3,23%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, J.R. **Análise morfológica dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annum* L.)**. Viçosa, MG: DGU, 2001. 130 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BARROS, R.S.; MAESTRI, M.; RENA, A.B. Physiology of growth and production of the coffee tree – a review. **J. Coffee Res.**, v. 27, n. 1, p. 1-54, 1999.

BAUCHAN, G.R.; CAMPBELL, T.A. Use of image analysis system to karyotype diploid alfafa (*Medicago sativa* L.). **Journal of Heredity**, v. 85, p. 18-22, 1994.

BAUMANN, T.W.; GABRIEL, H. Metabolism and excretion of caffeine during the germination of *Coffea arabica* L. **Plant Cell Physiol.**, v. 25, p. 1431-1436, 1984.

BOAVENTURA, Y.M.S.; CRUZ, N.D. Citogenética do híbrido interespecífico (*Coffea arabica* L. var. Bourbon x *C. canephora* Pierre ex Froehner var. Robusta (Linden Chev.) que originou o café Icatu. **Turrialba**, v. 37, n. 2, p. 171-178, 1987.

BOUHARMONT, J. Somatic chromosomes of some *Coffea* species. **Euphytica**, v. 12, p. 254-257, 1963.

CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Eds.). **Coffee – Agronomy**. London: Elsevier Applied Science, 1988. v. 4, p. 129-165.

CARVALHO, A.; KRUG, C.A. Genética de *Coffea*. XII Hereditariedade da cor amarela da semente. **Bragantia**, v. 9, p. 193-203, 1949.

CARVALHO, A.; MEDINA-FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO-FILHO, O.; LIMA, M.M.A. Aspectos genéticos do cafeeiro. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 14, n. 1., p. 135-183, 1991.

CARVALHO, C. R. DE. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, MG: Impr. Univ., 1995. 127 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L.S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 68, n. 3, p. 142-145, 1993.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N.; WILLSON, K.C. (Eds.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. Inc. Westport, Connecticut, USA: The AVI Publishing Company, 1985. p. 13-47.

CLARINDO, W.R. **Citogenética em agregados celulares de *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. Viçosa, MG: DGU, 2003. 86 f. Monografia (Estágio Supervisionado em Biologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

FONTES, B.P.D.; CARVALHO, C.R. Estudo dos cromossomos de *Coffea arabica* por método de análise de imagem. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2000, Poços de Caldas. **Resumos Expandidos...** Brasília: EMBRAPA/MINASPLAN, 2000. p. 591-594.

FUKUI, K.; MUHAI, Y. Condensation pattern as a new image parameter for identification of small chromosomes in plants. **Japanese Journal of Genetics**, v. 63, p. 359-366, 1988.

FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. **Plant chromosomes: Laboratory methods**. Boca Raton: CRC, 1996. 274 p.

GENTIL, D.F.O. Conservação de sementes do cafeeiro: resultados discordantes ou complementares? **Bragantia**, v. 60, n. 2, p. 149-154, 2001.

GOSDEN, J.R. **Chromosome analysis protocols**. USA: Humana Press, 1994. v. 29. 508 p.

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

KRUG, C. A. Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea* L. **Bol. Inst. Agron.**, n.11, 1938.

KRUG, C. A. Estudos citológicos em *Coffea* II. **Bol. Inst. Agron.**, n. 22, 1937b.

KRUG, C. A. Variações somáticas em *Coffea arabica*. I. **Sep. Da Revista de Agric.**, v. 12, n. 3-4, p. 101-109, 1937a. (Bol. Tec. 20).

KRUG, C.A. Melhoramento do cafeeiro. Doze anos (1933-1944) de pesquisas básicas e aplicadas realizadas nas Seções de Genética, Café e Citologia do Instituto Agrônômico. **Boletim da Superintendência dos serviços do Café**, v. 20, p. 863-872; 979-992; 1038-1046, 1945.

KRUG, C.A. Cytological observation in *Coffea* – III. **J. Genet.**, v. 34, p. 399-414, 1937.

KRUG, C.A. **Plano de estudo em execução no Departamento de Genética do Instituto Agrônômico**. Campinas, SP: Instituto Agrônômico, 1936. 39 p. (Boletim técnico, 26).

LANGER, A.; KOUL, A. K. Studies on nucleolus and nucleolar chromosomes in Angiosperms IX. *Lilium* Linn. **Cytologia**, v. 48, p. 519-526, 1983.

LEITCH, A.R.; SCHWAARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. *In situ* hybridization: a practical guide. **Bios Scientific Publishers**, 1994.

LEROY, J.F.; PLU, A. Sur les nombres chromosomiques des *Coffea* malgaches. **Café Cacao Thé**, v. 10, p. 216-217, 1966.

LOUARN, J. Hybrides interespecíficos entre *Coffea canephora* Pierre et *C. eugenioides* Moore. **Café Cacao Thé**, v. 20, n. 1, p. 33-52, 1976.

MENDES, A.J.T. Morfologia dos cromossomos de *Coffea excelsa*. Inst. Agron. de Campinas. **Bol. Técn.**, v. 56, p. 10, 1938.

MEDINA, D. M. Observações citológicas em *Coffea*. **Bragantia**, v. 9, p. 47-49, 1949.

MURATA, M. Staining air-dried protoplasts for study of plant chromosomes. **Stain Technology**, v. 58, p. 101-106, 1983.

- PIERROZI, N. I.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; CRUZ, N. D. Characterization of somatic chromosomes of two diploid species of *Coffea* L. with acetic and C-band techniques. **Caryologia**, v. 52, n. 1-2, 1999.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. P. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar Chromosomes. **Caryologia**, v. 40, p. 7-23, 1987.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. P. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. **Caryologia**, v. 51, n. 1, p. 19-35, 1998.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289 p.
- RASBAND, W. NIH – Image is a public domain program developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>. 1998.
- RIJO, L. Observações cariológicas no cafeeiro ‘Híbrido de Timor’. **Portugal Acta Biologia**, Serie A, v. 12, n. 1-2, p. 157-168, 1974.
- SELVARAJ, R. Karyomorphological studies in south Indian Rubiaceae. **Caryologia**, v. 2, p. 343-3, 1987.
- SING, R.J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC, 1993. 309 p.
- SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. London: Uniwin Hyman, 1990. 434 p.
- SYBENGA, J. Genética y citología del café. **Turrialba**, v. 10, n. 3, p. 82-137, 1960.
- SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1992. 469 p.
- TEIXEIRA, A.A.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C. Avaliação da bebida e outras características de cultivares de *Coffea canephora* e *Coffea congensis*. **Bragantia**, v. 38, p. 37-46, 1979.
- TORRES, G.A. **Morfologia e aspectos evolutivos dos cromossomos mitóticos de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. Lavras, MG: UFLA, 2001. 97 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR POR CITOMETRIA DE FLUXO EM ESPÉCIES E HÍBRIDOS DE *Coffea* spp.

RESUMO

A citometria de fluxo é uma metodologia de análise bem-estabelecida em pesquisa e rotina laboratorial na área humana. Na área vegetal, esse tipo de estudo tem sido introduzido, com sucesso, principalmente como método de avaliação de ploidia e de quantificação de DNA, com alta resolução, em diferentes espécies de plantas. No presente estudo, a CF foi utilizada para estimar valores da quantidade de DNA (valor 2 C), nas fases G0/G1, em *Coffea*. Foram analisadas amostras das espécies de *C. canephora* (2x), *C. eugenioides* (2x), *C. racemosa* (2x) e *C. arabica* (4x) e do Híbrido de Timor, híbrido natural triplóide entre *C. arabica* e *C. canephora* (4x); dos supostos híbridos interespecíficos naturais entre *C. racemosa* e *C. arabica*, denominados UFV 557; e de plantas resultantes do retrocruzamento entre UFV 557 e *C. arabica*. Folhas jovens e vigorosas foram previamente lavadas e acondicionadas em recipiente contendo água destilada. Após a assepsia, fragmentos de 2 cm² foram cortados, com o auxílio de uma lâmina de barbear, em 1,0 ml de solução de lise. A suspensão foi filtrada e transferida para tubos de Eppendorf. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e a camada de núcleos, ressuspendida em tampão. A

suspensão nuclear foi corada com solução contendo 15 μM de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) e analisada por um citômetro de fluxo. Os núcleos foram analisados e as amostragens com valores de coeficientes de variação acima de 3,06%, desconsideradas. A diferença na quantidade do conteúdo de DNA entre espécies diplóides foi de até 0,50 pg = 45% (*C. racemosa* 1,11 pg; *C. eugenioides* 1,40 pg; e *C. canephora* cv. Robusta 1,61 pg). Considerando valores intra-específicos (*C. canephora* 1,43 a 1,61 pg e *C. arabica* 2,40 a 3,04 pg), essas diferenças foram de 0,18 pg (12,59%) e 0,64 pg (26,67%), respectivamente. A citometria de fluxo também revelou-se uma ferramenta importante no monitoramento e identificação de híbridos interespecíficos de *Coffea*, com base na quantidade do DNA nuclear.

1. INTRODUÇÃO

Métodos de análise do conteúdo de DNA, por citometria de fluxo, foram originalmente desenvolvidos para células humanas. Esses métodos são baseados no uso de fluorocromos DNA específicos e na análise da intensidade de fluorescência relativa do núcleo corado (DOLEŽEL, 1991, 1997). Desde que Heller (1973) introduziu o uso da citometria em plantas, esta metodologia tem sido adaptada para as mais diversas análises de células vegetais (THIBAUT, 1998). Por ser mais conveniente, rápida e eficiente, foi progressivamente substituindo a densitometria, metodologia que, até então, era amplamente utilizada no mensuramento do conteúdo de DNA nuclear de plantas (RAYBURN et al., 1989; DOLEŽEL, 1991; GREILHUBER e EBERT, 1994).

O conceito de constância do genoma (valor-C) foi introduzido por Swift (1950) e aceito até a década de 1980, porém variações intra-específicas passaram a ser observadas, e essa inalterabilidade começou a ser questionada (BENNETT e LEITH, 1995). Variabilidade intra-específica no tamanho do genoma, com número de cromossomos constante, representa um tema de grande interesse. BENNETT (1985) relatou variação de 54% para *Glycine max*, 59% para *Gibasis venestula*, 80% para *Poa annua* e 228% para *Collinsia verna*. Variações também foram observadas em algumas espécies cultivadas: *Oryza sativa* (33%), *Zea mays* (30%) e *Capsicum annuum* (35%). Numerosos estudos também apontaram

considerável variação interespecífica no tamanho do genoma (CROS et al., 1994, 1995; BUITENDIJK et al., 1997; THIBAUT, 1998; VOGLMAYR, 2000).

O principal objetivo do melhoramento é a obtenção de variedades altamente produtivas, de melhor qualidade e resistentes a pragas e doenças. Com esse propósito, cruzamentos intra-específicos e interespecíficos são freqüentemente realizados em plantas, e a citometria de fluxo tem sido empregada, com sucesso, no estudo dessas hibridações. BARRE et al. (1998) identificaram híbridos resultantes do cruzamento entre duas espécies diplóides de café, *C. liberica* $2C=1,42$ pg e *C. pseudozanguebariae* $2C=1,13$ pg, constatando a alta sensibilidade do equipamento para esse tipo de análise. Híbridos interespecíficos, identificados por citometria, apresentaram valores de conteúdo de DNA intermediários aos valores observados nos genitores, tanto entre espécies de *Allium* quanto entre espécies de *Alstroemeria* (KELLER et al., 1996; BUITENDIJK et al., 1997). Na identificação de híbridos triplóides de *Salix*, a citometria de fluxo também apresentou-se como uma ferramenta confiável (THIBAUT, 1998).

Alguns autores debateram sobre as implicações que a variação intra-específica e interespecífica, no conteúdo de DNA nuclear, podem representar para a sistemática, taxonomia e evolução (OHRI, 1998; GREILHUBER, 1996). Em espécies de *Coffea*, nativas da África, as quantidades de DNA nuclear foram comparadas com outras espécies angiospermas e discutidas em termos de significado evolutivo (CROS et al., 1994, 1995).

Algumas hipóteses, baseadas em alterações cromossômicas (LAPITAN, 1992; MARTEL et al., 1997) e seqüências repetitivas de DNA (LAPITAN, 1992; NATALI et al., 1993; CECCARELLI et al., 1995), foram propostas para explicar tais variações. A correlação positiva entre o comprimento de cromossomos em metáfase e o conteúdo de DNA básico, entre acessos de *Vicia faba*, indica que seqüências repetitivas de DNA afetam o tamanho do genoma (CECCARELLI et al., 1995). Também em *Helianthus annuus*, a quantidade de seqüências de DNA altamente repetitivas foram correlacionadas com diferenças no conteúdo de DNA. Esses resultados evidenciam que variações no conteúdo de DNA e nas

organizações têm papel na determinação da variabilidade no desenvolvimento em populações de plantas, o que pode ser importante para tamponar os efeitos das mudanças nas condições ambientais (NATALI et al., 1993).

No presente estudo, a citometria de fluxo foi usada para determinar o conteúdo de DNA nuclear de espécies e variedades de café, além de investigar híbridos e supostos híbridos interespecíficos, pertencentes ao banco de germoplasma da UFV/EPAMIG, localizado no Campus da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

No Quadro 1, encontram-se listados os 27 acessos de café, avaliados quanto à quantidade de DNA, pertencentes ao banco de germoplasma da UFV/EPAMIG, e a espécie *Coffea eugenioides*, cedida pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Raphanus sativus cv. Saxa, doada pelo Dr. J. Doležel, foi usada como padrão de calibração.

As plantas designadas UFV557.1, UFV557.2, UFV557.3, UFV557.4 e UFV557.6 são supostos híbridos naturais entre *C. racemosa* e *C. arabica*. O nível de ploidia foi investigado para comprovação da natureza triplóide dessas plantas.

As plantas híbridas H920.1, H920.3, H920.4, H920.5 e H920.6 foram obtidas de retrocruzamentos conduzidos entre UFV557.3 e *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho (IAC 15).

Quadro 1 – Acessos de *Coffea* utilizados para avaliação do conteúdo de DNA nuclear

Espécies	Acessos	Nível de Ploidia
<i>Coffea racemosa</i>	UFV 545 cova 28	2x
<i>Coffea eugenioides</i>	<i>C.eugenioides</i> - (IAC)	2x
<i>Coffea canephora</i>	cv. Conilon UFV 513 cova 65 - (M)	2x
	cv. Apoatã IAC 2258 cova 01	2x
	cv. Robusta IAC 1652-15 cova 01	2x
	cv. Robusta T3581 - (UFV)	2x
	cv. Conillon R3 cova 01 - (UFV)	2x
<i>Coffea arabica</i>	cv. Catuaí Vermelho IAC 15 (UFV 2237 cova 148 EL7)	4x
	cv. Acaiá Cerrado MG 1474 (1150.489 EL8) cova 792 - (UFV)	4x
	cv. Airi UFV 3095 cova 145 (seleção em San Ramon)	4x
	cv. Bourbon Amarelo cova 146 - (China)	4x
	cv. Catuaí Amarelo IAC 30 (UFV 2143) cova 66	4x
	cv. Catuaí Vermelho IAC 44 (UFV 2144) cova 69	4x
	cv. Mundo Novo IAC 376-4-32 (UFV 2150) cova 39	4x
	cv. Catuaí Amarelo Purpuracens (UFV 4072) cova 01	4x
	Arábica 5288 cova 01 - (China)	4x
	cv. Típica cova 112 - (China)	4x
Híbridos	Híbrido de Timor (UFV 447-06) <i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>	4x
	UFV 557-1 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)	-
	UFV 557-2 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)	-
	UFV 557-3 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)	-
	UFV 557-4 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)	-
	UFV 557-6 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)	-
	H920.1 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3	-
	H920.3 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3	-
	H920.4 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3	-
	H920.5 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3	-
	H920.6 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3	-

UFV – Universidade Federal de Viçosa, T – Turrialba (Costa Rica), IAC – Instituto Agrônomo de Campinas (Brasil), China – Introduzido da China e M-Marilândia, MG.

2.2. Preparação nuclear

O método de preparação da suspensão nuclear foi adaptado de DOLEŽEL e GÖHDE (1995).

2.2.1. Extração dos núcleos

Para liberação dos núcleos das plantas, tecido foliar (aproximadamente 2 cm²) foi fragmentado com uma lâmina de barbear de aço inoxidável em uma placa de Petri contendo 0,50 ml de tampão de isolamento à temperatura de aproximadamente 4 °C (tampão I = 0,1 M de ácido cítrico e 0,5% de Tween 20, dissolvidos em água destilada). Após fragmentação, esperaram-se dois minutos para que o tampão pudesse agir, e a solução foi filtrada em telas de 30 µm para um Eppendorf de 2 ml. Foi adicionado 0,5 ml do tampão I, na placa de Petri, para que o restante do material pudesse ser removido e a solução, filtrada.

2.2.2. Purificação dos núcleos

A solução foi centrifugada a 1.200 rpm, durante cinco minutos. Subseqüentemente, o sobrenadante foi removido, deixando-se 100 µl da solução e o *pellet*, contendo os núcleos, ressuspendido em 100 µl do tampão I. Em seguida, a solução foi incubada por cinco minutos a 4 °C e cinco minutos a -20 °C.

2.2.3. Coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole)

Adicionou-se 1,5 ml de tampão de coloração, tampão II (15 mM de DAPI em solução-tampão: 0,4 M de Na₂HPO₄·2H₂O, dissolvido em água destilada). Foram acrescentados, no momento do uso, 2 mM de DTT (ditiotreitól). A solução foi incubada para coloração, durante aproximadamente 10 minutos, no escuro, à temperatura ambiente.

2.3. Processamento no citômetro de fluxo

A suspensão foi transferida para tubos de leitura do citômetro. Mensuramentos foram realizados usando um citômetro de fluxo Partec PAS II/III (PARTEC GmbH, Munster, Germany) equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO)-100 W e filtros de excitação KG-1, BG-38 e UG-1, este último utilizado para excitação em UV de 200-700 nm. As amostras tiveram de 2,500 a 77,843 partículas analisadas. Posições dos picos e coeficientes de variação (CV) do pico G0/G1 foram calculados usando o software Partec. Mensuramentos foram realizados em escala linear em 1.024 canais (10 bits).

No mínimo, a análise de três folhas de uma mesma planta foi realizada em cada acesso. Os histogramas e medidas escolhidos como representativos foram aquelas amostras de valor mais próximo da média.

2.4. Amostra-padrão

Raphanus sativus L. cv. Saxa, $2C = 1,11$ pg, foi usado como padrão de calibração, para estimar o conteúdo de DNA nuclear das amostras de *Coffea*. A quantidade de DNA nuclear do *Raphanus* foi estabelecida por DOLEŽEL et al. (1992), usando-se leucócito de indivíduo do sexo masculino humano ($2C = 7,0$ pg de DNA; Tiersca et al., 1989), como padrão de referência primário.

Esses autores aconselham, na escolha de um padrão de calibração, selecionar um que possua quantidade de DNA próxima da quantidade da espécie investigada, o que pode diminuir o risco de erro devido a uma eventual não-linearidade do instrumento.

2.4.1. Padrão interno

Como padrão interno, tecido foliar do *Raphanus sativus* foi fragmentado, de acordo com o item 2.1, simultaneamente com a amostra da folha da planta-teste e processado conforme os itens 2.2, 2.3 e 3.

Alguns acessos de *Coffea*, que tiveram seus conteúdos de DNA determinados utilizando o *Raphanus* como padrão de calibração, foram utilizados como padrão de referência na determinação da quantidade de DNA de outras plantas de café.

2.4.2. Padrão externo

Amostras de café tiveram suas folhas fragmentadas (conforme item 2.1) sem a utilização simultânea de amostras de folhas de um padrão interno e processadas de acordo com os itens 2.2, 2.3 e 3. Seus conteúdos de DNA nuclear foram estimados pela comparação das leituras do pico G0/G1 com aquela apresentada pelo padrão de calibração *Raphanus* ou de outro acesso de café (com conteúdo de DNA estimado por *Raphanus*), preparados sob as mesmas condições e analisados na mesma bateria, separadamente.

2.5. Estimativa do conteúdo de DNA nuclear

O conteúdo de DNA nuclear foi estimado usando a seguinte fórmula, sugerida por DOLEŽEL (1991):

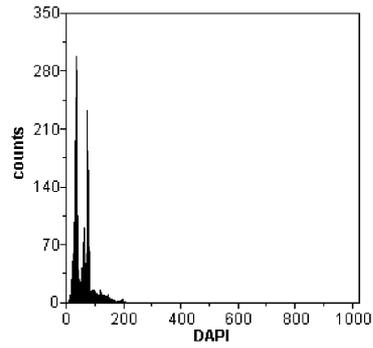
$$2C \text{ DNA (pg)} = \frac{\text{média do pico G1 da amostra} \times \text{quantidade de DNA 2C do padrão}}{\text{média do pico G1 do padrão}}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação dos valores relativos da quantidade de DNA por citometria de fluxo, usando-se o fluorocromo DAPI (4',6-diamidini-2-fenilindole), gerou histogramas com boa resolução, diferenciando as fases G0/G1, e todos com coeficiente de variação (CV) abaixo de 3,06% (média de 2,22%), tanto nas amostras de café quanto no padrão *Raphanus sativus* (Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6). O pico e os baixos valores de CV indicam que os núcleos foram isolados adequadamente e não sofreram danos significativos durante a extração, coloração e análise. Assim, o procedimento aplicado para estimar o conteúdo de DNA nuclear em amostras de café pode ser considerado apropriado. BROWN et al. (1991) afirmaram que CVs entre 1 e 2% são muito bons e, segundo DOLEŽEL (1997), CV entre 1 e 3% são tidos como de alto nível de resolução para estimar o conteúdo de DNA nuclear em plantas. Tipicamente, CVs de 2 a 7% são obtidos pelo procedimento de citometria de fluxo (CROS et al., 1995). O valor 2C de DNA nuclear de 28 acessos de *Coffea* está listado no Quadro 2.

CROS et al. (1995) testaram a eficiência do DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) e do IP (iodeto de propídio) na determinação do conteúdo de DNA nuclear em espécies de *Coffea* nativas da África. As médias dos valores do conteúdo de DNA, obtidas com DAPI (AT específico) e iodeto de propídio (intercalante), foram comparadas. A alta correlação constatada entre os dois

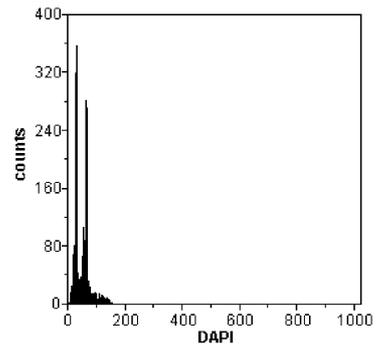
File: Ara2237.148+Raph_028 Particles: 7824 partec PAS



a)

Region	Count	%Gated	Mean-x	CV-x%	Gain
RN1	1210	15.47	26.11	2.82	340
RN2	845	10.80	64.92	1.65	340

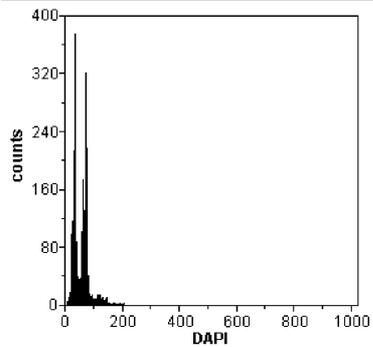
File: CatAma+Raph_034 Particles: 7151 partec PAS



b)

Region	Count	%Gated	Mean-x	CV-x%	Gain
RN1	967	13.52	24.84	2.82	340
RN2	1817	25.41	60.99	2.93	340

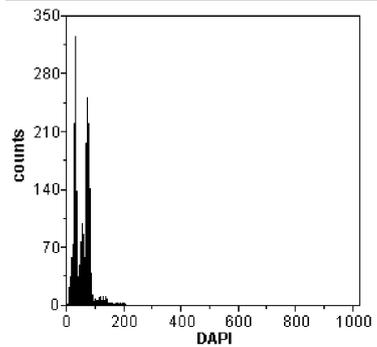
File: Acai+Raph_030 Particles: 7094 partec PAS



c)

Region	Count	%Gated	Mean-x	CV-x%	Gain
RN1	1010	14.24	25.88	2.99	340
RN2	1467	20.68	64.21	2.28	340

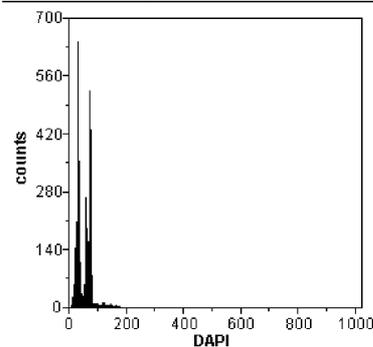
File: Airo+Raph_032 Particles: 6789 partec PAS



d)

Region	Count	%Gated	Mean-x	CV-x%	Gain
RN1	656	9.66	25.39	1.69	340
RN2	1220	17.97	64.09	2.27	340

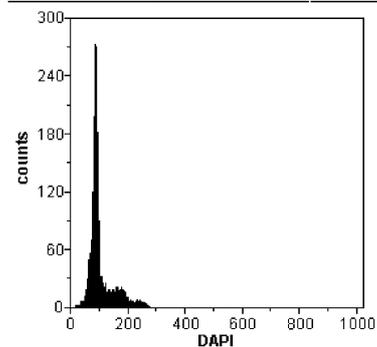
File: Chin112+Raph_011 Particles: 10111 partec PAS



e)

Region	Count	%Gated	Mean-x	CV-x%	Gain
RN1	2044	20.22	27.52	2.63	340
RN2	2756	27.26	68.95	2.33	340

File: CatAm+CatVer_052 Particles: 9818 partec PAS



f)

Region	Count	%Gated	Mean-x	CV-x%	Gain
RN1	1260	12.83	86.45	1.65	375
RN2	977	9.95	88.18	1.22	375

Figura 1 – Continua.

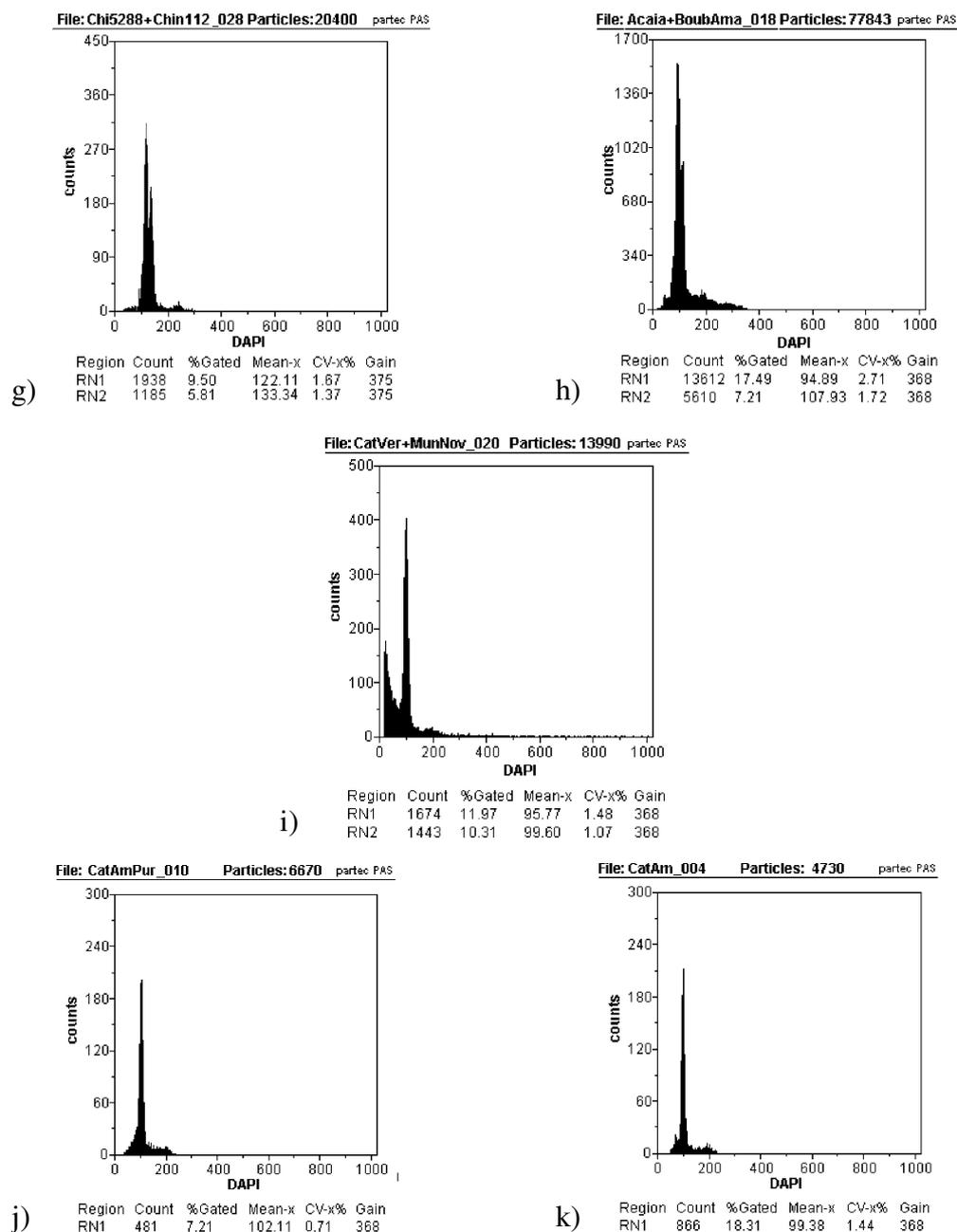


Figura 1 – Histogramas dos acessos de *Coffea arabica* gerados usando *Raphanus sativus* como padrão interno (a-e): Catuaí Vermelho IAC 15 (a), Catuaí Amarelo IAC 44 (b), Acaia (c), Airi (d) e Típica (e); Histogramas gerados empregando amostras de café como padrão de calibração, com valores de DNA determinados por *Raphanus sativus* (f-i): Catuaí Vermelho IAC 44 com Catuaí Amarelo IAC 30 como padrão interno (f); Arábica ‘5288’ com Típica 112, como padrão interno (g); Bourbon Amarelo UFV 535 com Acaia como padrão interno (h) e Mundo Novo com Catuaí Vermelho IAC 44 como padrão interno (i); e Histogramas utilizando padrão externo como padrão de calibração (j-k): Catuaí Amarelo Purpuracens (j) usando Catuaí Amarelo IAC 30 (k) como padrão externo.

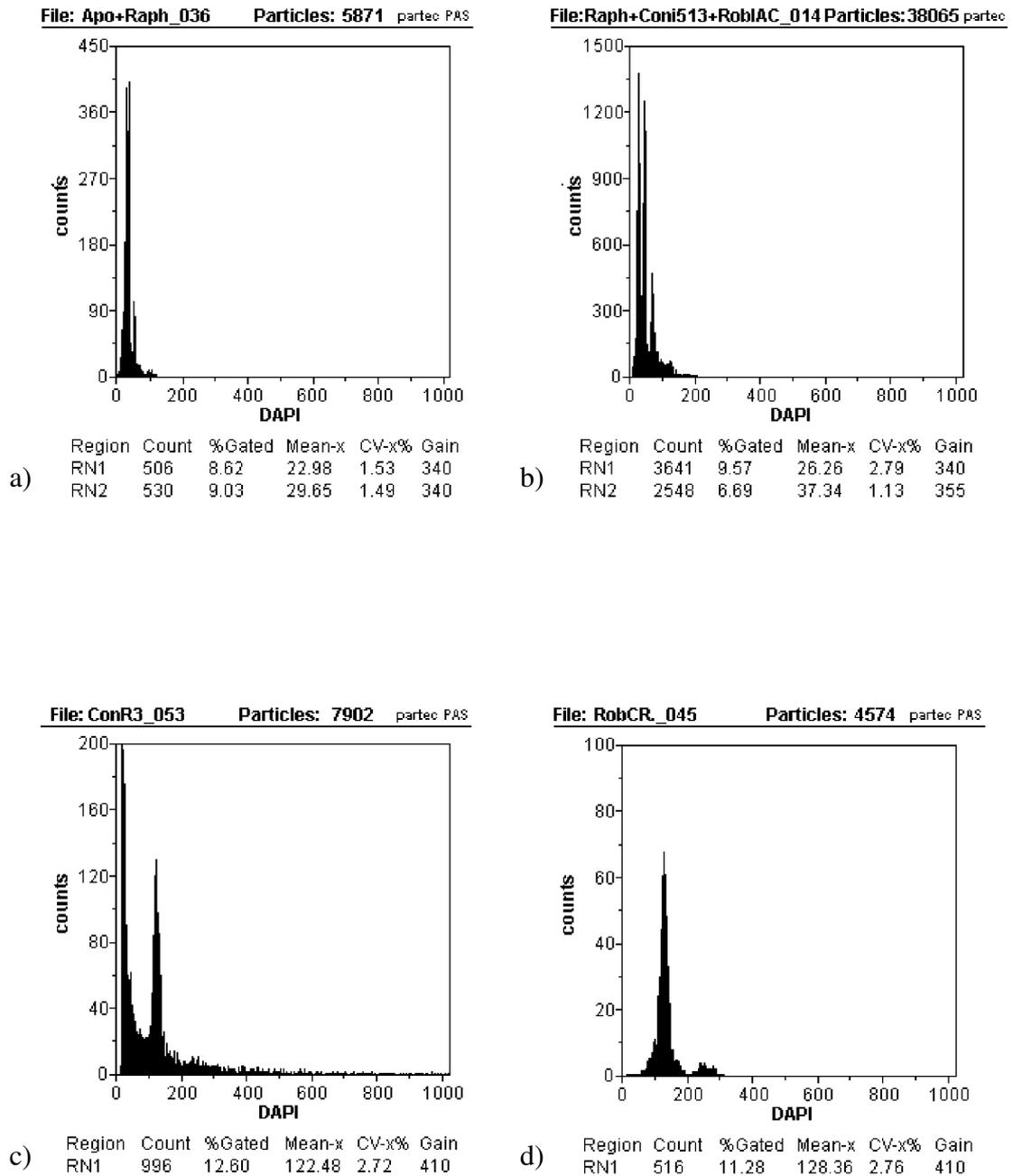


Figura 2 – Histogramas de acessos de *Coffea canephora* gerados usando *Raphanus sativus* como padrão interno (a-b): Apoatã IAC 2258 (a), Conillon UFV 513 e Robusta IAC 1651-15 (b); Histogramas utilizando padrão externo como padrão de calibração (c-d): Conillon R3 empregando Conillon UFV 513 como padrão externo (c); e Robusta T3581 usando Robusta IAC 1651-15 como padrão externo (d).

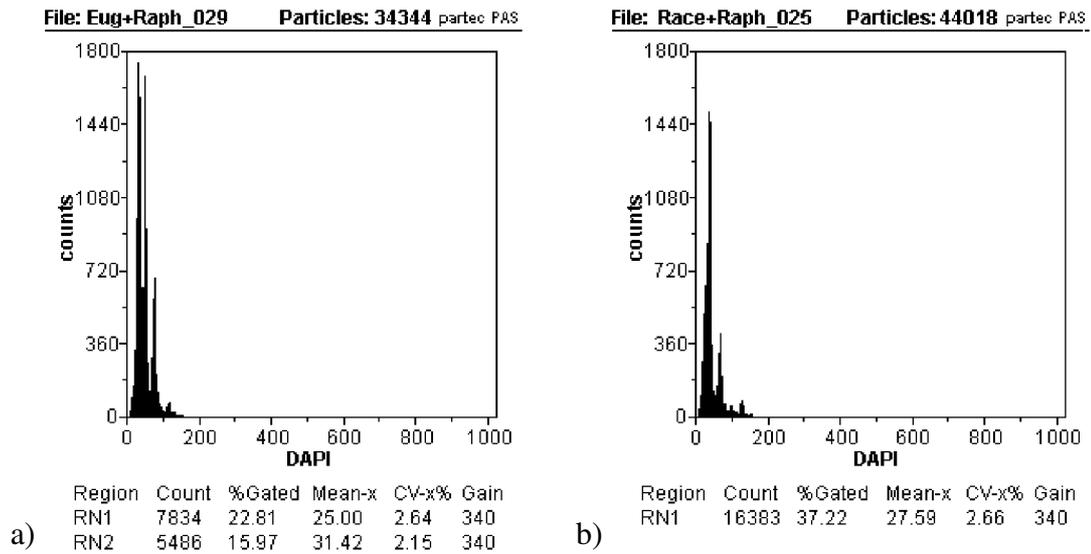


Figura 3 – Histogramas de *Coffea eugenioides* e *Coffea racemosa* gerados usando *Raphanus sativus* como padrão interno (a-b), respectivamente.

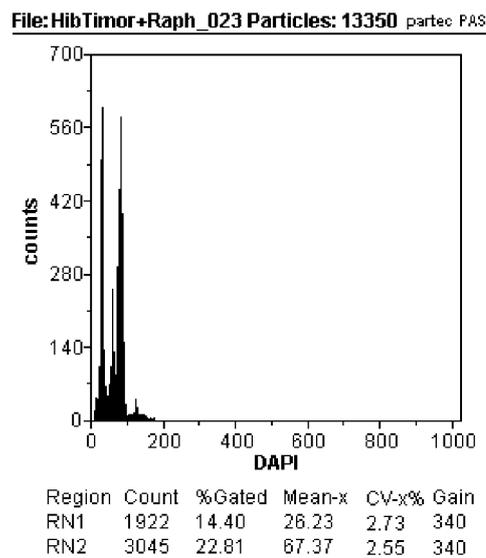


Figura 4 – Histograma de Híbrido de Timor gerado usando *Raphanus sativus* como padrão interno de calibração.

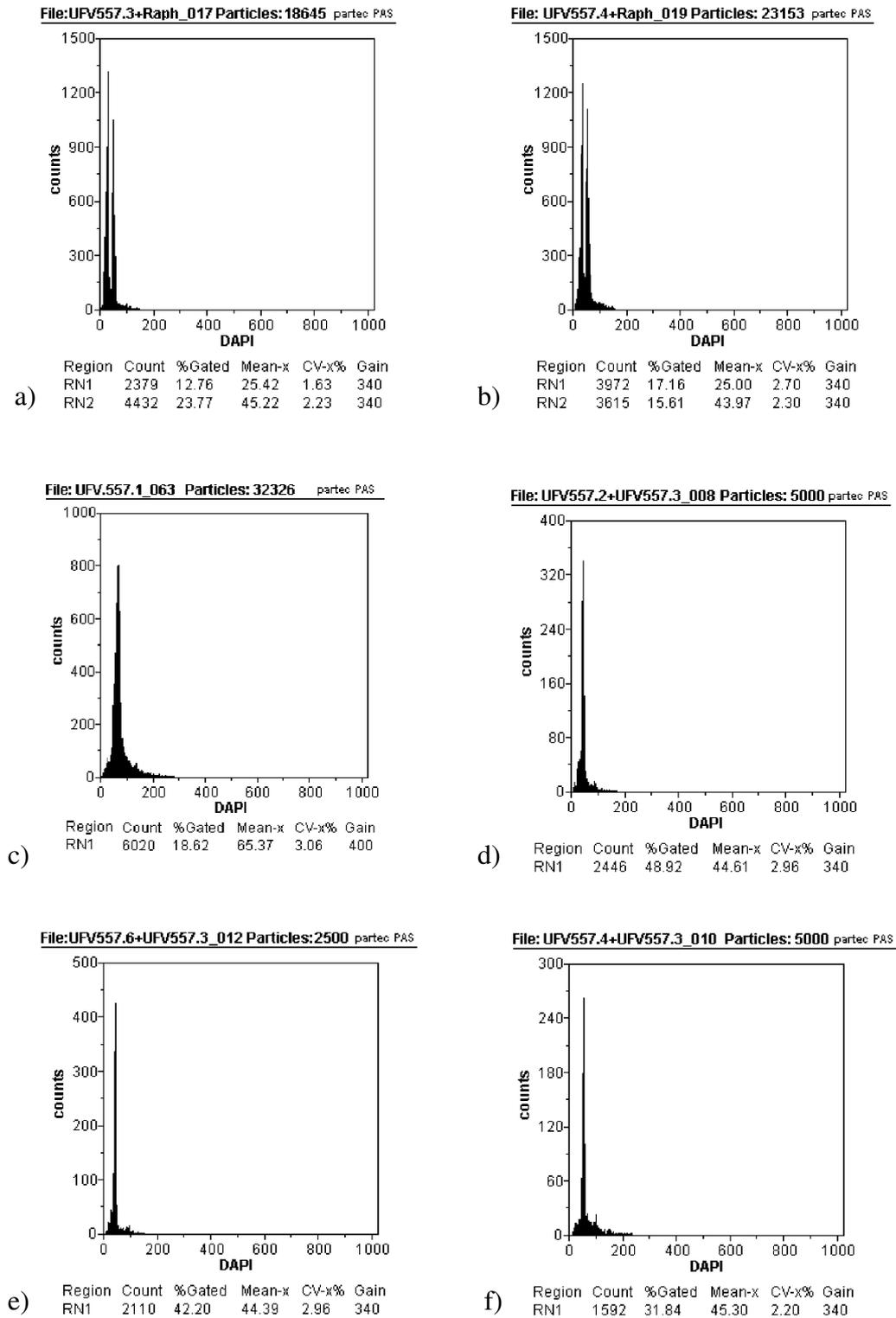


Figura 5 – Histogramas de UFV 557.3 (a) e UFV.4 (b) gerados com o uso de *Raphanus sativus* como padrão interno; Histograma de UFV 557.1 (c) utilizando-se UFV 557.6 como padrão externo; Histogramas de UFV 557.2 (d) e UFV 557.6 (e) gerados usando UFV 557.3 como padrão interno; e Histogramas de UFV 557.3 e UFV 557.4 (f) lidos simultaneamente.

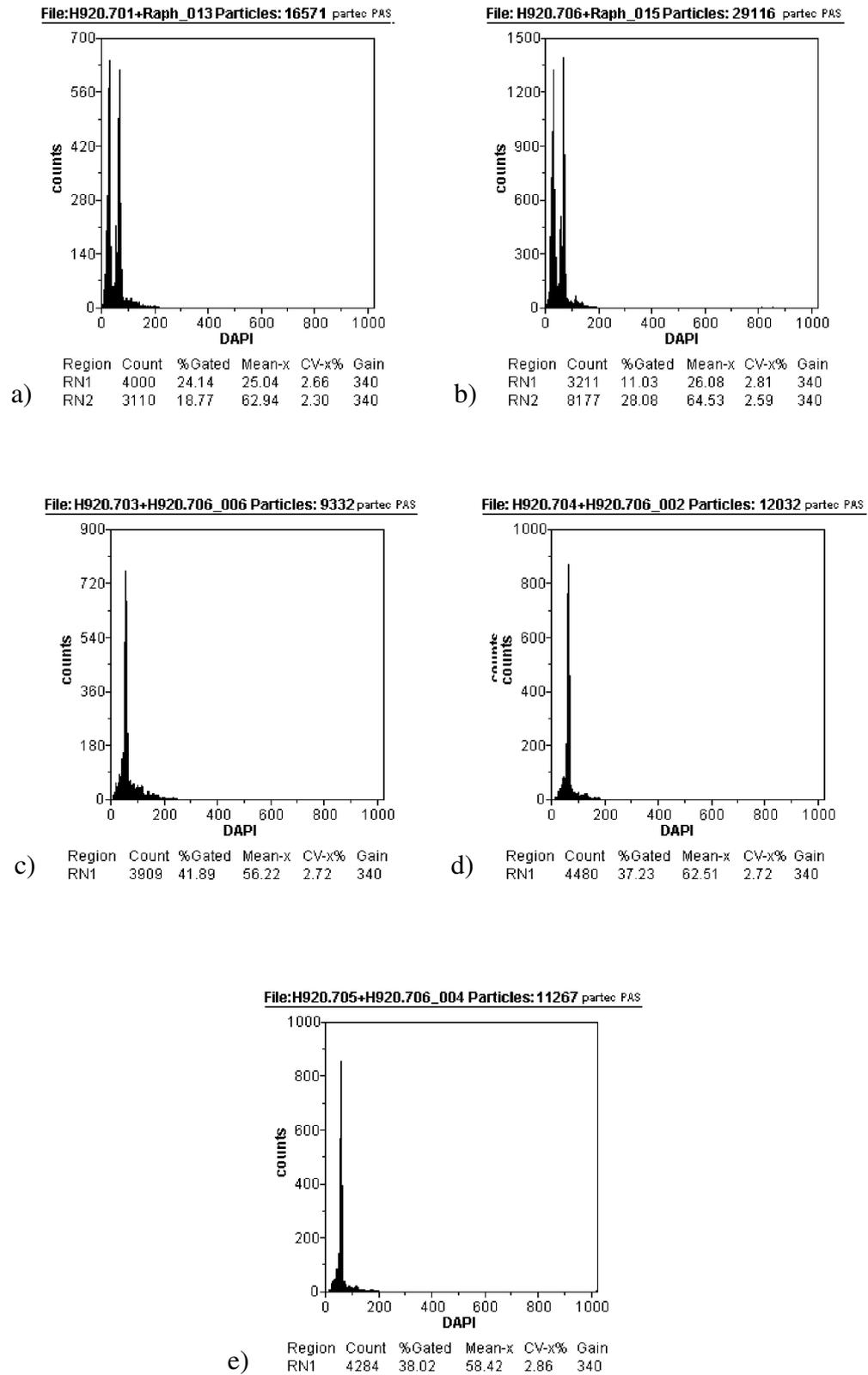


Figura 6 – Histogramas de UFV H920.1 (a) e UFV H920.6 (b) gerados usando *Raphanus sativus* como padrão interno de calibração; e Histogramas de UFV H920.3 (c), UFV H920.4 (d) e UFV H920.5 (e) gerados utilizando UFV H920.6 como padrão interno.

Quadro 2 – Acessos de *Coffea* analisados quanto ao conteúdo de DNA por citometria de fluxo

Espécies	Acessos	Nível de Ploidia	Conteúdo de DNA (pg)	CV%
<i>Coffea racemosa</i>	UFV 545 cova 28	2x	1,11	2,66
<i>Coffea eugenioides</i>	<i>C.eugenioides</i> - (IAC)	2x	1,40	2,15
<i>Coffea canephora</i>	cv. Conilon UFV 513 cova 65 - (M)	2x	1,57	1,13
	cv. Apoatã IAC 2258 cova 01	2x	1,43	1,49
	cv. Robusta IAC 1652-15 cova 01	2x	1,58	1,13
	cv. Robusta T3581 - (UFV)	2x	1,61	2,76
	cv. Conillon R3 cova 01 - (UFV)	2x	1,60	2,72
<i>Coffea arabica</i>	cv. Catuaí Vermelho IAC 15 (UFV 2237 cova 148 EL7)	4x	2,76	1,65
	cv. Acaiaí Cerrado MG 1474 (1150.489 EL8) cova 792 - (UFV)	4x	2,74	2,28
	cv. Airi UFV 3095 cova 145 (seleção em San Ramon)	4x	2,80	2,27
	cv. Bourbon Amarelo cova 146 - (China)	4x	2,40	2,71
	cv. Catuaí Amarelo IAC 30 (UFV 2143) cova 66 (Caturra Amarelo x Mundo Novo)	4x	2,73	2,93
	cv. Catuaí Vermelho IAC 44 (UFV 2144) cova 69 (Caturra Amarelo x Mundo Novo)	4x	2,78	1,22
	cv. Mundo Novo IAC 376-4-32 (UFV 2150) cova 39 (Bourbon Vermelho x Sumatra)	4x	2,89	1,07
	cv. Catuaí Amarelo Purpuracens (UFV 4072) cova 01 (mutação em Catuaí Amarelo)	4x	2,81	0,71
	Arábica 5288 cova 01 - (China)	4x	3,04	1,37
	cv. Típica cova 112 - (China)	4x	2,78	2,33
	Híbridos	Híbrido de Timor (UFV 447-06) <i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>	4x	2,85
UFV 557-1 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)		-	1,97	3,06
UFV 557-2 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)		-	1,97	2,96
UFV 557-3 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)		-	1,97	2,23
UFV 557-4 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)		-	1,95	2,30
UFV 557-6 (<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>)		-	1,97	2,96
H920.1 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3		-	2,79	2,66
H920.3 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3		-	2,75	2,72
H920.4 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3		-	2,75	2,72
H920.5 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3		-	2,75	2,86
H920.6 (UFV 2237.148. EL8) x UFV 557-3		-	2,75	2,59

UFV – Universidade Federal de Viçosa, T – Turrialba (Costa Rica), IAC – Instituto Agrônomo de Campinas (Brasil), China – Introduzido da China e M – Marilândia, MG.

fluorocromos indica que a percentagem de AT, entre as espécies de café, não diferiu significativamente. Tais resultados evidenciam que o conteúdo de DNA nuclear, em amostras pertencentes aos grupos representativos das espécies de *Coffea*, pode ser eficientemente estimado usando o DAPI (CROS et al., 1995). Em outras culturas, RAIBURN et al. (1989), BARANYI e GREILHUBER (1996) e BUITENDIJK et al. (1997) constataram alta eficiência e sensibilidade do corante DAPI para mensurar o tamanho do genoma em plantas; em termos de fluorescência, o DAPI mostrou-se superior ao mitramicina e similar ao iodeto de propídio (IP) e brometo de etídio (BE), e histogramas gerados usando DAPI apresentaram CVs mais baixos, em comparação com esses fluorocromos citados.

3.1. Variação do conteúdo de DNA intra-específico

Entre os acessos de *C. arabica*, a citometria de fluxo revelou a ocorrência de variação de 2,40 pg (cv. Bourbon amarelo) a 3,04 pg (Arábica 5288, introduzido da China) (Quadro 2 e Figura 8), uma diferença de 0,64 pg = 26,67% no conteúdo de DNA, dentro dessa espécie (Quadro 3). Nos acessos de *Coffea canephora* ocorreu uma variação de 1,43 pg (cv. Apoatã) a 1,61 pg (cv. Robusta, introduzido de Portugal) (Quadro 2 e Figura 9), o que representa uma diferença intra-específica de 0,18 pg = 12,59% no valor 2C de DNA (Quadro 4). Nas Figuras 2 e 3, mostram-se histogramas obtidos para os acessos dessas duas espécies. MARIE e BROWN (1993) reportaram um conteúdo de DNA de 1,61 pg por núcleo, para um genótipo de *C. canephora*, o qual, até então, tinha sido o único com valor avaliado. Os resultados deste estudo, com exceção do Arábica 5288, são consistentes com dados da literatura, uma vez que variação intra-específica no conteúdo de DNA nuclear de 2,30 a 2,72 pg em *C. arabica* e 1,18 a 1,61 pg em *C. canephora* foi estimado por CROS et al. (1994) e de 2,61 a 2,84 pg em *C. arabica* e de 1,54 a 1,70 pg em *C. canephora* foi constatado por CROS et al. (1995).

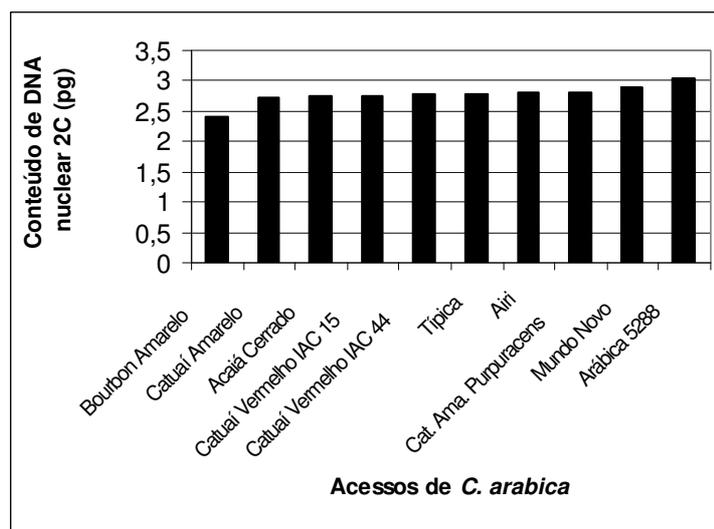


Figura 8 – Comparação do conteúdo de DNA nuclear entre acessos de *Coffea arabica*, obtidos por citometria de fluxo.

Quadro 3 – Diferença em pg da quantidade de DNA entre os acessos de *C. arabica*

	1: 2,40 pg	2: 2,73 pg	3: 2,74 pg	4: 2,76 pg	5: 2,78 pg	6: 2,78 pg	7: 2,80 pg	8: 2,81 pg	9: 2,89 pg	10: 3,04 pg
1: 2,40 pg	0	-0,33	-0,34	-0,36	-0,38	-0,38	-0,40	-0,41	-0,49	-0,64
2: 2,73 pg	+0,33	0	-0,01	-0,03	-0,05	-0,05	-0,07	-0,08	-0,16	-0,31
3: 2,74 pg	+0,34	+0,01	0	-0,02	-0,04	-0,04	-0,06	-0,07	-0,15	-0,30
4: 2,76 pg	+0,36	+0,03	0,02	0	-0,02	-0,02	-0,04	-0,05	-0,13	-0,28
5: 2,78 pg	+0,38	+0,05	+0,04	+0,02	0	0	-0,02	-0,03	-0,11	-0,26
6: 2,78 pg	+0,38	+0,05	+0,04	+0,02	0	0	-0,02	-0,03	-0,11	-0,26
7: 2,80 pg	+0,40	+0,07	+0,06	+0,04	+0,02	+0,02	0	-0,01	-0,09	-0,24
8: 2,81 pg	+0,41	+0,08	+0,07	+0,05	+0,03	+0,03	+0,01	0	-0,08	-0,23
9: 2,89 pg	+0,49	+0,16	+0,15	+0,13	+0,11	+0,11	+0,09	+0,08	0	-0,15
10: 3,04 pg	+0,64	+0,31	+0,32	+0,28	+0,26	+0,26	+0,24	+0,23	+0,15	0

1. Bourbon Amarelo: 2,40 pg; 2. Catuaí Amarelo: 2,73 pg; 3. Acaia Cerrado: 2,74 pg; 4. Catuaí Vermelho IAC15: 2,76 pg; 5. Catuaí Vermelho IAC44: 2,78 pg; 6. Típica: 2,78 pg; 7. Airi: 2,80 pg; 8. Catuaí Amarelo Purpuracens: 2,81 pg; 9. Mundo Novo: 2,89 pg; e 10. Arábica 5288: 3:04 pg.

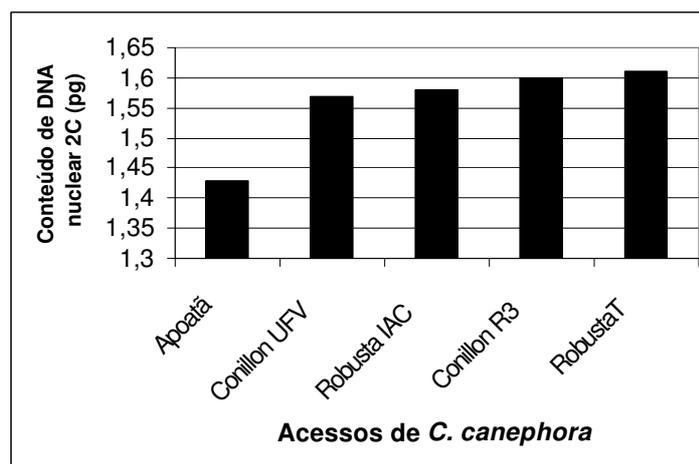


Figura 9 – Comparação do conteúdo de DNA nuclear entre acessos de *Coffea canephora*, obtidos por citometria de fluxo.

Quadro 4 – Diferença em pg da quantidade de DNA entre os acessos de *C. canephora*

	1: 1,43 pg	2: 1,57 pg	3: 1,58 pg	4: 1,60 pg	5: 1,61 pg
1: 1,43 pg	0	-0,14	-0,15	-0,17	-0,18
2: 1,57 pg	+0,14	0	-0,01	-0,03	-0,04
3: 1,58 pg	+0,15	+0,01	0	-0,02	-0,03
4: 1,60 pg	+0,17	+0,03	+0,02	0	-0,01
5: 1,61 pg	+0,18	+0,04	+0,03	+0,01	0

1. Apatã: 1,43 pg; 2. Conillon UFV: 1,57 pg; 3. Robusta IAC: 1,58 pg; 4. Conillon R3: 1,60 pg; e 5. Robusta T3581: 1,61 pg.

Numerosos estudos descreveram uma considerável variação intra-específica no tamanho do genoma de plantas, e, em comparação com outras espécies de angiospermas, como *Helianthus annuus* L., 64%; *Bulbine bulbosa* L., 116%; ou *Collinsia verna* Nutt., 288% (BENNETT, 1985), a variação intra-específica, em espécies de *Coffea*, pode ser considerada pequena (12,59% *C. canephora* e 26,67% *C. arabica*). Pequenas variações no DNA intra-específico também foram encontradas em *Salix* (6 a 11%), o que contrasta com a alta variabilidade morfológica inerente a essa espécie (THIBAUT, 1998). Em

Petunia sensu, essa variação foi de 31% (2C-2,6 a 3,41 pg) (MISHIBA et al., 2000). Também em *Sesleria albicans*, a variação observada foi de apenas 5,4% (LYSÁK et al., 2000). Esses resultados indicam a confiabilidade do método para detectar pequenas diferenças no conteúdo de DNA.

Em reavaliação de alguns acessos de *Glycine max*, OBERMAYER e GREILHUBER (1999) não confirmaram a variação previamente estimada em 1,12 vez, no tamanho do genoma. GREILHUBER (1998) relataram que a variação intra-específica no conteúdo de DNA pode ser, em parte, metodológica, uma vez que muitos valores são obtidos em diferentes laboratórios; e, segundo DOLEŽEL et al. (1998), também pode, provavelmente, ser explicada pelo uso de diferentes instrumentos e padrões internos. Porém, a variação intra-específica biológica pode ser claramente demonstrada em muitas espécies (OHRI, 1998). Entre os muitos processos moleculares que podem ser considerados, os mais substanciais têm a possibilidade de envolver ampliações ou perda de heterocromatina, processos que finalmente resultam em especiação (MARTEL et al., 1997).

3.2. Variação do conteúdo de DNA interespecífico

Os histogramas obtidos para as quatro espécies, *C. arabica* (Figura 2), *C. canephora* (Figura 3), *C. eugenioides* (Figura 4a) e *C. racemosa* (Figura 4b), apresentaram valores que evidenciaram diferentes quantidades de DNA nessas espécies. Entre as espécies diplóides, *C. racemosa* apresentou conteúdo de DNA de 1,11 pg; *C. eugenioides*, 1,40 pg; e *C. canephora* variou de 1,43 (cv. Apatã) a 1,61 pg (cv. Robusta T3581) (Figura 10 e Quadro 5). Esses valores representam uma variação, na quantidade de DNA nuclear, entre *C. canephora* e *C. eugenioides* de 0,021%, entre *C. eugenioides* e *C. racemosa* de 26,13% e entre *C. canephora* e *C. racemosa* de 28,83%, considerando-se o cv. Apatã, que apresentou o menor valor. Essa diferença pode chegar a 15%, 26,13% e 45,05%, respectivamente, considerando-se o cv. Robusta de maior valor, com 1,61 pg de DNA. No tetraplóide *Coffea arabica*, os valores encontrados foram entre 2,40 pg

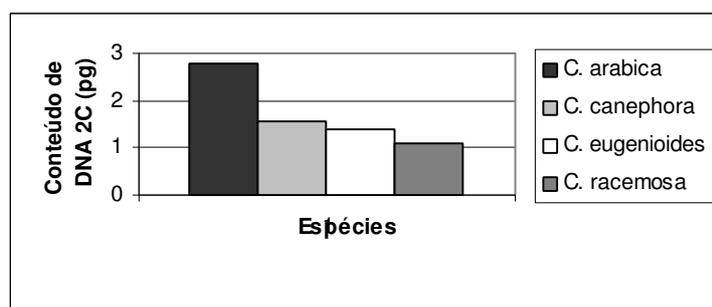


Figura 10 – Comparação dos conteúdos de DNA nuclear entre quatro espécies de *Coffea*, obtidos por citometria de fluxo.

Quadro 5 – Diferença em pg da quantidade de DNA entre espécies de *Coffea*

	1. 2,40 - 3,04 pg	2. 1,43 - 1,61 pg	3. 1,40 pg	4. 1,11 pg
1. 2,40 pg	0	-0,64	+0,97	+0,79
3,04 pg	+0,64	0	+1,61	+1,43
2. 1,43 pg	-0,97	-1,61	0	-0,18
1,61 pg	-0,79	-1,43	+0,18	0
3. 1,40 pg	-1,0	-1,64	-0,03	-0,21
4. 1,11 pg	-1,29	-1,93	-0,32	-0,50

1. *C. arabica* (2,40 a 3,04 pg), 2. *C. canephora* (1,43 a 1,61 pg), 3. *C. eugenioides*: 1,40 pg e 4. *C. racemosa*: 1,11 pg.

(Bourbon Amarelo) e 3,04 pg (Arábica 5288) (Figura 10), representando (1,49 a 2,13 vezes) o valor do tamanho do genoma de *C. canephora* (1,71 a 2,17 vezes) o tamanho de *C. eugenioides* e (2,16 a 2,74 vezes) o do menor diplóide *C. racemosa*. Os valores de DNA nuclear para *Coffea* foram consistentes com os números de cromossomos relatados, confirmando os níveis de ploidia. Diferenças entre esses valores podem ser devidas à discrepância entre o tamanho dos genomas, atribuídas a escalas evolutivas dessas espécies, principalmente as que apresentam os maiores e menores valores de DNA. Entretanto, outras variações

nos valores podem não estar relacionadas apenas com a aparente complexidade dos genomas e sim com a existência de seqüências repetitivas de DNA (CECCARELLI et al., 1995).

PRICE (1988) revelou que diferenças de duas a três vezes são comuns entre espécies diplóides pertencentes a um mesmo gênero. Em *Alstroemeria* ($2n=2x=16$), o conteúdo de DNA total variou mais que duas vezes entre espécies, de 36,5 pg a 78,9 pg (2,16 vezes) (BUITENDIJK et al., 1997). Já no gênero *Salix* a variação foi de 0,76 a 0,98 pg (1,29 vez), e valores tetraplóides variaram de 1,62 a 1,80 (1,11 vez); entre Mosses (Bryatae), essa variação chegou a 12 vezes, de 0,174 a 2,16 pg (VOGLMAYR, 2000).

Os valores de DNA das espécies de *Coffea* foram relativamente menores do que os de outras angiospermas, como *Viscum album* (152 pg), *Allium cepa* (32,7 pg) ou *Pinus carabeae* (45,6 pg), e similares a outras espécies, como *Beta vulgaris* (1,65 pg), *Cucumis sativus* (1,77 pg), *Acacia heterophylla* (1,60 pg), *Dioscorea alata* (1,47 pg), *Vigne unguiculata* (1,20 pg) e *Lycopersicum esculentum* (2,01 pg) (MARIE e BROW, 1993).

Os resultados encontrados concordam com aqueles obtidos por CROS et al. (1994, 1995), que observaram variações intra e interespecíficas em espécies de *Coffea* coletadas em diferentes regiões da África (Quadro 6 e Figura 11). *C. arabica* apresentou diferenças de 2,30 a 2,72 pg, assim como *C. canephora* (1,18 a 1,61 pg), *C. eugenoides* (1,27 a 1,43 pg) e *C. racemosa* (0,87 a 1,08 pg) (CROS et al., 1994). Nos estudos conduzidos por CROS et al. (1995), *C. arabica* apresentou $2,61 \pm 0,23$ pg, *C. canephora* $1,54 \pm 0,22$ pg, *C. eugenoides* $1,39 \pm 0,12$ pg e *C. racemosa* $0,95 \pm 0,13$ pg.

Embora os resultados observados para valores de DNA nuclear estejam dentro dos limites verificados por CROS et al. (1994) e CROS et al. (1995), as metodologias empregadas por esses autores foram diferentes daquela utilizada neste estudo, adaptada de DOLEŽEL e GÖHDE (1995). CROS et al. (1994) usaram um protocolo em que folhas armazenadas em nitrogênio líquido foram misturadas a um tampão, filtradas, centrifugadas e incubadas, sendo o mesmo procedimento repetido por mais duas vezes, utilizando dois tampões distintos, e,

Quadro 6 – Comparação entre os resultados encontrados e aqueles relatados na literatura quanto ao conteúdo de DNA nuclear de quatro espécies de *Coffea*, obtidos por citometria de fluxo

	CROS et al. (1994)*	CROS et al. (1995) * / **	Presente Estudo***
Fluorocromo	PI	PI e DAPI	
Espécies	Conteúdo de DNA Nuclear (pg)		
<i>C. arabica</i>	2,30 a 2,72 (2,47)	2,61 ± 0,23	2,40 a 3,04 (2,77)
<i>C. canephora</i>	1,18 a 1,61 (1,46)	1,54 ± 0,22	1,43 a 1,61 (1,56)
<i>C. eugenioides</i>	1,27 a 1,43 (1,36)	1,39 ± 0,12	1,40
<i>C. racemosa</i>	0,87 a 1,08 (0,93)	0,95 ± 0,13	1,11

* Protocolo empregado por CROS et al. (1994): folhas armazenadas em nitrogênio líquido a - 80 °C/fragmentação das folhas em tampão A (0,4 M de sacarose; 0,05 M de Tris; 2 mM de CaCl₂; 0,4% de β-mercaptoetanol)/filtragem em telas de 50 μm/centrifugação a 3.000 x g - 4 °C - 15 min/ressuspensão do *pellet* em tampão B (0,25 M de sacarose; 0,05 M de Tris, 2 mM CaCl₂)/centrifugação a 3.000 x g - 4 °C - 15 min/ressuspensão em 5 ml de tampão B e 20 ml de tampão C (2 M de sacarose; 0,05 M de Tris; 2 mM de CaCl₂/centrifugação a 16.000 X g e 4 °C por 45 min/último *pellet* armazenado a - 80 °C por 1 semana/adição de 500 μl de tampão fosfato salino/adição de 160 μg/ml de PI (iodeto de propídio) e incubação por 5 minutos.

** Para coloração com PI, o protocolo foi adaptado de Aramuganathan e Earle (1991a), citados por CROS et al. (1995) e é semelhante ao mencionado acima. Para coloração com DAPI, o protocolo foi adaptado de GALBRAITH et al. (1983): fragmentação das folhas em tampão comercial Chemunex R09-220-500/coloração de suspensão de células em 10 μg/ml de DAPI/incubação por 20 minutos.

*** Protocolo adaptado de DOLEŽEL e GÖHDE, 1995: fragmentação das folhas em tampão de extração (0,1 M de ácido cítrico e 0,5% de Tween 20)/filtragem em telas de 30 μm/centrifugação a 1.200 rpm, durante 5 minutos/remoção do sobrenadante/ressuspensão do *pellet*/incubação/coloração com DAPI (15 mM)/incubação por 10 minutos. Para mais detalhes, ver o item 2 (preparação nuclear).

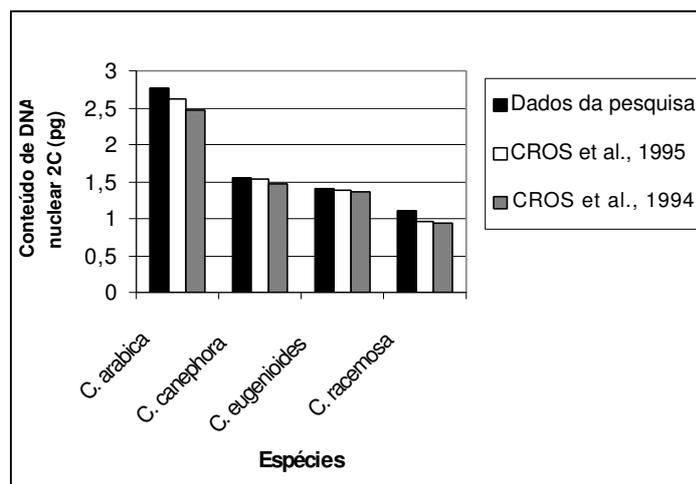


Figura 11 – Comparação dos conteúdos de DNA nuclear entre quatro espécies de *Coffea*, obtidos por citometria de fluxo neste estudo e na literatura.

finalmente, coradas com iodeto de propídio; nesse procedimento, as células analisadas foram fixadas. CROS et al. (1995) analisaram amostras de folhas de café utilizando um protocolo semelhante ao citado anteriormente (usando o fluorocromo IP) e outro adaptado de GALBRAITH et al. (1983), o qual envolve a fragmentação das folhas em tampão, coloração com DAPI, incubação e filtragem. É possível, então, deduzir que diferentes metodologias podem ser empregadas, com eficiência, na estimação do conteúdo de DNA em *Coffea*, devendo-se, portanto, ser preferida aquela que envolva tempo e custo menores.

3.3. Investigação de híbridos

Os valores de DNA, dos supostos híbridos interespecíficos UFV 557.3 (1,97 pg) e UFV 557.4 (1,95 pg), foram previamente estabelecidos, usando o *Raphanus sativus* como padrão de calibração (Figura 6ab), respectivamente. Nos histogramas (Figura 6f), em que UFV 557.3 e UFV 557.4 foram processadas simultaneamente, percebe-se que a pequena diferença de 1,95 e 1,97 pg é desprezível e não-detectável. O valor para UFV 557.1 (1,97 pg) foi estimado usando UFV 557.6 como padrão externo (Figura 6c). Os valores para UFV 557.2

(1,97 pg) e UFV 557.6 (1,97 pg) foram estimados utilizando o UFV 557.3 como referência (Figura 6de), respectivamente. Os histogramas entre essas plantas formaram um único pico, o que reflete a similaridade do conteúdo de DNA entre elas, não permitindo constatar diferenças separáveis, o que levou à estimativa do mesmo conteúdo de DNA para estas amostras.

Os valores de DNA nuclear encontrados nas plantas UFV557.1, UFV557.2, UFV557.3, UFV557.4 e UFV557.6 (1,95-1,97 pg) foram intermediários aos valores de *C. racemosa* (2x=1,11 pg) e *C. arabica* (4x=média de 2,77 pg) (Quadro 2 e Figura 12). Considerando que *C. racemosa* é a planta-mãe que originou as sementes UFV557 e que *C. arabica* é a única espécie tetraplóide relatada e ocorria nas proximidades de *C. racemosa*, os valores de DNA fornecem subsídios que comprovam a natureza triplóide desses híbridos. Pode-se, portanto, afirmar que as espécies envolvidas na origem desses híbridos são *C. racemosa* e *C. arabica*, bem como confirmar a sensibilidade do aparelho para o monitoramento e identificação de híbridos interespecíficos entre espécies de *Coffea*. Essas plantas são híbridos certificados com base em seu conteúdo de DNA triplóide, por citometria de fluxo.

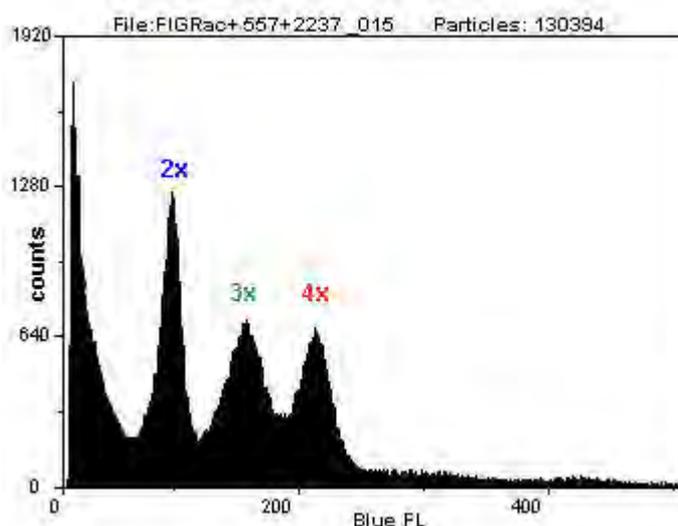


Figura 12 – Histogramas dos parentais *C. racemosa* (2x) e *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho UFV2237 (4x) e do híbrido UFV 557.3 (3x).

Vários híbridos naturais entre *C. arabica* e outras espécies diplóides de *Coffea* foram relatados, como são em particular os híbridos entre Kalimas e Kawisari (*arabica* x *liberica*) e Bogor Prada (*arabica* x *canephora*), encontrados na Indonésia e sem nenhuma combinação de importância econômica (CARVALHO e MONACO, 1968). Estudos realizados no Brasil indicaram que híbridos entre *C. arabica* e as espécies diplóides *C. canephora*, *C. dewevrei* e *C. liberica* são triplóides quase que totalmente estéreis. Isso acontece devido às irregularidades que ocorrem durante a meiose. A duplicação artificial dos cromossomos do híbrido entre *C. arabica* e *C. canephora* ($2n=66$) tornou-os férteis (MENDES, 1947). Permaneceu alguma esterilidade devido à sua constituição citológica, provavelmente em razão da similaridade entre alguns cromossomos dessas espécies.

Em estudo citológico de um híbrido triplóide entre *C. arabica* e *C. canephora* ($2n=33$), MENDES (1951) constatou que gametas com poucos cromossomos eram estéreis, os quais apresentaram cerca de 22 cromossomos; embora mais raros, eram férteis e gametas com 33 cromossomos, bastante raros. Assim, pode-se deduzir que, teoricamente, é possível obter retrocruzamentos que tragam em sua constituição um agrupamento de cromossomos onde predominam os genes que determinam as boas qualidades de *C. arabica* e existem alguns genes desejáveis da outra espécie. Portanto, híbridos triplóides constituem uma fonte permanente de novas combinações genéticas, cujas possibilidades e importância, no melhoramento do café, podem ser inúmeras.

As hibridações conduzidas entre *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho (IAC 15) x UFV 557.3 (*C. racemosa* x *C. arabica*) resultaram em plantas híbridas designadas H920.1, H920.3, H920.4, H920.5 e H920.6 (histogramas representados nas Figura 7a-e), cujos valores de DNA nuclear foram de 2,79 pg; 2,75 pg; 2,75 pg; 2,75 pg; e 2,75 pg, respectivamente (Quadro 2 e Figura 13). Esses valores estão dentro da faixa de DNA estimado para *C. arabica*, o que pode indicar que combinações cromossômicas que resultam em tetraplóides podem ter sido mais viáveis nesse tipo de cruzamento e favorecido a sobrevivência e desenvolvimento de plantas com esse nível de ploidia ou com

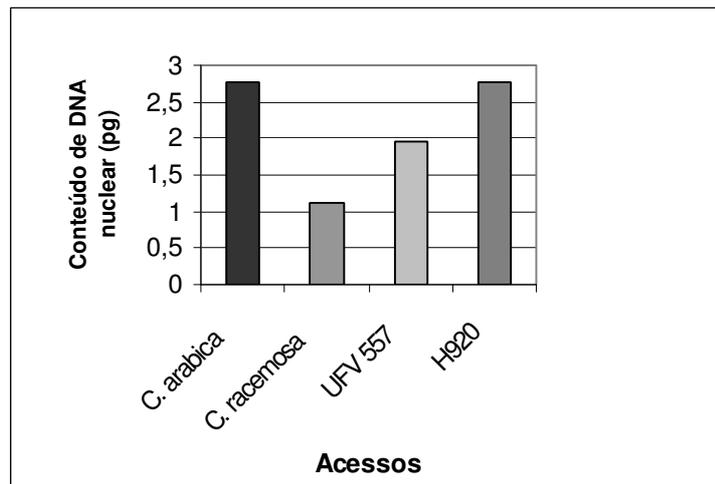


Figura 13 – Comparação do conteúdo de DNA nuclear entre *Coffea arabica* e *C. racemosa* e os híbridos UFV 557 e H920, obtidos por citometria de fluxo.

número de cromossomos próximos. A quantidade de DNA nuclear do H920.1 (Figura 7a) e H920.6 (Figura 7b) foi estimada usando o *Raphanus sativus* como padrão de calibração. Os valores para H920.3 (Figura 7c), H920.4 (Figura 7d) e H920.5 (Figura 7e) foram estabelecidos utilizando o H920.6 como referência. Como nenhuma diferença entre essas plantas foi detectada, uma vez que apenas um único pico foi formado quando os núcleos das duas plantas foram analisados conjuntamente, um mesmo valor de quantidade de DNA nuclear foi estabelecido para esses híbridos.

Em retrocruzamentos entre o híbrido triplóide (*C. arabica* e *C. canephora*) $2n=33$ e *C. arabica*, foram obtidos aneuplóides e também, principalmente, tetraplóides ($2n=44$) e pentaplóides ($2n=55$). Alguns híbridos mostraram maior tendência em formar plantas tetraplóides, enquanto outros formaram pentaplóides (MENDES, 1951). Admitindo esses resultados, pode-se supor que, nos híbridos H920 estudados, tendência semelhante à relatada na literatura, para a formação de plantas tetraplóides, possa ter ocorrido.

No Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*), um genoma de 2,85 pg foi encontrado, usando como padrão de calibração *Raphanus sativus* (Quadro 2 e

Figura 5). Esse valor é pertinente ao número de cromossomos e nível de ploidia relatados para essa planta. O Híbrido de Timor é considerado um híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora* que apresenta $2n=44$ cromossomos (BETTENCOURT, 1973; RIJO, 1974). Uma vez que *C. arabica* é tetraplóide ($2n=4x=44$ cromossomos) (KRUG, 1937, 1938; MENDES, 1938; MEDINA, 1949; CONAGIN e MENDES, 1961; RIJO, 1974; SELVARAJ, 1987) e *C. canephora* é diplóide ($2n=22$ cromossomos) (KRUG, 1938; MENDES, 1938; SELVARAJ, 1987), pode-se admitir que, na origem espontânea desse híbrido ou não houve redução cromatídica na formação dos esporos que originaram os gametas ou houve duplicação cromossômica no gameta de *C. canephora*. Esse fenômeno aconteceu possivelmente, em relação a outros híbridos espontâneos entre *C. arabica* e outras espécies diplóides de *Coffea*, como são em particular os híbridos entre *C. arabica* e *C. liberica* (Índia) e o híbrido entre *C. arabica* e *C. dewevrei* (Brasil). Ferreira et al. (1971) afirmaram que o baixo teor de cafeína de algumas amostras do Híbrido de Timor valoriza extraordinariamente esse material como germoplasma básico para o melhoramento de *C. arabica* (RIJO, 1974).

A citometria de fluxo demonstrou ser um método confiável e eficiente para análise do genoma. Contudo, a habilidade do citômetro de fluxo em quantificar o conteúdo nuclear pode também ter aplicação mais atrativa se associado a estudos de divergência genética, certificação de material em banco de germoplasma, relações entre variações de conteúdo de DNA e parâmetros ambientais e, ou, características fenotípicas, podendo, dessa forma, colaborar com estudos envolvendo melhoramento de plantas. Alguns estudos correlacionando conteúdo de DNA nuclear e características agrônômicas já foram iniciados (BIRADAR et al., 1993, 1994; GREILHUBER e OBERMAYER, 1997). A confiabilidade e reprodutibilidade da análise e a relativa facilidade da preparação da amostra, além de exigir uma pequena quantidade de material vegetal, são características que tornam conveniente a utilização da citometria de fluxo no melhoramento de plantas. Nesse sentido, o monitoramento e identificação de híbridos constituem uma das aplicações que

vêm sendo exploradas (KELLER et al., 1996; BUITENDIJK et al., 1997; BARRE et al., 1998; THIBAUT, 1998). Cruzamentos interespecíficos são usados para transferir características desejáveis de uma espécie a outra, e, quando as espécies parentais diferem em seu conteúdo nuclear, o citômetro de fluxo pode detectar híbridos interespecíficos de acordo com seus valores intermediários de DNA.

Em cafeeiro, o cruzamento entre duas espécies com o mesmo número de cromossomos ($2n=22$), porém com diferente conteúdo de DNA nuclear (*C. pseudozanguebariae* $2C = 1,13$ pg e *C. liberica* var. *dewevrei* $2C = 1,42$ pg), originou híbridos com o conteúdo de DNA nuclear intermediário aos dos pais (entre 1,28 e 1,32 pg) (BARRE et al., 1998).

KELLER et al. (1996) empregaram citometria de fluxo em monitoramento de hibridações interespecíficas conduzidas em *Allium cepa*. O caráter híbrido dos regenerantes, obtidos via cultura de ovário, foi checado pelo mensuramento e comparação do conteúdo de DNA dos híbridos com os valores dos pais. Para THIBAUT (1998), a falta de distinção entre *Salix triandra* e *Salix x mollissima*, utilizando outros parâmetros, enfatizou o valor discriminativo mediante o uso de conteúdos de DNA nuclear. Também, todos os híbridos de *Salix* foram intermediários aos progenitores tanto para o tamanho do genoma quanto para o nível de ploidia.

4. CONCLUSÕES

A metodologia aplicada, envolvendo extração, coloração e análise, foi apropriada para estimar o valor 2C de DNA nuclear dos 28 acessos de *Coffea*, gerando histogramas com CV abaixo de 3,06%.

Entre os acessos de *C. arabica*, a citometria de fluxo revelou a ocorrência de variação de 2,40 pg (cv. Bourbon Amarelo) a 3,04 pg (cv. Arábica 5288), uma diferença de 0,64 pg (1,27 vez) no conteúdo de DNA, dentro dessa espécie. Nos acessos de *C. canephora* ocorreu uma variação de 1,43 a 1,61 pg, o que representa uma diferença de 0,18 pg (1,13 vez) no valor 2C de DNA.

A diferença na quantidade de DNA entre espécies diplóides foi de até 0,50 pg = 45% (*C. racemosa* 1,11 pg; *C. eugenoides* 1,40 pg; e *C. canephora* cv. Robusta 1,61 pg). Para o tetraplóide *C. arabica*, os valores encontrados de 2,40 a 3,04 pg representam 1,49 a 2,13 vezes o valor do tamanho do genoma do *C. canephora*; 1,71 a 2,17 vezes o tamanho de *C. eugenoides* e 2,16 a 2,74 vezes o do menor diplóide *C. racemosa*.

Os resultados citométricos determinaram o caráter triplóide para as plantas denominadas UFV 557.1, UFV 557.2, UFV 557.3, UFV 557.4 e UFV 557.6, indicando que esses são realmente híbridos entre *C. racemosa* e *C. arabica*, confirmando a sensibilidade do aparelho para o monitoramento e identificação de determinados híbridos interespecíficos em *Coffea*.

Híbridos resultantes do cruzamento de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho (IAC 15) com UFV 557-3 (*C. racemosa* x *C. arabica*), denominados H920.1, H920.3, H920.4, H920.5 e H920.6, apresentaram valores 2C de DNA dentro da faixa estimada para *C. arabica* (4x).

O Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*) apresentou um valor 2C de DNA pertinente ao número de cromossomos e nível de ploidia relatados para essa planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARANYI, M.; GREILHUBER, J. Flow cytometric and Feulgen Densitometric Analysis of Genome Size Variation in *Pisum*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, p. 297-307, 1996.

BARRE, P.; LAYSSAE, M.; D'HONT, A.; LOUARN, J.; CHARRIER A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Relationship between parental chromosomal contribution and nuclear DNA content in the coffee interspecific hybrid: *C. pseudozanguebariae* x *C. liberica* var *dewevrei*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 96, p. 301-305, 1998.

BENNETT, M.D. Intraspecific variation in DNA amount and the nucleotypic dimension in plant genetics. In: FREELING, M. **Plant genetics**. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. [S.l.: s.n.], 1985. v. 35, p. 283-302.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amount in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 76, p. 113-176, 1995.

BETTENCOURT, A.J. **Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timo**. Campinas, SP: Instituto Agrônômico; Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1973. 20 p. (Circular, 23).

BIRADAR, D.P.; RAYBURN, A.L. Heterosis and nuclear DNA content in maize. **Heredity**, v. 71, p. 300-304, 1993.

BIRADAR, D.P.; BULLOCK, D.G.; RAYBURN, A.L. Nuclear DNA amount, growth and yield parameters in maize. **Theor. Appl. Genet.**, v. 88, p. 557-560, 1994.

BROWN, S.C.; DEVAUX, P.; MARIE, D.; BERGOUNIOUX, C.; PETIT, P.X. Analyse de la plidie par cytométrie en flux. **Cahier no. 47. Biofutur no. 105**, p. 1-16, 1991.

BUITENDIJK, J. H.; BOON, E.; RAMANNA, M.S. Nuclear DNA content in twelve species *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. **Annals of Botany**, v. 79, p. 343-353, 1997.

CARVALHO, A.; MONACO, L.C. Relaciones geneticas de especies seleccionadas de *Coffea*. **Cafe**, v. 9, n. 4, p. 1-19, 1968.

CROS, J.; COMBES, M. C.; CHABRILLANGE, N.; DUPERRAY, C.; MONNOT DES ANGELES, A.; HAMON, S. Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (Rubiaceae): Inter- and intra-specific variation in african species. **Can. J. Bot.**, v. 73, p. 14-20, 1995.

CROS, J.; GAVALDA, M. C.; CHABRILLANGE, N.; RÉCALT, C.; DUPERRAY, C.; HAMON, S. Variation in the total Nuclear DNA content in african *Coffea* species (Rubiaceae). **Café Cacao Thé**, v. 28, n. 1, p. 3-10, 1994.

CECCARELLI, M.; MINELLI, S.; MAGGINI, F.; CIONINI, P.G. Genome size variation in *Vicia faba*. **Heredity**, v. 74, p. 180-187, 1995.

CONAGIN, C. H. T. M.; MENDES, A. J. T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Autoincompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. **Bragantia**, v. 20, n. 34, p. 787-804, 1961.

DOLEŽEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **J. Appl. Genet.**, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 143-154, 1991.

DOLEŽEL, J.; GÖHDE, W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* usino high-resoluytion flow cytometry. **Cytometry**, v. 19, p. 103-106, 1995.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSÁK, M.A.; NARDI, L.; OBERMAYER. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparation. **Annals of Botany**, v. 82 (Supplement A), p. 17-26, 1998.

DOLEŽEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Pshysiology Plantarum**, v. 85, p. 625-631, 1992.

GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDOX, J.M.; AYRTS, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, p. 1049-101, 1983.

GREILHUBER, J. Flow cytometric and Feulgen densitometric analysis of genome size variation in *Pisum*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, p. 297-307, 1996.

GREILHUBER, J. Intraespecific Variation in genome size: a critical reassessment. **Annals of Botany**, v. 82 (Supplement A), p. 27-35, 1998.

GREILHUBER, J.; OBERMAYER, R. Genome size and maturity group in *Glycine max* (Soybean). **Heredity**, v. 78, p. 574-551, 1997.

KELLER, E.R.J.; SCHUBERT, I.; FUCHS, J.; MEISTER, A. Interspecific cross of onion with distant *Allium* species and characterization of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic in situ hybridization. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, p. 417-424, 1996.

KRUG, C. A. Estudos citológicos em *Coffea* II. **Bol. Inst. Agron.**, n. 22, 1937.

KRUG, C. A. Contribuição para o estudo da cytologia do gênero *Coffea*. **Bol. Inst. Agron.**, n.11, 1938.

LAPITAN, N.L.V. Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. **Genome**, v. 35, p. 171-181, 1992.

LYSÁK, M.A.; ROSTKOVÁ, A.; DIXON, J.M.; ROSSI, G.; DOLEŽEL, J. Limited genome size variation in *Sesleria albicans*. **Annals of Botany**, v. 86, p. 399-403, 2000.

MARIE, D.; BROW, S.C. A cytometric exercise in plant DNA histograms with 2C values for 70 species. **Biol. Cell.**, v. 78, p. 41-51, 1993.

MARTEL, E.; NAY, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S.; SARR, A. genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **The Journal of Heredity**, v. 88, p. 139-143, 1997.

MEDINA, D. M. Observações citológicas em *Coffea*. **Bragantia**, v. 9, p. 47-49, 1949.

MENDES, A.J.T. A hibridação interespecífica no melhoramento do cafeeiro. **Bragantia**, v. 11, n. 10-12, p. 297-306, 1951.

MENDES, A.J.T. Observações citológicas em *Coffea*. XI-Métodos de tratamento pela colchicina. **Bragantia**, v. 7, p. 221-230, 1947.

MENDES, A.J.T. Os romossomos das Rubiáceas. **Bol. Inst. Agron.**, n. 55, 1938.

MISHIBA, K.; ANDO, T.; MII, M.; WATANASE, H.; KOKUBUN, H.; HASHIMOTO, G.; MARCHESI, E. Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the Genus *Petunia sensu jussieu* (Solanaceae). **Annals of Botany**, v. 85, p. 665-673, 2000.

NATALI, L.; CAVALLINI, A.; CIONINI, G.; SASSOLI, O.; CIONINI, P.G.; DURANTE, M. Nuclear DNA changes within single progenies and their relationships with plant development. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 506-512, 1993.

OBERMAYER, R.; GREILHUBER, O. Genome size in chinese soybean accessions-stable or variable?. **Annals of Botany**, v. 84, p. 259-262, 1999.

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

PRICE, H.J. DNA content variation among higher plants. **Ann. Mo. Bot. Gard.**, v. 75, p. 1248-1257, 1988.

RAYBURN, AL.; AUGER, J.A.; BENZINGER, E.A.; HEPBURN, A.G. Detection of intraespecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 220, p. 1179-1183, 1989.

RIJO, L. Observações cariológicas no cafeeiro 'Híbrido de Timor'. **Portugal Acta Biologia**, Serie A, v. 13, n. 1-2;157-168, 1974.

SELVARAJ, R. Karyomorphological studies in south indian Rubiaceae. **Cytologia**, v. 52, p. 343-356, 1987.

THIBAUT, J. Nuclear DNA amount in pure species and hybrids willous (*Salix*): a flow cytometric investigation. **Can. J. Bot.**, v. 76, p. 157-165, 1998.

VOGLMAYR, H. Nuclear DNA amounts in *Mosses* (Musci). **Annals of Botany**, v. 85, p. 531-546, 2000.

**CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR EM *Coffea arabica* e *Coffea canephora*
POR CITOMETRIA DE IMAGEM**

RESUMO

A citometria de imagem é uma técnica utilizada para avaliar, por densitometria, o conteúdo de DNA nuclear. Essa metodologia tem sido mais difundida em análises e avaliações que envolvem biópsia de tumores na patologia humana. A introdução desta técnica em plantas, com exemplos de análises de ploidia em tecidos meristemáticos, vem apresentando resultados com confiabilidade semelhante àqueles obtidos em casos humanos. Seu sucesso tem sido verificado pelo rápido desenvolvimento de tecnologias de imagem digital e sistema de análise de imagem, que substituíram os citofotômetros clássicos. No presente estudo, a citometria de imagem foi empregada para determinação da densidade óptica integrada de meristemas radiculares preparados por esmagamento e corados pela reação de Feulgen. O método prófase/telófase (mensuramento de 10 núcleos em prófase e 10 em telófases por raiz) foi empregado nesta pesquisa. Assim, valores 4C e 2C, referentes aos núcleos em prófase e telófase, foram estimados, e as razões de 1,72 e 1,77 em prófase e telófase, respectivamente, entre os genomas de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho ($2n=44$) e *Coffea canephora* cv. Conillon ($2n=22$), e de 1,76 e 1,05 em prófase e

telófase, respectivamente, entre *C. arabica* cv. Mundo Novo e *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho, puderam ser estabelecidas. As estimativas dos índices entre as cultivares obtidas por este método foram comparadas com valores encontrados previamente com o uso da citometria de fluxo e apresentaram diferenças inferiores a 2,27%.

1. INTRODUÇÃO

Em plantas, os métodos mais extensivamente empregados para o estudo do conteúdo do genoma são a citometria de fluxo e a densitometria citofotométrica. A citometria de fluxo reúne características importantes, como relativa facilidade, precisão e rapidez, especialmente quando se trabalha com um número muito grande de indivíduos (DOLEŽEL, 1991, 1997; DOLEŽEL e GÖHDE, 1995; DOLEŽEL et al., 1998). O custo para aquisição e manutenção de um citômetro de fluxo é a principal limitação dessa metodologia. Os métodos por densitometria oferecem a vantagem de poder mensurar núcleos que estão presentes em pequeno número e não podem ser isolados em quantidade suficiente para serem analisados por citometria de fluxo (PRICE e JOHNSTON, 1996).

Em geral, dois métodos densitométricos são usados para avaliar o tamanho do genoma de plantas: a citometria citofotométrica e a citometria de imagem (BENNETT e LEITCH, 1995; BENNETT e LEITCH, 1997; BENNETT et al., 2000). Em ambos os métodos, o DNA é corado com a reação de Feulgen. O princípio dessa técnica é a proporcionalidade entre a quantidade de DNA existente e a de corante incorporada pelo núcleo (CHIECO e DERENZINI, 1999; HARDIE et al., 2002). A intensidade de coloração do núcleo é mensurada de acordo com os protocolos de uso do citofotômetro ou, mais recentemente, por citometria de imagem do DNA (BÖCKING et al., 1995), associada a um sistema

de análise de imagem digital (PUECH e GIROUD, 1999; VILHAR et al., 2001; VILHAR e DERMASTIA, 2002). Nesse caso, softwares específicos de análises são utilizados para processar a captura de imagem e calcular a densidade óptica integrada dos núcleos. Usando espécies estabelecidas como padrões, com o tamanho do genoma conhecido as unidades arbitrárias da densidade óptica integrada (IOD) mensuradas são convertidas em picograma (pg) de DNA.

Embora a citometria de imagem de DNA seja rotineiramente usada em pesquisas na área médica, este método tem sido raramente aplicado para o mensuramento da quantidade de DNA nuclear em plantas (TEMSCH et al., 1998; DIMITROVA et al., 1999; VILHAR et al., 2001). Porém, segundo VILHAR e DERMASTIA (2002), em consequência do rápido desenvolvimento de tecnologias de imagem digital, sistemas de análise de imagem poderão substituir citofotômetros nesse tipo de pesquisa em vegetais.

VILHAR et al. (2001) conduziram, em laboratórios distintos, experimentos utilizando diferentes instrumentos de citometria de imagem, para testar a segurança desta metodologia no mensuramento do conteúdo de DNA nuclear em plantas. O método pico-intérfase (mensuramento de centenas de núcleos por lâminas) foi comparado com o prófase/telófase (mensuramento de 10 prófases iniciais e 10 telófases terminais por lâmina). Os resultados foram reproduzíveis e similares àqueles obtidos previamente por DOLEŽEL (1998), empregando citometria citofotométrica e citometria de fluxo.

O presente estudo objetivou estabelecer uma metodologia de citometria de imagem para estimar o índice de densidade óptica integrada (IOD) de núcleos em prófase (4C) e telófase (2C), em duas espécies de *Coffea* (*C. arabica* cv. Catuaí Vermelho e cv. Mundo Novo e *C. canephora* cv. Conillon); e, visando avaliar a confiabilidade das leituras encontradas, comparar esses resultados com valores obtidos previamente utilizando citometria de fluxo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

A citometria de imagem foi empregada em plantas de *Coffea arabica* (cv. Catuaí Vermelho e cv. Mundo Novo) e *Coffea canephora* (cv. Conillon), cujas amostras foram previamente analisadas por citometria de fluxo. As espécies foram obtidas do banco de germoplasma da UFV/EPAMIG, mantida pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

2.2. Germinação das sementes

As células em divisão foram obtidas de tecido meristemático radicular. Para tanto, as sementes de café foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo papel de germinação (GERMILAB) umedecido com água destilada e deixadas em estufa a 29 °C. Ao atingirem aproximadamente 1 cm, as radículas foram submetidas aos tratamentos necessários para análise. Os procedimentos citogenéticos foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Viçosa.

2.3. Fixação

As radículas foram fixadas em solução de metanol:ácido acético (3:1) por 12-24 h no refrigerador, conforme VILHAR et al. (2001). Após esse período, elas foram transferidas para álcool 96%, como recomendado por GREILHUBER e EBERT (1994), sendo as amostras armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Hidrólise e coloração com Feulgen

Procedimentos descritos por VILHAR et al. (2001) foram seguidos para hidrólise das raízes. Para a remoção do álcool, estas foram lavadas em água destilada por 30 minutos e, em seguida, hidrolisadas em HCl 5 N por 60 minutos a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após lavagem em água destilada gelada (5 trocas a cada 2 minutos) para interrupção da hidrólise, os meristemas foram corados por 24 h, no escuro e em refrigerador, em reagente de Feulgen, preparado dissolvendo 2 g de fucsina básica, Merck, em 340 ml de água destilada fervendo. Quando a temperatura baixou para $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram adicionados 60 ml de HCl 1 N e 8,9 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$. A solução foi filtrada e armazenada “overnight”, e após esse período 2,9 g de carvão ativado foram adicionados à solução filtrada, conforme protocolo indicado por GREILHUBER e EBERT (1994). As raízes foram lavadas em água sulfurosa (SO_2), à temperatura ambiente, com três trocas a cada 15 minutos (GREILHUBER e TEMSCH, 2001).

2.5. Esmagamento

Após a lavagem em água sulfurosa, a raiz foi colocada em lâmina limpa, com uma gota de ácido acético 45%, e, sob microscópio estereoscópio, a região meristemática foi isolada. Cobriu-se o meristema com lamínula, e as células foram espalhadas com a pressão de uma ponta rombuda. Após o espalhamento das células, foi feito o esmagamento, sob três folhas de papel-filtro. As lâminas foram incubadas em “freezer”, sobre uma placa metálica, por cinco minutos; após esse período, as lamínulas foram removidas com o auxílio de uma lâmina de

barbear e as lâminas, secadas ao ar. Depois da secagem, uma pequena gotícula de óleo de inclusão (Carl Zeiss = L 25, com índice de refração = 1,525) foi gotejada sobre a preparação e esta, coberta com uma lamínula.

2.6. Citometria de imagem

Para o procedimento da citometria de imagem, o método prófase/telófase foi empregado conforme VILHAR et al. (2001). Dez núcleos em prófases iniciais e 10 em telófases tardias foram selecionados e mensurados por raiz e a densidade óptica integrada (IOD) das classes telófases (2C) e prófases (4C), calculada.

2.7. Equipamento

O microscópio utilizado para análise foi o Olympus BX 60 com uma fonte de luz estabilizada, sendo a objetiva empregada de 40 X. Um filtro de densidade neutra (ND6) e outro de interferência verde (IF550) foram usados. Uma câmera monocromática 3CCD (12 bits), do “kit” de análise de imagem Cool SNAP™ Pro Digital, foi usada para a captura das imagens. O software do “kit” (Image Pro Plus 4.5) e uma tabela de calibração com valores de densidades conhecidos foram empregados para processar as imagens. Uma curva de calibração foi obtida a partir de filtros de densidade óptica (DO) = 0,04; 0,22; 0,42; 0,60; 0,79; 0,99; 1,18; 1,36; 1,55; 1,75; 1,95; 1,95; e 2,13, certificados pela Stouffer Industries. O processamento da imagem foi segmentado para correção do “background”, e os valores de IOD foram realizados automaticamente pelo “software”, após calibração com filtros descritos anteriormente. Aproximadamente 14 a 16 núcleos foram capturados, e a (IOD) foi mensurada apenas para 10 prófases iniciais e 10 telófases terminais por lâminas, conforme VILHAR et al. (2001).

2.8. Controle de qualidade dos dados

Pelo fato de ainda não existirem normas específicas para certificar a qualidade dos dados obtidos por citometria de imagem em plantas, dois critérios

empregados para citometria de imagem em pesquisas na área médica foram adotados. O primeiro critério requer um coeficiente de variação (CV) dos núcleos, por lâmina, no grupo 2C ou 4C, não excedendo a 6% (BÖCKING et al., 1995; VILHAR et al., 2001). O segundo determina que a razão entre os valores 4C e 2C não desvie do valor ideal 2,0; esse erro deve, proporcionalmente, apresentar-se abaixo de 5%, ou seja, taxa 4C/2C entre 1,9 e 2,1 (KINDERMANN e HILGERS, 1994; VILHAR et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dez núcleos em prófases iniciais e 10 em telófases tardias foram selecionados e mensurados por lâmina, para o *Coffea canephora* cv. Conillon (Figura 1) e *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho e cv. Mundo Novo (Figuras 1 e 2). Os índices de densidade óptica (IOD) foram obtidos para todos os mensuramentos, e os coeficientes de variação (CV) foram abaixo de 5% (Quadro 1), evidenciando que todos os procedimentos que envolveram preparação da lâmina e coloração e mensuramento dos núcleos foram apropriados.

Os índices de densidade óptica integrada (IOD) foram obtidos de todas as amostras analisadas, e as médias foram selecionadas para o cálculo do índice nuclear 4C/2C (Quadro 1). A razão 4C/2C não desviou mais que 5% da taxa ideal de 2,0 em nenhuma das amostras. Esse é o limite recomendado pelos padrões de aplicações em medicina (VILHAR et al., 2001; KINDERMANN e HILGERS, 1994). Os índices encontrados (2,0 e 2,1) indicam que os núcleos em prófase (4C) têm, aproximadamente, o dobro do conteúdo de DNA apresentado pelos núcleos em telófase (2C).

O valor 2C de DNA foi previamente analisado por citometria de fluxo nas três amostras investigadas, *C. canephora* cv. Conillon com 1,57 pg, *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho com 2,76 pg e *C. arabica* cv. Mundo Novo com 2,89 pg, possibilitando uma comparação entre os dois métodos. A razão entre os genomas

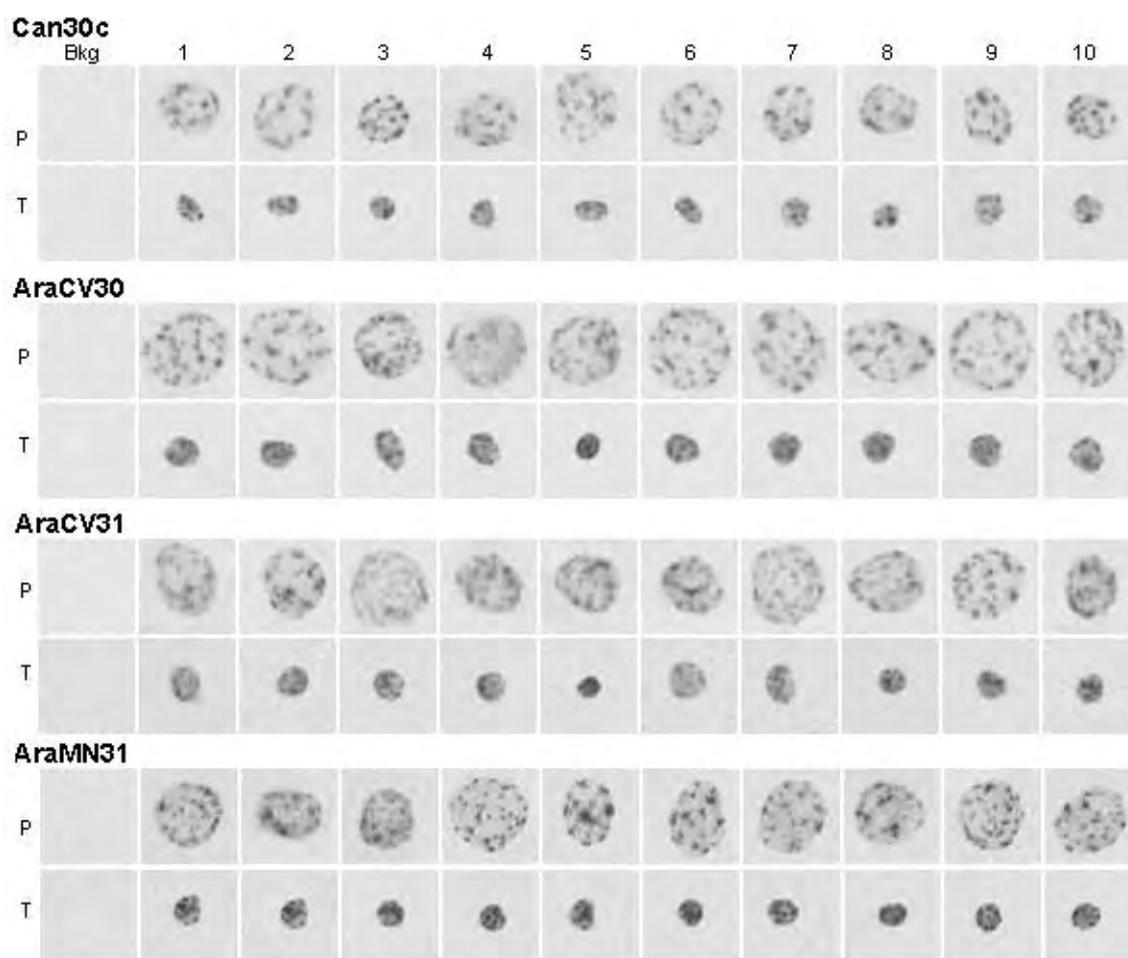


Figura 1 – Dez núcleos em prófases iniciais (P) e 10 em telófases tardias (T) de *Coffea canephora* cv. Conillon (Can), *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho (AraCV) e cv. Mundo Novo (AraMN), selecionados e mensurados por lâmina. Bkg=background.

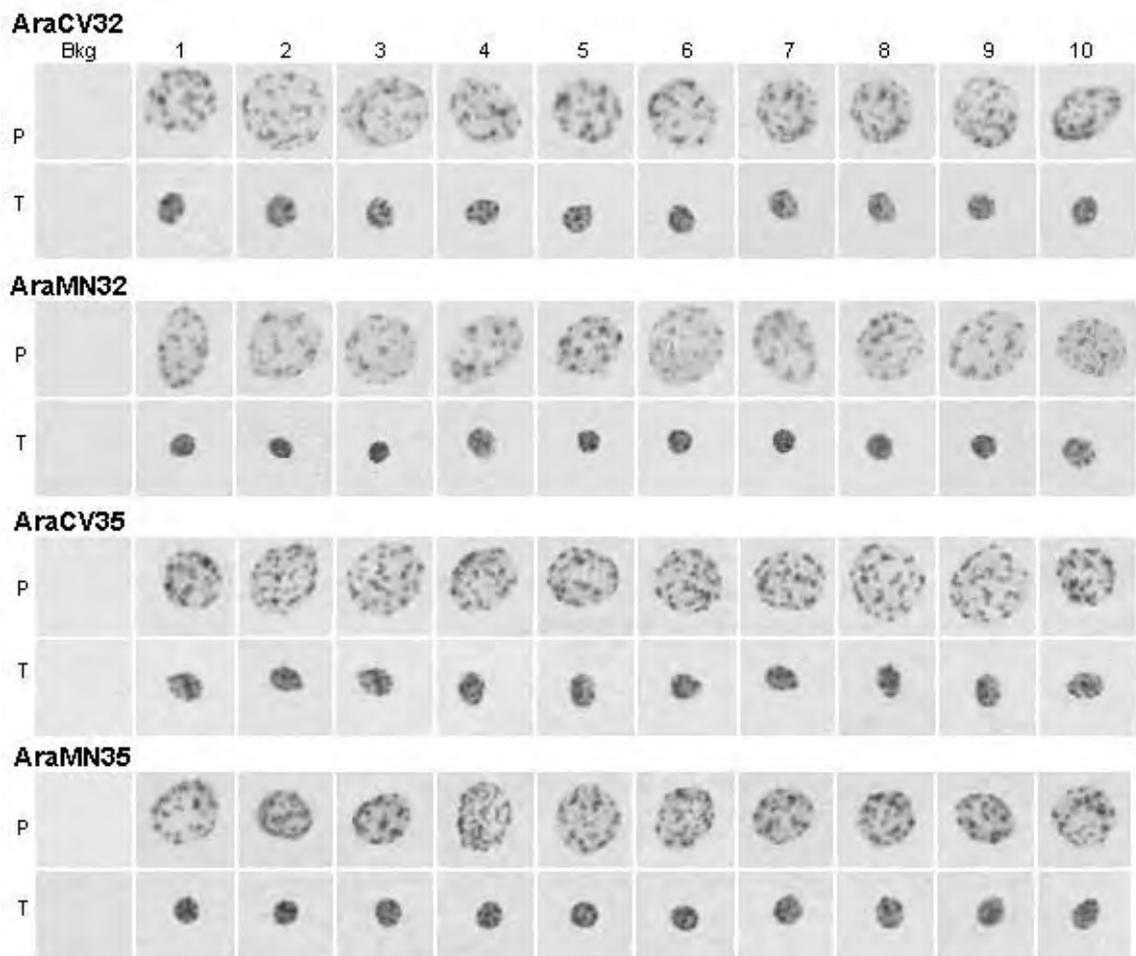


Figura 2 – Dez núcleos em prófases iniciais (P) e 10 em telófases tardias (T) de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho (AraCV) e cv. Mundo Novo (AraMN), selecionados e mensurados por lâmina. Bkg=background.

Quadro 1 – Médias dos índices de densidade óptica integrada (IOD), calculadas para os 10 núcleos em prófase (P) e 10 em telófase (T), por lâmina, com os respectivos coeficientes de variação (CV) e índice P/T (4C/2C)

Material	Média do IOD				Índice (4C/2C) P/T
	P	CV%	T	CV%	
AraCV (30)	6,089	2,890	2,951	3,273	2,1
Can (30)	3,533	4,339	1,667	3,064	2,1
Ara CV (31)	5,369	3,150	2,594	4,896	2,1
AraMN (31)	6,697	4,208	3,134	1,840	2,1
AraCV (32)	6,166	3,890	2,938	3,658	2,1
AraMN (32)	5,549	4,640	2,736	4,809	2,0
Ara CV (35)	6,865	2,248	3,270	4,696	2,1
AraMN (35)	6,966	2,446	3,299	1,332	2,1

AraCV = *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho, AraMN = *C. arabica* cv. Mundo Novo e Can = *C. canephora* cv. Conillon.

do Catuaí Vermelho e Conillon revelou um índice de 1,76 pela citometria de fluxo e de 1,72 (4C) e 1,77 (2C) pela citometria de imagem, diferenças de 2,27% e 0,57%, respectivamente, entre os índices obtidos pelos dois métodos (Quadro 2). Essa relação também foi estabelecida entre o genoma do cultivar Mundo Novo e o do Catuaí Vermelho, revelando, pela citometria de fluxo, um índice de 1,05 e, por citometria de imagem, de 1,06 (4C) e 1,05 (2C), diferenças de 0,95% e 0%, respectivamente, entre os índices obtidos pelos dois métodos (Quadro 2). Valores encontrados por densitometria são considerados menos precisos do que quando obtidos por citometria de fluxo em razão, principalmente, do baixo número de núcleos mensurados. Porém, os índices encontrados revelam que, maximizando os procedimentos metodológicos para preparação das lâminas e mensuramento, é possível obter resultados tão confiáveis quanto aqueles obtidos por citometria de fluxo.

Com base nos dados obtidos em nove espécies de plantas estudadas, usando o método prófase/telófase, VILHAR et al. (2001) propuseram que dois critérios fossem adotados para a aplicação da citometria de imagem em plantas. Primeiro, que fossem consideradas confiáveis apenas as leituras de IOD, cujos

Quadro 2 – Índices AraCV/Can e AraMN/AraCV, em relação à prófase e telófase, com base nas médias de IOD apresentadas no Quadro 1 e nos índices obtidos por CF em estudos anteriores

Material	Índice AraCV/ Can		Índice AraMN/AraCV	
	P	T	P	T
AraCV 30 e Can 30	1,72	1,77	-	-
AraMN 31 e AraCV 31	-	-	1,25	1,21
AraMN 32 e AraCV 32	-	-	0,90	0,93
AraMN 35 e AraCV 35	-	-	1,02	1,01
Média	-	-	1,06	1,05
Índice obtido por citometria de fluxo (CF)	1,76		1,05	
Diferença entre os índices obtidos pelos dois métodos	2,27%	0,57%	0,95%	0%

AraCV = *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho, AraMN = *C. arabica* cv. Mundo Novo e Can = *C. canephora* cv. Conillon.

CV fossem abaixo de 6%. VILHAR et al. (2001) registraram baixos valores de CV para *Glycine max* e *Vicia faba*, correspondendo a 10 núcleos em telófase (2C), enquanto alto valor de CV foi típico em espécies com baixo conteúdo de DNA nuclear (*Raphanus sativus* e *Arabidopsis thaliana*), bem como para *Allium cepa*, com alto valor de DNA. Porém, para a maioria das espécies estudadas, o CV de 2C foi próximo ou abaixo de 6%, que corresponde ao CV-limite recomendado pelos padrões médicos (BÖCKING et al., 1995). Neste estudo, todas as amostras investigadas apresentaram CV abaixo de 5%, cumprindo, portanto, esse primeiro critério recomendado. Em musgos, VOGLMAYR (2000) encontrou um CV de 3% para a espécie-padrão e de até 10% para os musgos. Segundo esse autor, o elevado valor do CV foi consequência, principalmente, da metodologia adotada, uma vez que a hidrólise de 40 minutos empregada tanto para o padrão quanto para os musgos não provou ser ótimo para as duas espécies. Outra possível causa, segundo o referido autor, foi o uso de eritrócitos de ave, que não é considerado um padrão muito apropriado (JOHNSTON et al., 1999).

O segundo critério proposto por VILHAR et al. (2001) foi de que a taxa $4C/2C$ não desviasse de 2,0 mais que 5%, ou seja, entre 1,9 e 2,1, em todas as espécies investigadas. Neste estudo, esse índice foi de 2,0 e 2,1 para todas as amostras estudadas, portanto dentro da faixa sugerida, indicando que a metodologia aplicada foi adequada para as espécies de café analisadas.

Uma investigação comparativa entre a citometria de fluxo e o mensuramento densitométrico, baseado em citometria de imagem, foi realizada por VOGLMAYR (2000). As diferenças entre os dados obtidos pelos dois métodos foram geralmente abaixo de 10%. Os dados conseguidos por citometria de imagem, segundo esse autor, não foram tão confiáveis quanto os obtidos por citometria de fluxo em razão, provavelmente, do baixo número de núcleos mensurados. Neste trabalho, as diferenças registradas entre os dois métodos foram inferiores a 2,27% (Quadro 2), demonstrando a eficiência de ambos os métodos para determinação da quantidade de DNA.

VILHAR et al. (2001) também compararam resultados obtidos por citometria de imagem com resultados extraídos de DOLEŽEL et al. (1998) encontrados por citometria citofotométrica e citometria de fluxo. O mesmo material vegetal foi utilizado em ambos os estudos.

A discordância entre os métodos de citometria de imagem e citometria citofotométrica foi inferior a 10% (entre 5 e 10%), exceto em *R. sativus* e *A. thaliana*, que apresentaram valores altos. Diferenças entre os dados de citometria de imagem e citometria de fluxo também foram inferiores a 10% em todas as espécies estudadas. Esse nível de diferença entre diferentes métodos também foi previamente observado entre citometria de fluxo e citometria citofotométrica (DOLEŽEL et al., 1998; JOHNSTON et al., 1999). O método de citometria de imagem foi considerado tão eficiente quanto os outros métodos e, segundo VILHAR et al. (2001), deve ser adicionado à lista de métodos aceitos para o mensuramento do conteúdo de DNA nuclear de espécies vegetais.

4. CONCLUSÕES

Os procedimentos metodológicos estabelecidos envolvendo fixação, hidrólise, coloração, esmagamentos e mensuramento foram apropriados para obtenção dos índices de densidade óptica (IOD) para as espécies de café investigadas.

Valores 4C e 2C referentes aos núcleos em prófase e telófase foram estimados, e os índices 4C/2C de 2,0 e 2,1 confirmaram a sensibilidade da técnica.

Os índices entre as cultivares, obtidos pelo método de citometria de imagem, foram comparados aos valores conseguidos previamente usando a citometria de fluxo e apresentaram diferenças inferiores a 2,27%.

CONCLUSÕES GERAIS

Preparações citogenéticas desenvolvidas para o cafeeiro, empregando inibidores mitóticos (trifluralina 3 μ M por 18 h a 5 °C e brometo de etídio 10 μ M por 24 h a 5 °C), digestão enzimática da parede celular com solução de Flazyme:água destilada na proporção de 1:60 por 10' a 34 °C e preparo das lâminas pelo método da dissociação celular e secagem ao ar, possibilitaram a preservação morfológica dos cromossomos e a análise de imagem, fornecendo um incremento de qualidade que favoreceu a montagem do cariótipo de *C. arabica*, *C. eugenoides* e *C. canephora* e do idiograma de *C. canephora*.

Tornaram-se possíveis a identificação e o pareamento dos respectivos homólogos do *C. arabica* em dois grupos, evidenciando sua origem tetraplóide, conforme dados da literatura.

A caracterização citogenética e a obtenção de dados morfométricos revelaram que *C. canephora* possui um par de cromossomos metacêntricos (m) e 10 pares submetacêntricos (sm), um satélite associado à constrição secundária no braço curto do sexto par de cromossomos, um comprimento absoluto de 3,33 a 1,57 μ m e outro relativo de 6,86 a 3,23%.

A metodologia aplicada, envolvendo extração, coloração e análise, foi apropriada para estimar o valor 2C de DNA nuclear dos 28 acessos de *Coffea*, gerando histogramas com CV abaixo de 3,06%.

Entre os acessos de *C. arabica*, a citometria de fluxo revelou a ocorrência de variação de 2,40 pg (cv. Bourbon Amarelo) a 3,04 pg (cv. Arábica 5288), uma diferença de 0,64 pg (1,27 vez) no conteúdo de DNA, dentro dessa espécie. Nos acessos de *C. canephora* ocorreu uma variação de 1,43 pg a 1,61 pg, o que representa uma diferença de 0,18 pg (1,13 vez) no valor 2C de DNA.

A diferença na quantidade de DNA entre espécies diplóides foi de até 0,50 pg = 45% (*C. racemosa* 1,11 pg; *C. eugenoides* 1,40 pg e *C. canephora* cv. Robusta 1,61 pg). Com relação ao tetraplóide *C. arabica*, os valores encontrados de 2,40 a 3,04 pg representam 1,49 a 2,13 vezes o valor do tamanho do genoma do *C. canephora*; 1,71 a 2,17 vezes o de *C. eugenoides*; e 2,16 a 2,74 vezes o do menor diplóide *C. racemosa*.

Os resultados citométricos determinaram o caráter triplóide das plantas denominadas UFV 557.1, UFV 557.2, UFV 557.3, UFV 557.4 e UFV 557.6 e que estas são realmente híbridos entre *C. racemosa* e *C. arabica*, confirmando a sensibilidade do aparelho para o monitoramento e identificação de determinados híbridos interespecíficos em *Coffea*.

Híbridos resultantes do cruzamento de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho (IAC 15) com UFV 557-3 (*C. racemosa* x *C. arabica*), denominados H920.1, H920.3, H920.4, H920.5 e H920.6, apresentaram valores 2C de DNA dentro da faixa estimada para *C. arabica* (4 x).

O Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*) apresentou valor 2C de DNA pertinente ao número de cromossomos e ao nível de ploidia relatados sobre essa planta.

Os procedimentos metodológicos estabelecidos envolvendo fixação, hidrólise, coloração, esmagamento e mensuramento foram apropriados para obtenção dos índices de densidade óptica (IOD) das espécies de café investigadas.

Os valores 4C e 2C referentes aos núcleos em prófase e telófase foram estimados, e os índices 4C/2C de 2,0 e 2,1 confirmaram a sensibilidade da técnica.

Os índices entre as cultivares obtidos pelo método da citometria de imagem foram comparados com os valores conseguidos previamente usando a citometria de fluxo e apresentaram diferenças inferiores a 2,27%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENNETT, M.D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. **Ann. Bot.**, v. 86, p. 859-909, 2000.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Ann. Bot.**, v. 76, p. 113-176, 1995.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms – 583 new estimates. **Ann. Bot.**, v. 80, p. 169-196, 1997.

BÖCKING, A.; GIROUD, F.; REITH, A. Consensus report of the ESACP task force on standardisation of diagnostic DNA image cytometry. **Anal. Cell. Pathol.**, v. 8, p. 67-74, 1995.

CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochem Cell Biol.**, v. 111, p. 345-358, 1999.

DIMITROVA, D.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; KOZHUHAROV, S. Karyotype constancy and genome size variation in Bulgarian *Crepis foetida* s. l. (*Asteraceae*). **Plant Systematics and Evolution**, v. 217, p. 245-257, 1999.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear dna content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 143-154, 1991.

DOLEŽEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEŽEL, J.; GÖHDE, W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. **Cytometry**, v. 19, p. 103-106, 1995.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSÁK, M.A.; NARDI, L.; OBERMAYER? Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, v. 82 (Supplement A), p. 17-26, 1998.

GREILHUBER, J.; EBERT, I. Genome size variation in *Pisum sativum*. **Genome**, v. 37, p. 646-655, 1994.

GREILHUBER, J.; TEMSCH, E.M. Feulgen densitometry: some observations relevant to best practice in quantitative nuclear DNA content determination. **Acta Bot. Croat.**, v. 60, n. 2, p. 28-298, 2001.

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. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 6, p. 735-749, 2002.

JOHNSTON, J.S.; BENNETT, M.D.; RAYBURN, A.L.; GALBRAITH, D.W.; PRICE, H.J. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 609-613, 1999.

KINDERMANN, D.; HILGERS, C.H. Glare-correction in DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, v. 6, p.165-180, 1994.

PRICE, H.J.; JOHNSTON, S. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: JAUHAR, P.P. **Methods of genome analysis in plants**. [S.l.]: Ed. Boca Raton, 1996. 386 p.

PUECH, M.; GIROUD, F. Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. **Cytometry**, v. 36, p. 11-17, 1999.

TEMSCH, E.M.; GREILHUBER, J.; KRISAI, R. Genome size in *Sphagnum* (peat moss). **Bot. Acta.**, v. 111, p. 325-330, 1998.

VILHAR, B.; GREILHUBER, J.; KOCE, J.D.; TEMSCH, E.M.; DERMASTIA, M. Plant genome size mensurament with DNA image cytometry. **Annals of Botany**, v. 87, p. 719-728, 2001.

VILHAR, B.; DERMASTIA, M. Standardisation of instrumentation in plant DNA image cytometry. **Acta Bot. Croat.**, v. 61, n. 1, p. 11-26, 2002.

VOGLMAYR, H. Nuclear DNA amounts in Mosses (Musci). **Annals of Botany**, v. 85, p. 531-546, 2000.