

# PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA MENSURAMENTO DO CONTEÚDO DE DNA DE CADA CROMOSSOMO DE *Coffea canephora* VIA CITOMETRIA DE IMAGEM

Wellington Ronildo CLARINDO<sup>1</sup>, E-mail: welbiologo@gmail.com; Carlos Roberto de CARVALHO<sup>1</sup>; Marcelo Antoniol FONTES<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. <sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BIOCAFÉ), BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

## Resumo:

O Brasil lidera o mercado mundial de café em produção e exportação e é o segundo maior consumidor do grão. Parte desse aumento tem sido atribuída aos investimentos em programas de melhoramento e às inovações geradas pelos processos biotecnológicos. Espécies do gênero *Coffea* têm sido objetos de estudos citométricos, os quais geram dados de base citológica e genética para contribuir com programas de melhoramento. Entre os vários níveis de contribuição, a citometria de imagem, metodologia que mensura o conteúdo relativo e/ou absoluto de DNA por meio do cálculo da densidade óptica integrada (DOI) de núcleos ou cromossomos corados com reativo de Schiff, fornece informações úteis para o planejamento de projetos de seqüenciamento e estabelecimento de mapas genéticos. O objetivo do presente estudo foi estimar o conteúdo de DNA, em picogramas, para cada cromossomo de *C. canephora* cv. Apoatã via citometria de imagem. Suspensões de agregados celulares foram tratadas com amiprofos-metil, fixadas e maceradas enzimaticamente. As técnicas de dissociação celular e secagem ao ar foram empregadas no preparo das lâminas, e essas foram hidrolisadas e coradas com reativo de Schiff. As imagens cromossômicas foram capturadas, por meio de microscópio e câmera CCD, e analisadas com recursos digitais de análise de imagem. Os procedimentos metodológicos proporcionaram prometáfases e metáfases contendo cromossomos morfológicamente preservados. Dentre essas imagens mitóticas, foram selecionadas três prometáfases e seis metáfases com cromossomos sem sobreposições e no mesmo plano de foco, estas foram utilizadas na montagem dos kariogramas e no cálculo da DOI. A partir dos valores médios de DOI dos cromossomos e do conteúdo 2C de DNA de *C. canephora* cv. Apoatã (1,43 pg) foi mensurado o conteúdo de DNA para cada cromossomo, que variou de 0,18 pg (cromossomo 1) a 0,10 pg (cromossomo 11). Os resultados abrangem informações acerca do genoma desta espécie que podem ser úteis em programas de melhoramento, seqüenciamento e em estudos evolutivos.

Palavras-chave: *Coffea canephora*, citometria de imagem, cromossomos, conteúdo de DNA.

## STANDARDIZATION OF A METHODOLOGY FOR MEASURING THE CHROMOSOMIC DNA CONTENT OF *Coffea canephora* BY IMAGE CYTOMETRY.

### Abstract:

Brazil leads the world coffee market in production and exportation, and is the second biggest worldwide consumer of the grain. Part of the production increase has been ascribed to the investments on breeding programs and to the innovations brought by the biotechnological processes. Species from the genus *Coffea* have been under investigation in cytometrical studies, which search for data using cytological and genetical principles in order to contribute with breeding programs. Among its many contributions, the image cytometry, methodology that measures the relative and/or absolute DNA content by calculation of the integrated optical density (IOD) of nuclei and chromosomes stained with the Schiff reaction, supplies useful information for the planning of sequencing projects and establishment of genetic maps. The objective of the present study was to estimate the DNA content, in picograms (pg), for each chromosome of *C. canephora* cv. Apoatã by image cytometry. Cell suspension aggregates were treated with amiprofos-methyl, fixed and enzymatically macerated. The cellular dissociation and air-drying techniques were used in the preparation of slides, which were subsequently hydrolyzed and stained with the Schiff reaction. The chromosome images were captured, by microscope and CCD camera, and analyzed with digital resources of image analysis. The methodological procedures provided prometaphases and metaphases with morphologically preserved chromosomes. Out of all mitotic images, we selected 3 prometaphases and 6 metaphases with chromosomes showing no overlaps and localized in the same focus plane. The same mitotic images were used in the assembly of karyograms and in the calculation of the IOD. Using the mean IOD values and absolute 2C DNA content of *C. canephora* cv. Apoatã (1.43 pg), the DNA content for each chromosome could be measured, and varied from 0.18 pg (chromosome 1) to 0.10 pg (chromosome 11). The results include information regarding the genome of this species that can be useful in breeding programs, sequencing and evolutive studies.

Key words: *Coffea canephora*, image cytometry, chromosomes, DNA content.

### Introdução

O mensuramento do tamanho do genoma nuclear de plantas fornece informações úteis a estudos taxonômicos, filogenéticos, envolvendo marcadores moleculares e em programas de seqüenciamento (Volgmayr e Greilhuber, 1998; Schifino e Wittmann, 2001; Hardie et al., 2002; Noirot et al., 2002). Atualmente, para estimar o conteúdo relativo e/ou

absoluto do genoma nuclear vêm sendo empregados métodos que se baseiam na análise de núcleos individuais: as citometrias de fluxo e imagem (Dolezel e Bartos, 2005).

A citometria de imagem é uma ferramenta que associa os princípios da citofotometria a recursos digitais de microscopia e análise de imagem (Vilhar et al., 2001). Essa metodologia fundamenta-se na captura, por meio de microscópio e câmera digital CCD, de imagens nucleares (Chieco e Derezini, 1999) ou cromossômicas (Rosado et al., 2005), coradas com reativo de Schiff (Vilhar et al., 2001), e na subsequente conversão das imagens em valores de pixels (Hardie et al., 2002). Dessa forma, os valores de pixels são processados automaticamente pelo algoritmo do *software* computacional gerando valores de absorvância relacionados com a área, denominados de densidade óptica integrada – DOI (Hardie et al., 2002). Como a DOI é adimensional, há necessidade de comparar os valores de DOI da amostra e do padrão de referência, planta com conteúdo de DNA absoluto conhecido, para estimar o conteúdo 2C de DNA, em picogramas (pg).

Em virtude dos núcleos analisados pela citometria de imagem serem corados estequiometricamente e especificamente pela técnica citoquímica descrita por Feulgen e Rossenbeck (1924), essa metodologia tem sido importante na quantificação do conteúdo de DNA por permitir análises quantitativas com elevada precisão (Chieco e Derezini, 1999; Dolezel e Bartos, 2005). Concomitantemente, a citometria de imagem destaca-se por permitir análises em amostras com número reduzido de células e a realização de correlações entre a ploidia da célula e a sua morfologia. Uma outra característica da citometria de imagem é a possibilidade de estudos em tecidos sem que seja feita a sua desagregação, isso é particularmente útil quando as amostras estão fixadas e incluídas em parafina ou resinas. Em adição, essa técnica apresenta a vantagem de facilitar análises com base no reconhecimento visual das células, possibilitando o estudo somente das estruturas de interesse (Ross, 1996; Greilhuber, 2005).

A citometria de imagem foi empregada com sucesso por Rosado et al. (2005) para estimação do conteúdo de DNA para cada cromossomo do complemento A e B de *Zea mays* L. 'Black Mexican Sweet Corn'. A quantificação de DNA cromossômica também pode ser efetuada por meio da cariotipagem de fluxo, entretanto essa metodologia necessita de suspensões com grande quantidade de cromossomos intactos e de protocolos que acarretam histogramas com resolução suficiente para separação dos picos referentes a cada cromossomo (Lucretti et al., 1993; Dolezel et al., 2004), o que torna a citometria de imagem uma alternativa viável para esse fim (Rosado et al., 2005).

Fontes (2003) mensurou o conteúdo de DNA nuclear de três cultivares de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, espécie diplóide que apresenta  $2n = 22$  cromossomos (Pierozzi et al., 1999; Clarindo e Carvalho, 2006), via citometria de imagem. A autora encontrou valores equivalentes a 1,43 pg para a cv. Apoatã; 1,58 para a cv. Conilon e 1,59 pg para a cv. Robusta.

O presente estudo teve como objetivo padronizar um protocolo de quantificação de DNA por cromossomo de *Coffea canephora* cv. Apoatã ( $2n = 22$  cromossomos e  $2C = 1,43$  pg) empregando a citometria de imagem.

## Material e Métodos

Suspensões de agregados celulares de *C. canephora* cv. Apoatã, obtidas de calos embriogênicos friáveis e cultivados em meio de cultura líquido VB2 (van Bostel e Berthouly, 1996), foram citogeneticamente tratados conforme descrito por Clarindo e Carvalho (2006). Após 4 h, os agregados foram fixados como sugerido por Greilhuber e Ebert (1994) e Zorinians et al. (2003). Os agregados foram lavados em água destilada e macerados em solução enzimática seguindo os procedimentos relatados por Rosado et al. (2005). A solução enzimática foi retirada, e os agregados fixados em solução de etanol 70%.

Subseqüentemente, cada agregado foi utilizado para preparo das lâminas seguindo os procedimentos descritos por Carvalho e Saraiva (1993). Após 5 min em placa aquecedora, as lâminas foram fixadas, lavadas e hidrolizadas em HCl 5N conforme descrito Rosado et al. (2005). Após hidrólise, as lâminas foram lavadas em água destilada por 2 min, secas ao ar e recobertas com reativo de Schiff por 12 ou 24 h. Cada lâmina foi submetida a duas lavagens de 2 min cada, uma em água sulfurosa e outra em água destilada (Vilhar et al., 2001; Rosado et al., 2005).

As lâminas foram analisadas num microscópio Olympus<sup>TM</sup>, modelo Bx-60 acoplado a uma câmera monocromática CCD de 12 bits do Kit de análise de imagem Cool SNAP<sup>TM</sup>. As metáfases foram capturadas usando uma objetiva de 100x, um filtro de densidade neutra (ND6) e outro de interferência de cor verde (IF550). O programa Image Pro-Plus 4.5 e uma tabela de calibração com valores de densidade conhecidos foram empregados para processar as imagens. Foi utilizada uma curva de calibração a partir dos filtros de densidade óptica certificados pela Stouffer Industries. Para determinar a DOI foram tomados valores tanto de regiões contendo cromossomos, como de regiões com ausência de material celular na lâmina. O programa computacional Image Pro-Plus calculou automaticamente a DOI. Finalmente, os valores médios de DOI e o conteúdo de DNA ( $2C = 1,43$  pg) de *C. canephora* cv. Apoatã; relatado por Fontes (2003) empregando a citometria de imagem; foram utilizados para calcular o conteúdo de DNA em pg para cada um dos cromossomos.

## Resultados e Discussão

Os pré-tratamentos de bloqueio em suspensão de agregados celulares (Clarindo e Carvalho, 2006), fixação (modificado de Greilhuber e Ebert, 1994 e Zorinians et al., 2003), e maceração enzimática (modificado de Rosado et al., 2005) associados aos procedimentos de dissociação celular e secagem ao ar para o preparo das lâminas (Carvalho e Saraiva, 1993); proporcionaram prometáfases e metáfases sem fragmentos citoplasmáticos ou deformações estruturais da cromatina, e com constrições primárias e secundárias bem definidas (Fig 1 a – i). De todas as figuras mitóticas obtidas, foram selecionadas três prometáfases e seis metáfases sem cromossomos sobrepostos e no mesmo plano de foco. Esses

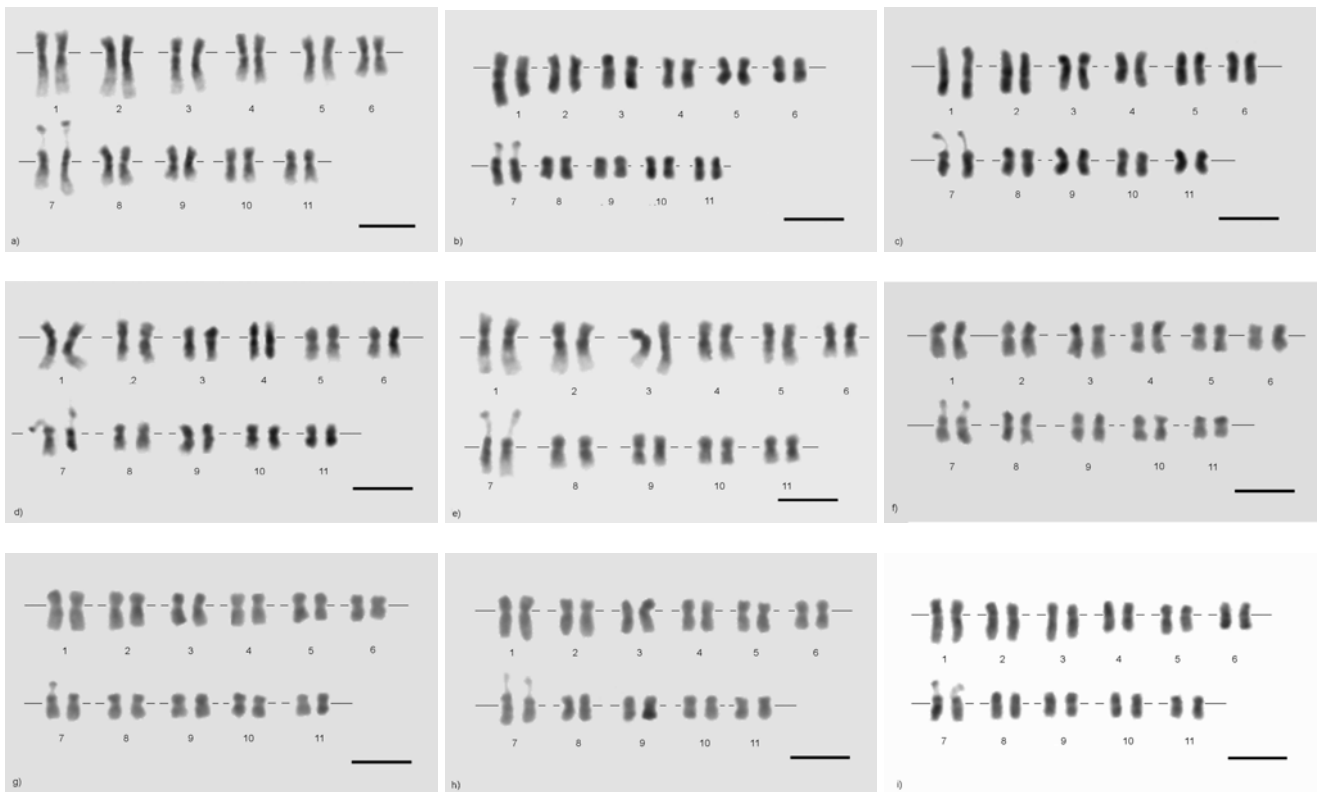


Fig 1 – Cariogramas de *C. canephora* cv. Apoatã ( $2x = 22$  cromossomos) obtidos de suspensões de agregados celulares, corados com reativo de Schiff e montados com base nos dados morfométricos. Note a morfologia bem preservada dos cromossomos e as contrações primárias e secundárias (cromossomo 7) bem definidas. Barra = 5  $\mu$ m.

resultados foram considerados fundamentais para montagem dos kariogramas (Fig. 1 a – i) e mensuramento da DOI, visto que a técnica de esmagamento, usualmente empregada na citometria de imagem nuclear (Vilhar et al., 2001; Fontes, 2003), geralmente não provê preparações cromossômicas com essas características (Carvalho e Saraiva, 1993).

A padronização do tempo de hidrólise, considerada por Chieco e Derezini (1999) etapa crítica da citometria de imagem, em 18 min e de coloração com reativo de Schiff por 12 h garantiu a distribuição estequiométrica do cromóforo (pararosanilina) ao longo da estrutura da cromatina e, conseqüentemente, contribuíram para o mensuramento adequado dos valores de DOI.

A calibração do sistema de microscopia, realizado com os filtros certificados pela Stouffer Industries, também foi fundamental para a estimação dos valores de DOI por possibilitar o adequado processamento de imagens cromossômicas digitais em programa de análise de imagens.

A DOI foi mensurada para os 198 cromossomos, sendo 18 amostras para cada cromossomo (cada cromossomo em metáfase com conteúdo de DNA equivalente a  $2C$ ), os valores médios variaram entre 0,49 (cromossomo 1) a 0,27 (cromossomo 11). Com base nos valores médios de DOI e no conteúdo  $2C$  de DNA de *C. canephora* cv. Apoatã de 1,43 pg, quantificado por Fontes (2003) via citometria de imagem, foi estimado o conteúdo de DNA em pg para cada cromossomo. Os valores encontrados foram: 0,18 pg (cromossomo 1); 0,17 pg (cromossomo 2); 0,16 pg (cromossomo 3); 0,13 pg (cromossomos 4 e 5); 0,12 pg (cromossomos 6 e 7); 0,11 pg (cromossomos 8 e 9) e 0,10 pg (cromossomos 10 e 11).

Outra metodologia empregada para determinação do conteúdo de DNA em cromossomos é a cariotipagem de fluxo, porém essa técnica necessita de suspensões com elevada quantidade de cromossomos intactos (Lucretti et al., 1993) e de protocolos que permitam a separação dos cromossomos por tamanho, morfologia e intensidade de fluorescência (Dolezel et al., 2004). Portanto, em espécies que possuem cromossomos morfologicamente similares, como o café (Fig. 1 a – i), os histogramas gerados na cariotipagem de fluxo geralmente não apresentam resolução suficiente para identificação de cada cromossomo.

A metodologia padronizada nesse estudo permitiu estimar o conteúdo de DNA para cada cromossomo de *C. canephora* cv. Apoatã. Em contraste com a cariotipagem de fluxo, a citometria de imagem é de grande interesse por possibilitar mensuramentos em pequenas amostras de material citológico. Além disso, os resultados descritos nesse estudo podem ser úteis para trabalhos em melhoramento em café, em especial, para calcular o número de marcadores moleculares a serem utilizados para saturação de mapas genéticos.

## Referências Bibliográficas

- CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. (1993). A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. *Heredity*, 70: 515-519.
- CHIECO, P.; DERENZINI, M. (1999). The Feulgen reaction 75 years on. *Hist. Cell. Biol.*, 111: 345-358.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. (2006). A high quality chromosome preparation from cell suspension aggregates culture of *Coffea canephora*. *Cytologia*, 71: 243-249.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99-110.
- DOLEZEL, J.; KUBALAKOVA, M.; BARTOS, J.; MACAS, J. (2004). Flow cytogenetics and plant genome mapping. *Chromosome Research*, 12: 77-91.
- FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. (1924). Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seyler Z Physiol Chem*, 135:203-248.
- FONTES, B. P. D. (2003). Citogenética, citometria de fluxo e citometria de imagem em *Coffea* spp. Viçosa, MG: UFV. 130 p. (Tese D.S.).
- GREILHUBER, J. (2005). Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Annals of Botany*, 95:91-98.
- GREILHUBER, J.; EBERT, I. (1994). Genome size variation in *Pisum*. *Genome*, 37: 646-655.
- HARDIE, D.C.; GREGORY, T.R.; HEBERT, P.D.N. (2002). From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *J. Hist. Cyt.*, 50: 735-749.
- LUCRETTI, S.; DOLEZEL, J.; SCHUBERT, I.; FUCHS, J. (1993). Flow karyotyping and sorting of *Vicia faba* chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 665-672.
- NOIROT, M.; BARRE, P.; LOUARN, J.; DUPERRAY, C.; HAMON, S. (2002). Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. *dewevrei* using DAPI and propidium iodide. *Annals of Botany*, 89: 385-389.
- PIEROZZI, N.; PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. (1999). Characterization of somatic chromosomes of two diploid species of *Coffea* L. with acetic orcein and C-band techniques. *Caryologia*, 52: 1-8.
- ROSADO, T.B.; CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. (2005). DNA content of maize metaphasic A and B chromosomes determined by image cytometry. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 79: 48-49.
- ROSS, J.S. (1996). DNA ploidy and cell cycle analysis in pathology, 156p. IGAKU-SHOIN Medical Publishers.
- SCHIFINO- WITTMANN, M.T. (2001). Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. *Ciência Rural*, 31: 897-902.
- van BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44: 7-17.
- VILHAR, B.; GREILHUBER, J.; KOCE, J.D.; TEMSCH, E.M.; DERMASTIA, M. (2001). Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany*, 87: 719-728.
- VOLGMAYR, H.; GREILHUBER, J. (1998). Genome size determination in Peronosporales (Oomycota) by Feulgen Image Analysis. *Fungal Genet Biol.*, 25: 181-195.
- ZORINIANTS, S. E.; NOSOV, A. V.; MONFORTE-GONZALEZ, M.; MENDES-ZEEL, M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. (2003). Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry. *Plant Science*, 164: 141-146.