

APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NA IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Coffea*

Letícia Kuster Mitre¹, Anelise Machado Marques¹, Carlos Roberto Carvalho², Wellington Ronildo Clarindo¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Produção Vegetal, CEP 29500-000, Alegre-ES, Brasil, leticialkm@hotmail.com

²Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Biologia Geral, CEP 36570, Viçosa-MG, Brasil

Resumo- Parte do aumento da produção do café tem sido atribuído aos investimentos em programas de melhoramento, onde a hibridização artificial interespecífica vem ganhando espaço, criando novas variedades de interesse agrônomo. A citometria de fluxo é uma ferramenta biotecnológica que possibilita caracterizar o genoma nuclear das espécies, fornecendo informações que contribuem para estudos de melhoramento, taxonomia e evolução. Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo utilizar a citometria de fluxo para mensurar o nível de ploidia e o conteúdo de DNA nuclear, e confirmar a origem de híbridos interespecíficos previamente originados por meio da fusão de gametas reduzidos de *C. arabica* e *C. racemosa*. O conteúdo médio de DNA nuclear de *C. arabica* foi equivalente a $2C = 2,66$ pg, de *C. racemosa* $2C = 1,01$ pg e para o híbrido $2C = 1,82$ pg. Os dados obtidos com a citometria de fluxo auxiliam na análise da ploidia, e conseqüentemente na identificação de híbridos interespecíficos, contribuindo para programas de melhoramento do cafeeiro.

Palavras-chave: *Coffea*, híbrido, citometria de fluxo, conteúdo de DNA nuclear

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

O café é um dos cinco produtos agrícolas mais importantes para o agronegócio do Brasil, sendo líder no mercado mundial de café em produção e exportação, e segundo maior consumidor mundial do grão (FAO, 2009).

Parte do aumento da produção do café tem sido atribuído aos investimentos em programas de melhoramento, onde a hibridização artificial interespecífica vem ganhando espaço por aliar as boas qualidades de determinadas espécies, proporcionando ganhos econômicos com a criação de novas variedades, apresentando novas características de interesse agrônomo.

A citometria de fluxo por sua vez, é uma ferramenta biotecnológica que possibilita caracterizar o genoma nuclear das espécies, fornecendo informações que contribuem para estudos de melhoramento, taxonomia e evolução. Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo de utilizar a citometria de fluxo para mensurar o nível de ploidia e o conteúdo de DNA nuclear, e confirmar a origem de híbridos interespecíficos previamente originados por meio da fusão de gametas reduzidos de *C. arabica* e *C. racemosa*.

Metodologia

Para o estabelecimento das suspensões nucleares, foram extraídos fragmentos foliares de 2 cm² de folhas jovens da planta padrão *Solanum lycopersicum* L., com conteúdo de DNA conhecido ($2C = 1,96$ pg), e das amostras de *C. arabica*, *C. racemosa* e do híbrido interespecífico.

A extração dos núcleos das amostras foi realizada de acordo com o método de Galbraith et al. (1983), retalhando as amostras foliares com lâmina de barbear numa placa de Petri contendo 0,5 mL do tampão de lise Otto I, a 4°C (OTTO, 1990). Esse tampão foi suplementado com 2,0 mM de ditiotreitol e 50 µg/mL de RNase. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL do mesmo tampão à suspensão, que foi filtrada e centrifugada (CLARINDO; CARVALHO, 2009). O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspenso e incubado em 100 µL do tampão de lise OTTO-I (ABREU et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; ROSSI et al., 2008). As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, coradas com 1,5 mL de solução OTTO-I:OTTO-II (1:2) (OTTO, 1990), suplementado com 50 mM de ditiotreitol, 50 µL de RNase e 75µM de iodeto de propídeo, para

determinar o tamanho do genoma nuclear, e em seguida filtradas.

As suspensões foram analisadas em citômetro de fluxo Partec PAS® (Partec® GmbH, Munster, Germany), equipado com uma fonte de laser (488 nm), gerando histogramas usados para mensurar o tamanho do genoma nuclear das amostras analisadas.

Resultados

Os procedimentos de extração e coloração de núcleos possibilitaram uma quantidade suficiente de núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados. Consequentemente, a metodologia gerou histogramas apresentando picos de núcleos G₀/G₁ com alta resolução e coeficientes de variação abaixo de 5%.

A partir das análises dos histogramas, evidenciou-se que o conteúdo médio de DNA nuclear de *C. arabica* é equivalente a 2C = 2,66 pg, de *C. racemosa* 2C = 1,01 pg e para o híbrido 2C = 1,82 pg.

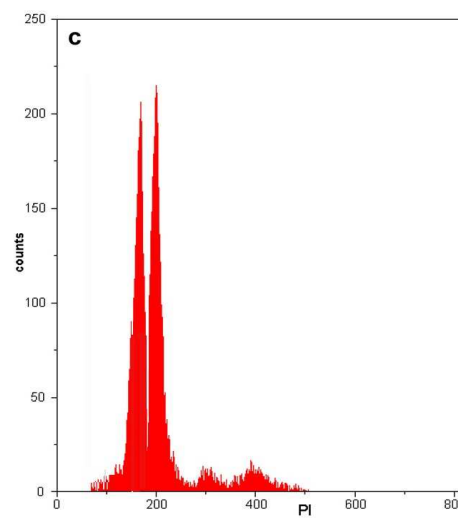
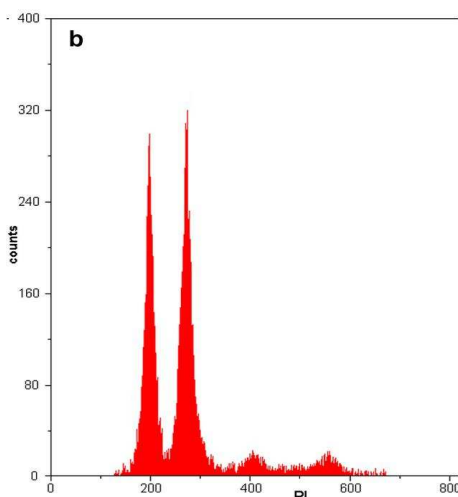
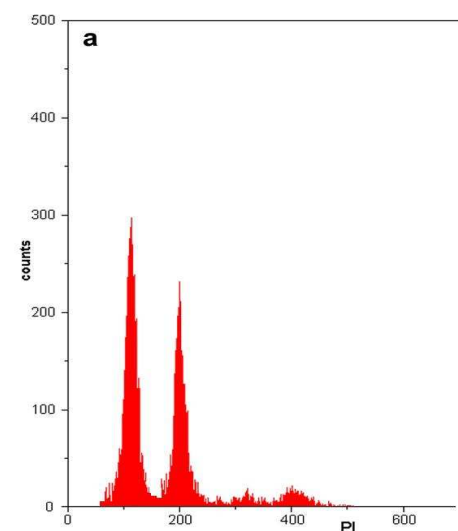


Figura 1: Histogramas gerados a partir da análise de suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo. (a) Pico representando os núcleos nas fases G₀/G₁ de *C. racemosa* (2C = 1,01 pg) no canal 103 e *S. lycopersicum* (padrão interno, 2C = 1,96 pg) no canal 200. (b) Pico representando os núcleos nas fases G₀/G₁ de *C. arabica* (2C = 2,66 pg) no canal 272 e *S. lycopersicum* (padrão interno, 2C = 1,96 pg) no canal 200. (c) Pico representando os núcleos nas fases G₀/G₁ do híbrido interespecífico (2C = 1,82 pg) no canal 186 e *S. lycopersicum* (padrão interno, 2C = 1,96 pg) no canal 200.

Discussão

A metodologia de extração e coloração nuclear, para análise via citometria de fluxo, gerou histogramas apresentando picos de núcleos G₀/G₁ com alta resolução e coeficientes de variação (CV) abaixo de 5%. De acordo com Doležel e Bartoš (2005), valores de CV inferiores a 5% são considerados adequados para análises citométricas. Consequentemente, o protocolo empregado possibilitou uma quantidade suficiente de núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados.

Diferentemente de outros trabalhos que também objetivaram a quantificação do conteúdo de DNA do genoma de café (CROS et al., 1994, 1995; NOIROT et al., 2003b), no presente estudo foi utilizado o tampão Otto (OTTO, 1990). De acordo com Doležel e Bartoš (2005) e Loureiro et al. (2006a), esse tampão provê histogramas apresentando núcleos G₀/G₁ com resolução inigualável, sendo, por esse motivo, considerado adequado em análises envolvendo espécies com conteúdo de DNA nuclear relativamente baixo,

como as de *Coffea* (CLARINDO; CARVALHO, 2009, 2010).

A partir das análises dos histogramas, evidenciou-se que *C. arabica* possui $2C = 2,66$ pg, *C. racemosa* $2C = 1,01$ pg e o híbrido $2C = 1,83$ pg.

O conteúdo médio de DNA nuclear obtido por citometria de fluxo indica que realmente o híbrido analisado é um triploide. Esse valor também confirma que o híbrido possui metade do conteúdo de DNA nuclear de seus parentais, *C. arabica* e *C. racemosa*, por meio da seguinte fórmula: $2C$ da planta triploide = ($\frac{1}{2}$ do conteúdo de DNA de *C. arabica*) + ($\frac{1}{2}$ do conteúdo de DNA de *C. racemosa*).

Em virtude da possibilidade de análise de partículas individuais a uma velocidade elevada através da citometria de fluxo, as análises podem ser feitas num curto espaço de tempo (DOLEŽEL, 1997b). Portanto, os dados obtidos por essa técnica auxiliam na análise da ploidia das espécies, sendo útil na identificação de híbridos, contribuindo para análises prévias em programas de melhoramento do cafeeiro.

Conclusão

Como evidenciado pelo CV, a metodologia de extração e coloração nuclear gerou uma quantidade suficiente de núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados.

A partir das análises dos histogramas, evidenciou-se que *C. arabica* possui $2C = 2,66$ pg, *C. racemosa* $2C = 1,01$ pg e o híbrido $2C = 1,83$ pg, indicando que o híbrido é realmente um triploide, apresentando metade do conteúdo de DNA nuclear de seus parentais, *C. arabica* e *C. racemosa*.

Dessa forma, os dados obtidos com a citometria de fluxo auxiliam na análise da ploidia, e consequentemente na identificação de híbridos interespecíficos, contribuindo para programas de melhoramento do cafeeiro.

Agradecimento

Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo) e CBP&D/Café (Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café)

Referências

ABREU, I.S.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and

cytometric tools. **Plant Cell Rep.** V. 27, p. 1227–1233, 2008.

CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R.; PRACA, M.M.; ARAUJO, F.S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Sci.** V. 174, p. 613–617, 2008.

CLARINDO, W.R.; CARVALHO, C.R. Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. **Plant Cell Rep.** V. 28, p. 73-81, 2009.

CLARINDO, W.R.; CARVALHO, C.R.; Flow cytometric analysis using SYBR Green I for genome size estimation in coffee. **Acta Histochemica.** Disponível em: doi: 10.1016/j.acthis.2009.10.005, 2010.

CROS, J.; COMBES, M.C.; CHABRILLANGE, N.; DUPERRAY, C.; ANGLES, A.M.; 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.; RECALT, C.; DUPERRAY, C.; HAMON, S. Variations in the total nuclear DNA content in African *Coffea* species (Rubiaceae). **Café Cacao Thé.** V. 38, p. 3-10, 1994.

DOLEŽEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement.** V. 97, P. 80-90, 1997b.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Ann Bot.**, V. 95, p. 99–110, 2005.

FOOD and Agriculture Organization (FAO). Disponível em: <http://apps.fao.org> Acesso em: 1 mar. 2009.

GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDOX, J.M.; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science.** V. 220, p. 1049-1051, 1983.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Ann Bot.**, V. 98, p. 679-689, 2006a.

NOIROT, M.; PONCET, V.; BARRE, P.; HAMON, P.; HAMON, S.; KOCHKO, A. Genome size

variations in diploid African Coffea species. **Ann Bot.**, V. 92, p. 709–714, 2003b.

OTTO, F.J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: DARZYNKIEWIEZ, Z.; CRISSMAN, H.A.; ROBINSON, J.P. **Methods in cell biology**. San Diego: Ed Academic Press, V. 33, p. 105-110, 1990.

ROSSI, A.A.B.; CLARINDO, W.R.; CARVALHO, C.R.; OLIVEIRA, L.O. Karyotype and nuclear DNA content of *Psychotria ipecacuanha*: a medicinal species. **Cytologia**. V. 73, p. 53–60, 2008.