

FERNANDA APARECIDA FERRARI SOARES

**CONSTRUÇÃO DE SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS A PARTIR DA  
MICRODISSECÇÃO DE UM CROMOSSOMO**

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  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S676c  
2016 Soares, Fernanda Aparecida Ferrari, 1985-  
Construção de sondas cromossomo-específicas a partir da  
microdissecção de um cromossomo / Fernanda Aparecida Ferrari  
Soares. – Viçosa, MG, 2016.  
xi, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Citogenética. 2. Cromossomos. 3. Micromanipulação.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento. II. Título.

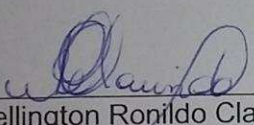
CDD 22 ed. 572.8

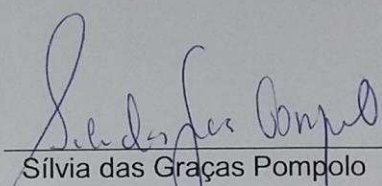
FERNANDA APARECIDA FERRARI SOARES

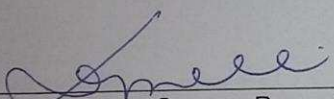
**CONSTRUÇÃO DE SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS A  
PARTIR DA MICRODISSECÇÃO DE UM CROMOSSOMO**

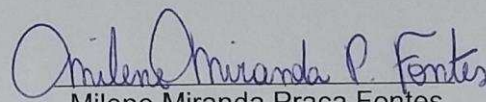
Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
de *Doctor Scientiae*.

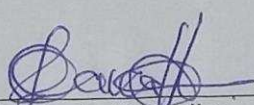
APROVADA: 24 de maio de 2016.

  
Wellington Ronildo Clarindo

  
Sílvia das Graças Pompolo

  
Denise Mara Soares Bazzolli

  
Milene Miranda Praça Fontes

  
Carlos Roberto de Carvalho  
(Orientador)

*Ao meu orientador Prof. Carlos Roberto de Carvalho*  
*Aos meus pais Valme e Eny*  
*Ao meu melhor amigo Billy*

*DEDICO*

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”  
(Simone de Beauvoir)*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa por fornecer um ensino público de qualidade, sem o qual dificilmente teria acesso aos cursos de graduação e de pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de formação e de aquisição de conhecimento.

Ao Departamento de Biologia Geral, aos professores e funcionários que foram fundamentais na minha caminhada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

Ao meu orientador e amigo Prof. Carlos Roberto de Carvalho, pelos grandes ensinamentos e por ser um exemplo de profissional ético e dedicado.

Ao meu coorientador e amigo Prof. Wellington Ronildo Clarindo, pelo incentivo constante, apoio e amizade.

Às professoras Sílvia das Graças Pompolo, Denise Mara Soares Bazzolli, Milene Miranda Praça Fontes e Marcia Flores da Silva Ferreira pela colaboração no delineamento do trabalho e pela inspiração de vida.

A todos os professores os quais tive a honra de conviver ao longo da minha caminhada, meus verdadeiros mestres e exemplos de dedicação.

À amiga Prof. Maria Andréia por me guiar nos primeiros passos na Citogenética Molecular, e pela amizade e torcida.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Marco Tulio pelo auxílio e dedicação em todos os momentos.

Aos queridos amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria pela torcida e pelos muitos momentos de descontração. Em especial à Mitiko, Paulo, Guilherme, Gabi, Denise, Alex e Jéssica pela amizade sincera. Obrigada por tornarem tudo mais fácil!

Aos meus pais Eny e Valme pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos, e por sonhar meus sonhos; aos meus irmãos Iara, Débora, Rafael, Sara e Ramon pela cumplicidade e fraternidade que nos une.

Ao meu namorado e amigo Diogo pelo carinho, incentivo e compreensão.

Ao meu companheiro mais fiel e dedicado, Billy, pela leveza da presença, pela conexão de alma e por me lembrar que existe um amor sincero e sublime.

A todos os amigos e colegas que me acompanharam e me acompanham, sempre torcendo, incentivando, auxiliando e transmitindo energia positiva.

À Deus, acima de tudo, pelo dom da vida, pela proteção de cada dia e por auxiliar alcançar mais um objetivo.

## SUMÁRIO

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO.....                                                                                          | ix |
| ABSTRACT.....                                                                                        | xi |
| 1 – INTRODUÇÃO .....                                                                                 | 1  |
| 2 – OBJETIVOS.....                                                                                   | 7  |
| 2.1 - Objetivo Geral.....                                                                            | 7  |
| 2.2 - Objetivos específicos.....                                                                     | 7  |
| 3 – MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                          | 8  |
| 3.1 – Material biológico.....                                                                        | 8  |
| 3.2 – Preparação de cromossomos metafásicos provenientes<br>do banco de metáfases humanas.....       | 8  |
| 3.3 – Obtenção de cromossomos metafásicos provenientes<br>de meristemas radiculares de plantas ..... | 9  |
| 3.4 – Microdissecção cromossômica.....                                                               | 10 |
| 3.5 – Amplificação dos cromossomos microdissectados.....                                             | 11 |
| 3.6 – Marcação da sonda com nucleotídeo fluorescente.....                                            | 12 |
| 3.7 – FISH.....                                                                                      | 13 |
| 3.8 – Análise dos dados.....                                                                         | 13 |
| 4 – RESULTADOS.....                                                                                  | 15 |

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 4.1 – Preparações cromossômicas.....                  | 15 |
| 4.2 – Microdissecção.....                             | 15 |
| 4.3 – Tratamento com proteinase K e amplificação..... | 17 |
| 4.4 – Marcação fluorescente.....                      | 18 |
| 4.5 – FISH.....                                       | 20 |
| 5- DISCUSSÃO.....                                     | 23 |
| 6- CONCLUSÃO.....                                     | 30 |
| 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                   | 31 |

## RESUMO

SOARES, Fernanda Aparecida Ferrari, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2016. **Construção de sondas cromossomo-específicas a partir da microdissecção de um cromossomo.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

Sondas cromossomo-específicas referem-se a um conjunto de sequências de DNA marcadas com fluorescência, específicas de um par cromossômico, visualizadas através da hibridização em preparações citogenéticas. Tais sondas possibilitam a visualização altamente sensível e exclusiva de cromossomos individuais, ampliando a resolução diferencial de cariótipos. Elas podem ser empregadas em análises de organização do genoma, genômica comparativa, estudos evolutivos e filogenéticos, auxiliar na identificação de pares de homólogos, comparação cariotípica e obtenção de mapas físicos com marcas que auxiliem em programas de melhoramento genético. Técnicas de microdissecção de cromossomos, juntamente com métodos de isolamento e amplificação do DNA microdissectado, representam ferramentas úteis para serem aplicadas na construção dessas sondas cromossomo-específicas. Um fator considerado limitante no uso da microdissecção é a necessidade de coletar em torno de 20 cópias de um determinado cromossomo. Isso implica na necessidade de reconhecimento prévio do alvo e a certeza na identificação. A utilização de um único cromossomo resolve essa questão e possibilita a construção de sondas sem necessidade de identificação prévia, além de reduzir os esforços relativos à microdissecção. Considerando o potencial informativo dessas sondas e o desafio de construí-las a partir de um único cromossomo, o presente trabalho foi realizado com objetivo de padronizar metodologias para construção de sondas cromossomo-específicas a partir de um cromossomo isolado por microdissecção. Para tanto, foram realizadas adaptações das técnicas para obtenção de cromossomos mitóticos e meióticos adequados para caracterização cariotípica e aplicação das técnicas de microdissecção e hibridização *in situ* fluorescente. Foram utilizadas metáfases provenientes de cultura de linfócitos humanos para padronização de (i) métodos de microdissecção; (ii) enzimas adequadas e condições de amplificação de um cromossomo por DOP-PCR; (iii) enzimas para a marcação

fluorescente das sondas por *random primer* e (iv) condições de estringência para a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Após essas padronizações iniciais, as metodologias foram empregadas em milho (*Zea mays*) e pimentão (*Capsicum annuum*) para primeiros testes envolvendo espécies vegetais. Foram obtidas sondas cromossomo-específicas para o par 2 do cariótipo humano, para o par cromossômico 1 de milho e para pimentão (provavelmente o par 7 ou 8). Esses resultados demonstraram que, apesar da construção de sondas cromossomo-específicas ser uma metodologia extensa e desafiadora, a padronização de cada etapa possibilitou a marcação de um par específico a partir da coleta de um único cromossomo para humano, milho e pimentão. A microdissecção, a transferência do material para o microtubo e a comparação de diferentes parâmetros na amplificação por DOP-PCR foram consideradas como as etapas mais críticas do processo. A qualidade das preparações cromossômicas foi um fator crucial para aplicação das metodologias de microdissecção e FISH. Esse trabalho revela estratégias baseadas na microdissecção de um único cromossomo que possibilitaram a produção de sondas cromossomo-específicas para diferentes organismos, como humano, milho e pimentão. As etapas padronizadas poderão direcionar os procedimentos de construção de sondas cromossomo-específicas para todos os cromossomos dos cariótipos das espécies utilizadas nesse trabalho, bem como poderão ser aplicadas em outras plantas.

## ABSTRACT

SOARES, Fernanda Aparecida Ferrari, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2016. **Chromosome specific probe construction from a single microdissected chromosome**. Adviser: Carlos Roberto de Carvalho.

Chromosome-specific probes are DNA sequences, fluorescently labelled specifically for a chromosome pair. Such probes can be applied for analysis in evolutionary and phylogenetic studies, for karyotype comparison and to obtain physical maps that help in plant breeding programs. Techniques of chromosome microdissection, along with methods of isolation and amplification of microdissected DNA, represent useful tools to be employed in the construction of chromosome-specific probes. A considered limiting factor in the use of microdissection is the necessity to collect around 20 copies of a particular chromosome. This implies the need of prior recognition of the target and the conviction in identification. The use of a single chromosome solves this issue and allows the construction of probes without prior identification, besides reducing the efforts on microdissection. Considering the potential of these informative probes, this study aimed to compare and standardize methods of classical and molecular cytogenetics to build probes. Therefore, technical adjustments were made to obtain mitotic and meiotic chromosomes suitable for karyotype characterization and application in microdissection techniques and in situ hybridization. Metaphases from human lymphocytes were used to standardization of (i) microdissection methods; (ii) chromosomes amplification; (iii) DNA fluorescent labelling and (iv) stringency conditions for fluorescence in situ hybridization (FISH). After the initial protocol standardization, the methodologies were used in maize (*Zea mays*) and sweat peppers (*Capsicum annuum*). A chromosome-specific probe for pair 2 of human chromosomes, a probe to chromosome 1 of corn and a probe for sweat pepper (probably the pair 7 or 8) were obtained. Although chromosome-specific probes construction involves many steps, the standardization of each process stages allowed, in our conditions, to obtain a specific probe from a single chromosome for humans, corn and sweat pepper. The microdissection and the comparison of different DOP-PCR parameters were considered as the most critical steps of the

process. Human and plant chromosomes showing preserved morphology and structure provided a suitable template DNA for probes construction. The quality of chromosome preparation was a key factor for the microdissection and application of FISH methodologies. This work reveals strategies based on microdissection of a single chromosome that made possible the production of chromosome-specific probes for different organisms, such as human, corn and pepper. Standardized steps may guide the procedures of chromosome-specific probes construction for all chromosomes of karyotypes of the species used in this work, and it may be applied to other plant.

## 1 – INTRODUÇÃO

A citogenética envolve estudos sobre os aspectos celulares da hereditariedade, especialmente a descrição da estrutura dos cromossomos e a identificação de alterações genômicas. A partir dos anos 80 a incorporação de técnicas de hibridização *in situ* vem aumentando a resolução das análises cromossômicas, atenuando a distinção tradicional entre citogenética e biologia molecular (Speicher e Carter, 2005). O advento da citogenética molecular aumentou a resolução das análises por meio da localização de sequências de DNA específicas nos cromossomos de interesse (Yang et al., 2009). Os avanços têm proporcionado desde a identificação de cromossomos independentemente de sua morfologia (Gribble et al. 2004), até a elucidação da história evolutiva dos cromossomos e o aumento do conhecimento a respeito da diferenciação de genomas (D'Hont 2005, Cai et al. 2006). Com o surgimento da genômica funcional, o desenvolvimento de mapas físicos, com a localização de genes ou sequências de interesse, vem recebendo grande destaque, uma vez que possibilitam compreender a organização cromossômica e a evolução cariotípica de uma espécie e auxiliam na reunião de sequências durante o sequenciamento genômico e no isolamento de genes mapeados (Harper e Cande 2000, Guerra 2004, Stephens et al. 2004, Lukaszewski et al. 2005, Wang e Chen 2005, Yamamoto e Mukai 2005, Hamon et al. 2009, Ohmido et al. 2010).

Sondas cromossomo-específicas são coleções de sequências de DNA marcadas obtidas a partir de um tipo específico de cromossomo. Essas sondas podem ser obtidas tanto por microdissecção cromossômica quanto por

cromossomos *flow sorted* (Yang et al., 2009). Um fator limitante na aplicação dessas ferramentas é a necessidade de coleta de muitas cópias de um determinado cromossomo (Gribble et al., 2004). Sondas construídas a partir de microdissecção necessitam, em média, de cerca de 20 cromossomos (Deng et al. 1992). No entanto, modificações em protocolos têm sido realizadas para reduzir esse número (por volta de 1 a 5 cromossomos), tornando o procedimento de micromanipulação menos oneroso e de mais rápida execução. (Guan et al., 1994; Christian et al., 1999; Henning et al., 2008; Cápal et al., 2015). As sondas construídas a partir de cromossomos *flow sorted* além de utilizarem muitas cópias do alvo, cerca de 500, cromossomos com conteúdo de DNA e relação de pares de bases muito semelhantes não são separados (Gribble et al., 2004).

A técnica de microdissecção foi primeiramente desenvolvida para isolar fragmentos de DNA a partir de uma região definida do cromossomo, aplicada com êxito em cromossomos politênicos de *Drosophila* (Sclaenghe et al., 1981) e posteriormente em cromossomos de camundongos (Rohme et al., 1986). A pintura cromossômica tornou-se ferramenta indispensável em estudos de citogenética comparativa, clínica e câncer (Yang et al., 2009). No entanto, a realização de procedimentos de microdissecção em plantas apresenta maiores dificuldades do que em animais em virtude da dificuldade de obtenção de cromossomos metafásicos isolados (Zhou et al., 2007).

Para a utilização dos cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos como sondas são necessárias etapas de amplificação desse DNA molde. Essa amplificação pode ser realizada por meio da técnica DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide-primed* PCR) gerando uma biblioteca de

sequências cromossomo-específicas (Hobza et al., 2004). Essa metodologia de amplificação utiliza *primers* parcialmente degenerados que se ligam aleatoriamente ao genoma durante ciclos iniciais de baixa estringência (Zhou et al., 2007). Apenas em ciclos subsequentes, sob altas temperaturas, o anelamento mais específico entre os produtos do primeiro PCR e os *primers* é realizado, explorando a maior especificidade da região 5' do *primer* degenerado (Barboux e Poirier 2001).

Essa amplificação por PCR com *primer* degenerado foi desenvolvida por Telenius et al. (1992) e pode ser utilizada para a amplificação de cromossomos de qualquer espécie. Essa ferramenta tem sido amplamente empregada para gerar sondas cromossômicas de qualidade, sendo sequências de tamanhos entre 200 e 600 pares de bases que representem todo o cromossomo, para posterior uso na metodologia de FISH (fluorescence *in situ* hybridization) (Christian et al., 1999; Barboux e Poirier, 2001; Zhou et al., 2001; Cápal et al., 2015). Além disso, o DOP-PCR é empregado em análises comparativas da estrutura genômica (Kuukasjarvi et al., 1997), genotipagem de amostras com baixa concentração de DNA (Barboux e Poirier, 2001), programas de melhoramento (Liu et al., 2004; Zhou et al., 2007), projetos de sequenciamento e mapeamento genético (Gribble et al., 2004; Lo et al., 2009).

A hibridização *in situ* é um método útil para visualizar a localização de sequências de nucleotídeos em cromossomos, núcleos interfásicos e tecidos. Essa técnica baseia-se na complementaridade das bases nitrogenadas e no fato da sonda ser antisenso em relação à sequência-alvo, propriedades que possibilitam a renaturação, sob condições específicas (estringência), da sonda

à sequência de interesse após um evento de desnaturação (Morel e Cavalier, 2001).

O interesse crescente nas técnicas de hibridização *in situ* (hibridização *in situ* fluorescente - FISH e a hibridização *in situ* genômica - GISH) reside no fato dessas metodologias ampliarem consideravelmente o nível de análise e o campo de atuação da biotecnologia. Essas ferramentas podem ser empregadas para auxiliar na identificação de pares de cromossomos homólogos nas espécies que apresentam cromossomos de tamanho e morfologia semelhantes (Leitch et al., 1994; Hamon et al., 2009); localizar sítios específicos ou marcar de forma diferencial um par de cromossomos (Leitch et al., 1994; Hamon et al., 2009); verificar a presença de sequências de DNA e possíveis rearranjos cromossômicos estruturais, auxiliando na comparação dos cariótipos em estudos de citotaxonomia e nas investigações da estrutura, função e evolução dos cromossomos e genomas (Leitch et al., 1994; Cheng et al., 2002; Lim et al., 2008; Qi et al., 2008; Lou et al., 2010).

A habilidade de criar sondas a partir de um único cromossomo apresenta considerável utilidade em uma variedade de áreas, desde citogenética médica até estudos envolvendo recombinação cromossômica (Christian et al., 1999). Segundo Hozier et al. (1996), o desenvolvimento de sondas cromossomo-específicas pode contribuir para estudos genômicos ampliando o conhecimento disponível a respeito da origem e evolução dos genomas das diferentes espécies. A possibilidade de amplificar o DNA de apenas um molde cromossômico possibilita a produção de sondas mesmo para espécies cujos cromossomos não podem ser discriminados (Šimková et al., 2008). De acordo com Doležel et al. (2014), genomas grandes consistem principalmente de

várias classes de sequências de DNA repetitivas e são caracterizados por uma enorme redundância de sequências, o que dificulta o mapeamento e sequenciamento do genoma, bem como a clonagem para posicionamento de genes. Através do isolamento cromossômico pode-se obter amostras individuais de DNA derivado de cada um dos cromossomos, cobrindo assim todo o genoma.

### *Justificativa*

A construção de sondas cromossomo-específicas envolve etapas que precisam ser cuidadosamente controladas para se obter sucesso. Para cada uma delas existem diferentes metodologias na literatura, além de protocolos que não são bem detalhados ou que não se aplicam em organismos diferentes do utilizado. A quantidade de cromossomos utilizada, a forma de coleta, as condições e o tipo de amplificação do DNA molde, a marcação fluorescente das sequências de DNA que serão utilizadas como sondas e as condições da hibridização *in situ* são passos que precisam ser definidos e padronizados um a um. Por mais que seja possível acompanhar o avanço de cada etapa citada, a ausência de um protocolo realmente reprodutível dificulta a identificação do possível motivo de não se obter uma marcação específica conforme esperado. É necessário ainda o estabelecimento de protocolos que possibilitem preparações mitóticas com elevada qualidade citogenética, cromossomos bem individualizados e alongados para aplicação tanto na microdissecção quanto na hibridização *in situ*. Considerando esse panorama de diferentes metodologias para a construção de sondas cromossomo-específicas, necessita-se comparar

e avaliar cada etapa a fim de se adequar o procedimento às condições específicas para cada situação.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo Geral**

Construção de sondas cromossomo-específicas a partir de um cromossomo isolado por microdissecção, visando aplicabilidade na identificação de pares homólogos e montagem de kariograma molecular.

### **2.2 - Objetivos específicos**

- I. Obtenção de cromossomos metafásicos e prometafásicos adequados para aplicação das técnicas de microdissecção e FISH.
- II. Padronização da técnica de microdissecção cromossômica, a fim de estabelecer a forma de coleta mais adequada de cromossomos individuais e/ou fragmentos.
- III. Adaptação de metodologias de amplificação cromossômica, adequando à construção de sondas cromossomo-específicas.
- IV. Comparação de diferentes enzimas quanto à eficiência de amplificação do molde de DNA cromossômico.
- V. Avaliação de diferentes enzimas e diferentes fluorocromos para marcação fluorescente das sondas.
- VI. Utilização de protocolo de hibridização *in situ* (FISH) em cromossomos mitóticos e meióticos para localização das sondas.
- VII. Análise, interpretação das imagens a fim de avaliar o potencial de resolução das sondas construídas.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Material Biológico**

Cromossomos humanos, utilizados como modelo citogenético para a construção de sondas, foram obtidos a partir de culturas de linfócitos armazenadas em metanol a -20 °C. Esse banco de células é mantido no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral há pelo menos 5 anos.

As sementes de milho (*Zea mays*) e pimentão (*Capsicum annuum*) foram obtidas comercialmente. As anteras foram coletadas a partir de botões florais de pimentão cultivado em casa de vegetação.

#### **3.2 - Preparação de cromossomos metafásicos provenientes do banco de metáfases humanas**

O fixador metanol absoluto foi substituído por fixador metanol:ácido acético (3:1) nas culturas de linfócitos. As lâminas foram preparadas pela técnica de gotejamento e secagem ao ar conforme descrito por Barch et al. (1997). As metáfases foram avaliadas quanto a preservação e morfologia dos cromossomos. Para microdissecção foram comparadas lâminas com e sem espalhamento dos cromossomos por movimentos manuais de secagem ao ar. As lâminas foram lavadas em água ultrapura ou solução PBS por 1 min para avaliação do efeito desses na hidratação dos cromossomos. Para a técnica de FISH as lâminas foram normalmente submetidas a secagem ao ar para espalhamento dos cromossomos.

### **3.3 - Obtenção de cromossomos mitóticos provenientes de meristemas radiculares de milho e de pimentão**

#### *Cromossomos mitóticos*

As sementes foram germinadas em placas de Petri em estufa à temperatura de 32 °C. O procedimento citogenético para obtenção de cromossomos metafásicos foi realizado conforme descrito por Abreu et al. (2008) e Carvalho et al. (2008). Meristemas radiculares das amostras foram incubados em solução contendo agentes bloqueadores do ciclo celular (colchicina, trifluralina, orizalina ou amiprofos-metil – APM) para obtenção de metáfases. O bloqueador mais efetivo e sua concentração, assim como os melhores tempos foram determinados para cada espécie vegetal.

Em seguida, as raízes tratadas foram fixadas em solução de metanol:ácido acético (3:1) e estocadas a -20 °C. A maceração das raízes foi realizada com solução enzimática de Pectinase (Sigma), Hemicelulase (Sigma) e Macerozyme (Sigma). A concentração adequada das enzimas e o tempo de reação foram adaptados para cada espécie vegetal. Após esse procedimento, o material foi fixado em metanol:ácido acético (3:1) e armazenado a -20°C, permanecendo até o preparo da lâmina.

#### *Cromossomos meióticos*

Os cromossomos meióticos de pimentão foram obtidos a partir do tratamento de fixação e digestão de anteras de botões florais recém-coletados. Após a coleta, os botões foram fixados em três tipos de fixador: metanol ácido acético 3:1, etanol 70% e metanol 100% a -20°C.

As anteras fixadas passaram por dois processos de digestão enzimática. Inicialmente, foram digeridas com a enzima Pectinase por 90 minutos em banho-maria a 34 °C. Em seguida, as anteras foram lavadas e maceradas em água destilada para liberar os meiócitos. O material foi então submetido a uma segunda digestão com a enzima Pectinase, porém na proporção 4:10, enzima e água, respectivamente. Após a segunda digestão, o material foi fixado em metanol: ácido acético 3:1 e armazenado em metanol 100% a -20°C até o momento do preparo das lâminas. Estas foram preparadas pela técnica de gotejamento e secagem ao ar, segundo adaptação da técnica desenvolvida por Carvalho e Saraiva (1993).

### **3.4 – Microdissecção cromossômica**

As lâminas contendo cromossomos metafásicos morfologicamente preservados foram empregadas para a micromanipulação. Foram avaliadas lâminas submetidas e não submetidas à secagem por movimentos manuais ao ar. Foi utilizado um microscópio invertido de contraste de fase IX70 (Olympus <sup>TM</sup>), com objetiva LUCPlanFLN – UIS 2 60X / 0,70 Ph2 acoplado a um micromanipulador Eppendorf TransferMan<sup>®</sup>. Para a remoção dos cromossomos foram empregadas microagulhas de vidro Femtotips<sup>®</sup> (Eppendorf) estéreis de diâmetro apropriado. Testes de umidade relativa do ar no ambiente foram realizados, variando de 40% até 80% (de 10 em 10) para determinação da condição ideal para remoção do cromossomo. As lâminas variaram de totalmente desidratadas até uma condição úmida para avaliar o efeito no processo de captura. O cromossomo humano número 2, considerado de fácil

identificação, foi capturado para uso como padrão. Para milho foi coletado um cromossomo de tamanho relativo grande e de pimentão um cromossomo relativamente médio. Cada cromossomo foi transferido para um microtubo estéril individual de 0,2 ml contendo 0,1 µl de solução de coleta (Tris-HCl 10mM pH 7,5, NaCl 10mM, EDTA 1mM, SDS 0,1%, Triton X-100 0,1%, Glicerol 30%, Proteinase-K (Sigma) 1,44 mg/ml) também estéril. Os tubos foram mantidos por 2 horas a 60°C para ação da Proteinase-K, seguido pela inativação a 80°C por 20 minutos. A cabine de microdissecção foi previamente esterilizada e todos os passos foram realizados utilizando pipetas estéreis com filtro em cabine de segurança biológica irradiada com UV.

### **3.5 – Amplificação dos cromossomos microdissectados**

Após a desproteinização de cada cromossomo, as amostras foram submetidas à amplificação por PCR utilizando *primers* degenerados 5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3' descritos por Telenius et al., (1992). As enzimas USB® Sequenase Version 2.0 DNA Polymerase (Affymetrix), Thermo Sequenase DNA Polymerase (GE), Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) foram comparadas quanto à eficiência de amplificação a partir de um único cromossomo. Os programas de amplificação do DNA alvo foram adaptados a partir de Christian et al., (1999) e Yang et al., (2009). Foram avaliadas as temperaturas de anelamento do primer, tempo de anelamento, rampa de variação entre anelamento e extensão, número de ciclos de baixa stringência e tempo de extensão respeitando as especificações recomendadas para cada enzima avaliada. Todas as etapas de pipetagem dos reagentes foram realizadas em câmara de fluxo estéril irradiada com UV e

utilizando ponteiras de filtro estéril. Os produtos do DOP-PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e quantificados com auxílio dos equipamentos NanoDrop® (Invitrogen) e Qubit® (Thermo Fisher Scientific). Todos os passos de pipetagem foram realizados em câmara de fluxo irradiada com UV e utilizando pipetas estéreis com filtro.

### **3.6 - Marcação da sonda com nucleotídeo fluorescente**

A marcação fluorescente do DNA foi realizada empregando o método *random primer*. Dez enzimas - Thermo Sequenase DNA Polimerase (GE), Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma), Unitaq DNA Polimerase (Uniscience), Pht Taq DNA Polimerase (Phoneutria), AmpliTaq® DNA Polymerase (ThermoFisher), Klenow Fragment (Takara), Hemo KlenTaq® (BioLabs) Bst DNA Polymerase (BioLabs), Platinum® Tfi Exo(-) DNA Polymerase (Invitrogen) - e dois tipos de nucleotídeos acoplados a fluorocromos - Tetramethyl-rhodamine 5-dUTP (Roche) e ChromaTide® Alexa Fluor® 488-5-dUTP (Life Technologies) foram testados quanto à eficácia de incorporação na molécula de DNA. Os produtos da marcação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Quando a sonda foi marcada com Tetramethyl-rhodamine 5-dUTP (Roche), o gel de agarose foi corado com SYBR® Green (Sigma); quando o DNA foi marcado utilizando ChromaTide® Alexa Fluor® 488-5-dUTP (Life Technologies), o gel de agarose foi corado com Gel Red™ (Uniscience) para contraste de fluorescência.

### **3.7 – FISH**

Lâminas contendo preparações cromossômicas com pouco ou nenhum citoplasma ao redor, sem sobreposição e com níveis de compactação adequados foram selecionadas para utilização da técnica de FISH. A mistura de hibridização consistiu de 200 ng de sonda, 1,0 ug de DNA competidor, 50% de formamida, 10% de dextran sulfato e SSC 2X. As lâminas foram tratadas em tampão PBS, formalina e série alcoólica gelada. A desnaturação dos cromossomos foi realizada em solução de 70% formamida/SSC 2X em banho-maria a 72 °C. A mistura de hibridização foi desnaturada em termociclador a 85 °C por 5 minutos e transferida para gelo imediatamente. Após 5 minutos foi colocada sobre a lâmina, coberta com lamínula de plástico HybriSlip™ (Sigma) e seladas com Rubber Cement (Elmer's). O processo de hibridização foi realizado no ThermoBryte™ (ThermoFisher) a 37°C por 24 horas. Após esse período foram conduzidas as lavagens de estringência em três soluções de formamida 50%/SSC 2X e em uma de SSC 2X a 45 °C por 5 min cada. As lâminas foram contracoradas com DAPI, montadas com glicerol 40%/PBS, lamínula de vidro, seladas com esmalte incolor e analisadas em microscópio de epifluorescência.

### **3.8 – Análise dos dados**

As lâminas foram observadas em fotomicroscópio Olympus™; modelo BX60, equipado com epifluorescência, acessórios de análise de imagem e com objetiva de imersão de 100X/AN 1.4. As imagens foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora. As análises dos cromossomos foram realizadas

usando os Programas Image ProPlus 6.1 (Media Cybernetics) e Image SXM de domínio público.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – *Preparações cromossômicas*

As lâminas preparadas a partir das culturas de linfócitos armazenadas apresentaram grande quantidade de metáfases contendo cromossomos espalhados, sem sobreposições, com morfologia preservada, em diferentes níveis de compactação e com pouco citoplasma ao redor. Em virtude desses aspectos, os cromossomos foram considerados adequados para os processos de microdissecção e FISH.

Cromossomos mitóticos de milho e pimentão com morfologia preservada e compactação adequada para microdissecção foram obtidos utilizando 3  $\mu$ M de APM por 4 h e 3  $\mu$ M de APM por 3 h, respectivamente. Usando o procedimento de dissociação celular foram obtidos cromossomos bem espalhados, com pouco citoplasma ao redor, sem danos ou sobreposição na cromatina.

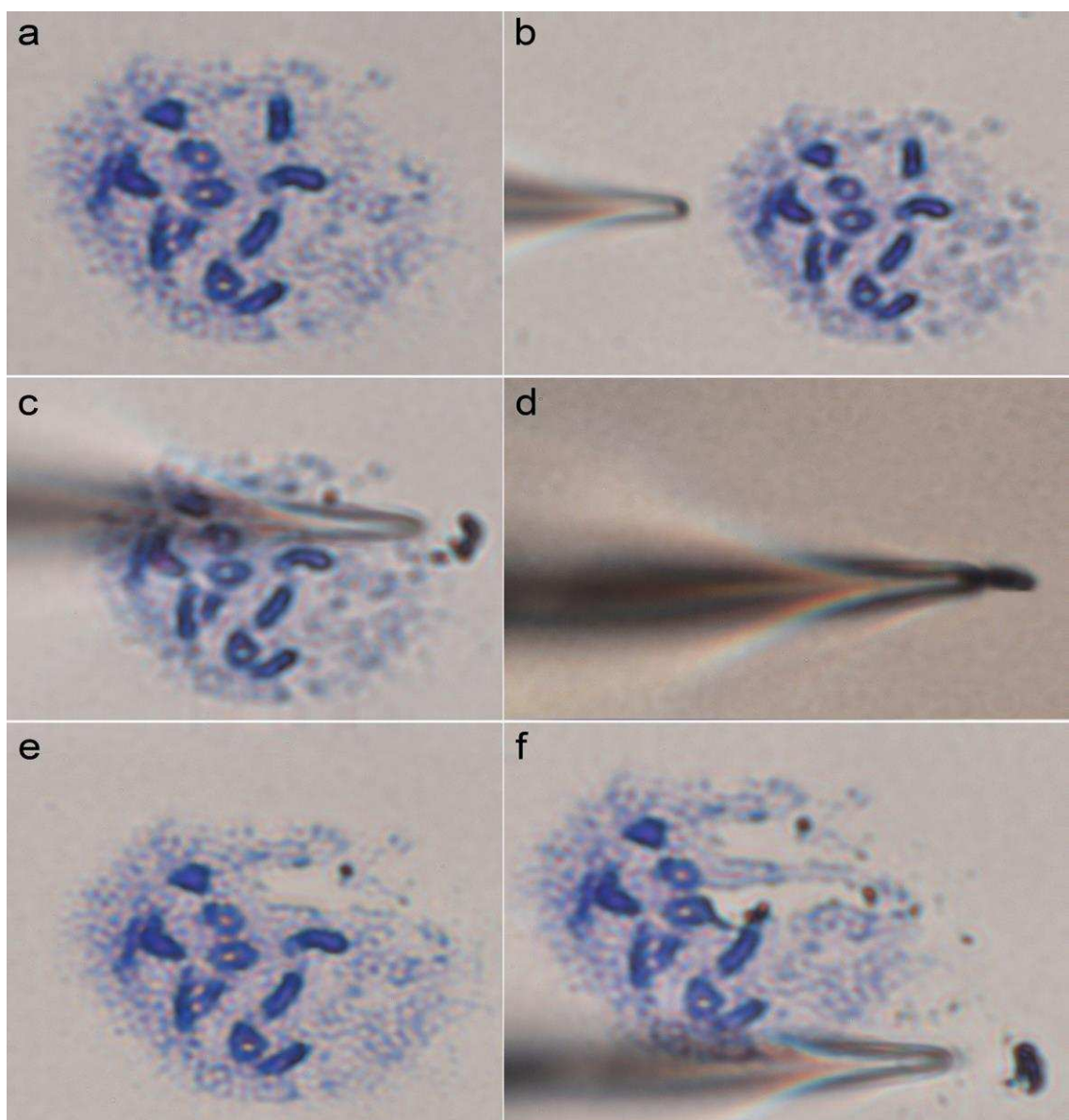
Cromossomos meióticos de pimentão nos estágios de diplóteno e metáfase I morfologicamente preservados foram obtidos a partir de botões florais com 3,0 cm de diâmetro, em média. O método de digestão e gotejamento foi adequado para o preparo das lâminas, apresentando cromossomos bem espalhados, sem sobreposição e pouco citoplasma ao redor (Figura 1).

### 4.2 - *Microdissecção*

A eliminação da etapa de secagem ao ar na técnica de preparo das lâminas contribuiu para que os cromossomos não ficassem fortemente

aderidos à lâmina e fossem facilmente microdissectados. A lavagem das lâminas em tampão PBS e a manutenção da umidade relativa do ar em torno de 70% possibilitaram a hidratação dos cromossomos para remoção dos mesmos sem perda de fragmentos.

A Figura 1 ilustra o processo de microdissecção em cromossomos meióticos de pimentão. Os cromossomos foram corados com Giemsa apenas para essa etapa de documentação.



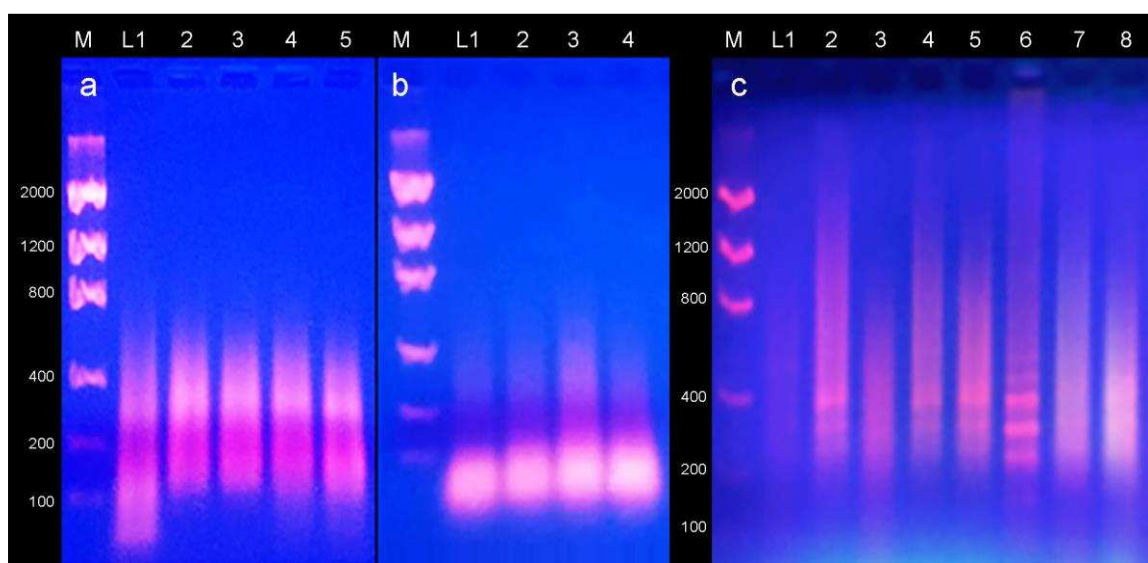
**Figura 1.** Microdissecção cromossômica de bivalentes no estágio de diplóteno de *C. annuum*. Os cromossomos foram corados com Giemsa. **a)** Cromossomos na

fase de diplóteno. **b)** Microagulha de vidro se aproximando dos cromossomos. Observa-se dois planos de foco, o da lâmina e o da microagulha. **c)** Microagulha removendo um bivalente da lâmina. **d)** Cromossomo aderido à extremidade da microagulha. **e)** Diplóteno evidenciando a região correspondente ao cromossomo removido pela microdissecção. **f)** Segunda etapa de remoção cromossômica.

#### 4.3 – *Tratamento com Proteinase K e Amplificação*

As condições de amplificação que resultaram em quantidade satisfatória de DNA (Figura 2a) foram 95°C por 5 min, 10 ciclos de 94 °C 1 min, 30 °C 2,5 min, rampa de 0,1° C/s até 72 °C, 72 °C por 3min, 30 ciclos de 94 °C 1min, 62 °C 1,5 min, 72 °C, 2,5 min e extensão final de 72 °C 8 min para as enzimas termoestáveis. Para a enzima Sequenase DNA Polymerase as condições de amplificação foram 92 °C 5 min, 8 ciclos de 25 °C 2 min, 34 °C 2 min, 90 °C 1 min seguido da segunda etapa do protocolo citado acima (Figura 2b). Duas sequências de amplificações foram suficientes para gerar uma quantidade de DNA em torno de 300 ng/μl. A primeira reação foi realizada num volume final de 6 μl e a segunda em 50 μl, aproveitando o volume da primeira. O DOP-PCR utilizando a enzima Thermo Sequenase gerou fragmentos que variaram de 100 a 900pb (Figura 2a); utilizando a USB® Sequenase Version 2.0 DNA Polymerase os fragmentos ficaram entre 100 e 600pb (Figura 2b) conforme observado no gel de agarose 1,5%.

As enzimas Thermo Sequenase DNA Polimerase (GE) e Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) amplificaram um único cromossomo (Figura 2a e b); entretanto, a enzima AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma) não amplificou.



**Figura 2.** Produtos do DOP-PCR analisados em gel de agarose 1,5%. Linha M representa o marcador de pares de bases e as linhas 1-8 representam a amplificação de diferentes cromossomos microdissectados. **a.** Cromossomos humanos (colunas L1, 2 e 3 no gel) e de milho (colunas 4 e 5 no gel) amplificados com as enzimas Thermo Sequenase DNA Polimerase (GE) e Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), respectivamente. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 100-900pb. **b.** Cromossomos humanos (colunas L1 e 2) e de milho (colunas 3 e 4) amplificados com a enzima USB® Sequenase Version 2.0 DNA Polymerase. Os fragmentos variaram de 100 a 600pb. **c.** Fragmentos de DNA provenientes de cromossomos amplificados de humano (colunas 2, 4, 6 e 8) e milho (colunas L1, 3, 5 e 7) marcados com Chroma Tide Alexa Fluor 5-dUTP. Colunas L1 e 2 foram marcados com a enzima AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma), colunas 3 e 4 enzima Platinum® Tfi Exo(-) DNA Polymerase (Invitrogen), colunas 5 e 6 enzima Pht Taq DNA Polimerase (Phoneutria) e colunas 7 e 8 enzima Thermo Sequenase DNA Polimerase (GE).

#### 4.4 – Marcação fluorescente

Considerando a marcação fluorescente, das 10 enzimas avaliadas, 4 delas não incorporaram ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP nas sequências de DNA (Tabela 1) e o FISH não apresentou resultado positivo; 6 enzimas incorporaram o fluorocromo (Tabela 1) durante a marcação por PCR e

apresentaram marcação específica no FISH. Os resultados foram semelhantes para os dois fluorocromos avaliados. A sonda gerada pela Thermo Sequenase DNA Polimerase (GE) apresentou relativamente maior intensidade fluorescente tanto no gel quanto na hibridização *in situ* (Figura 2c e Figura 2).

Tabela 1. Enzimas utilizadas para marcação fluorescente das sequências de DNA obtidas por amplificação de um cromossomo.

| Enzimas                                                             | Característica                           | Fluorocromo                                               | Incorporação por fluorocromo |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------|
| AmpliTa <sup>®</sup> DNA Polymerase (ThermoFisher)                  | Alta fidelidade                          | ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP                             | -                            |
| Bst DNA Polymerase (BioLabs)                                        | Amplificação por deslocamento da fita    | ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP                             | -                            |
| Platinum <sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) | Alta fidelidade                          | ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP                             | -                            |
| Klenow Fragment (Takara)                                            | Não apresenta correção 5'-3'             | ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP                             | -                            |
| Pht Taq DNA Polimerase (Phoneutria)                                 | Baixa fidelidade                         | ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP                             | ++                           |
| Hemo KlenTaq <sup>®</sup> (BioLabs)                                 | Não apresenta correção 5'-3'             | ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP                             | ++                           |
| Unitaq DNA Polimerase (Uniscience)                                  | Alta fidelidade                          | ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP                             | ++                           |
| AccuTaq <sup>™</sup> LA DNA Polymerase (Sigma)                      | Alta fidelidade                          | ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP                             | ++                           |
| Thermo Sequenase DNA Polimerase (GE)                                | Alta fidelidade                          | Tetrametilrhodamina 5-dUTP/ ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP | +++ / +++                    |
| Platinum <sup>®</sup> Tfi Exo(-) DNA Polymerase (Invitrogen)        | Não apresenta correção 3'-5' e nem 5'-3' | ChromaTide Alexa Fluor 5-dUTP                             | ++                           |

- nenhuma intensidade de fluorescência relativa no gel e no FISH

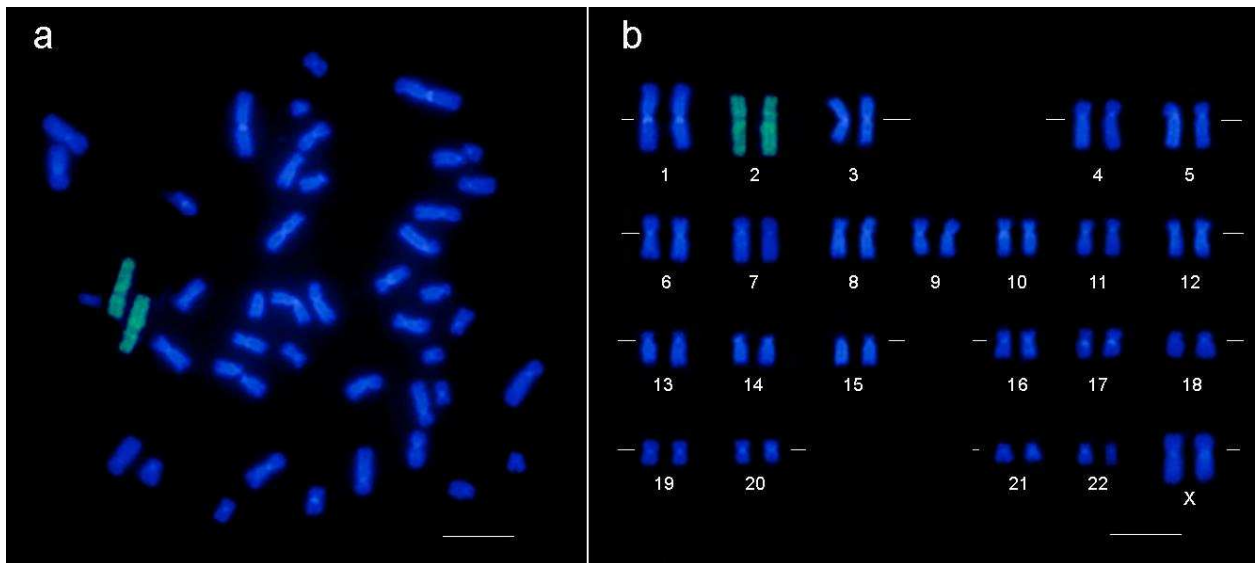
++ intensidade da fluorescência relativamente média no gel e no FISH

+++ intensidade da fluorescência relativamente alta no gel e no FISH

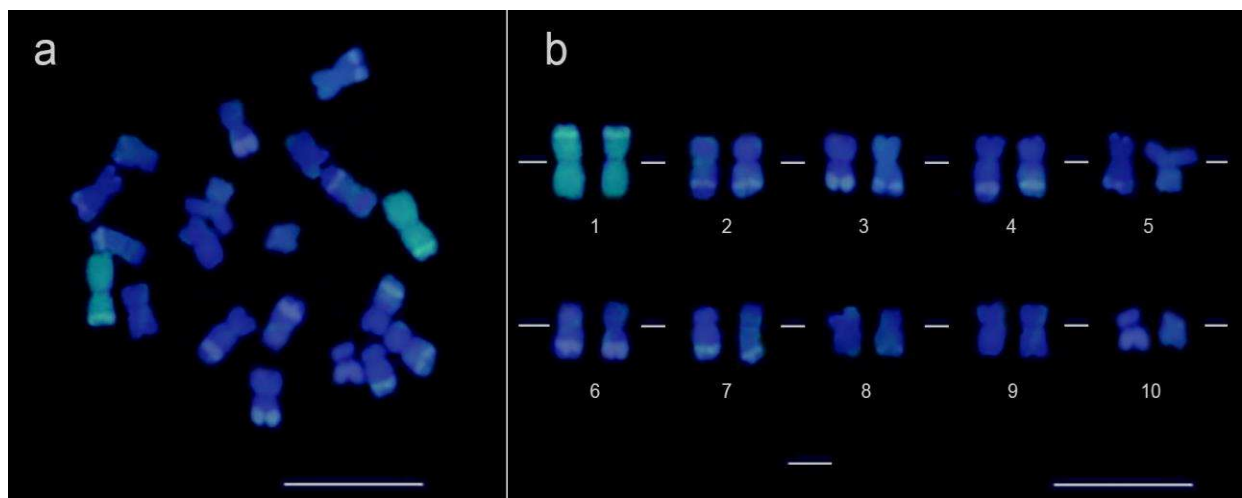
#### 4.5 - FISH

Uma sonda cromossomo-específica foi obtida para o par 2 do cariótipo humano. As condições de estringência no FISH (em torno de 82%) possibilitaram observar marcação de um par específico de forma homogênea e ao longo de todo o cromossomo, com pouco ou nenhum background (Figura 3a e b). Cerca de 95% das metáfases e núcleos apresentaram marcação, demonstrando a reprodutibilidade e eficiência da sonda construída.

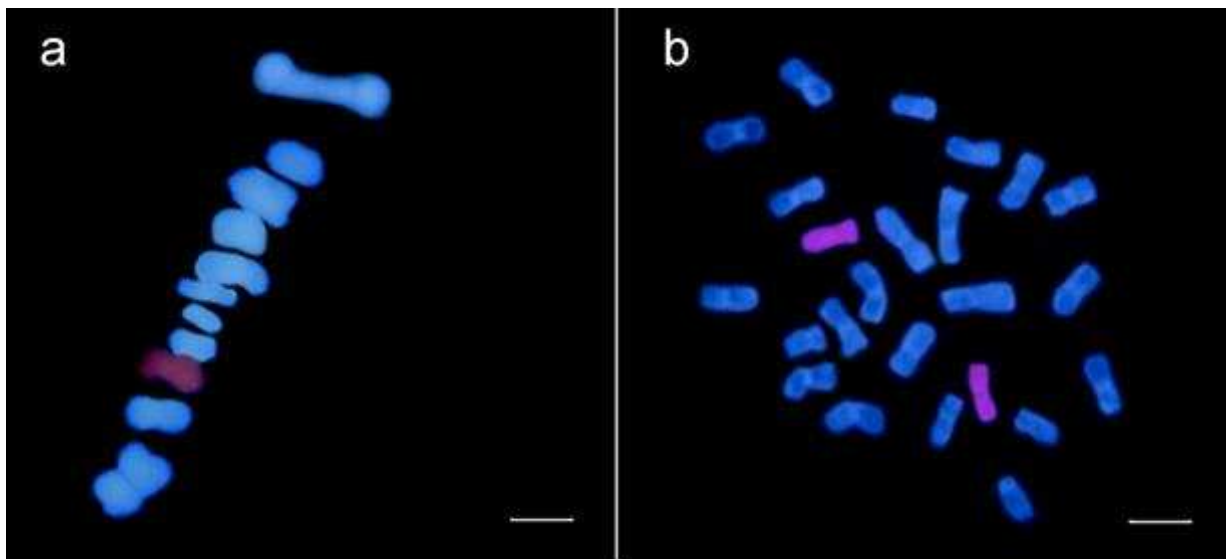
Uma sonda cromossomo-específica foi obtida para pimentão (*Capsicum annuum*). O FISH, realizado nas mesmas condições de estringência de 82%, mostrou marcação em um par específico de cromossomos meióticos em Metáfase I e mitóticos (Figuras 5a e b). A hibridização ocorreu provavelmente no par 7 ou 8. Também foi obtida uma sonda cromossomo-específica para milho (*Zea mays*) para o par de homólogos 1 (Figura 4a e b). Foram visualizadas pelo menos dez metáfases marcadas por lâmina, demonstrando a reprodutibilidade das sondas. Entretanto, para ambas as plantas foi observada uma eficiência de marcação de 65-80% ao longo das lâminas.



**Figura 3.** Hibridização *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos provenientes de cultura de linfócitos humanos. A sonda cromossomo-específica foi marcada com Chroma Tide Alexa Fluor 5-dUTP (verde) e a contracoloração realizada com DAPI. **a.** Metáfase de indivíduo feminino mostrando a marcação em um par de cromossomos. **b.** Cariograma de indivíduo feminino evidenciando o par 2 marcado com a sonda cromossomo-específica. Barra = 10µm.



**Figura 4.** Hibridização *in situ* fluorescente de sonda cromossomo-específica em cromossomos de milho (*Z. mays*). Observar o par marcado em verde (Chroma Tide Alexa Fluor 5-dUTP). Os cromossomos foram contra corados com DAPI e o padrão de bandas foi provocado pela desnaturação térmica e química da técnica de FISH. **a.** Metáfase mostrando um par de cromossomos marcados com a sonda construída. **b.** Cariograma evidenciando o par 1 de milho marcado com a sonda cromossomo-específica. Barra = 10 µm.



**Figura 5.** Hibridização *in situ* fluorescente de sondas cromossomo-específicas em cromossomos de pimentão (*C. annuum*). Observar o par marcado em vermelho (Tetramethylrhodamine-5-dUTP). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI. **a.** Par de cromossomos meióticos em metáfase I marcados por FISH. **b.** Metáfase mostrando um par de cromossomos mitóticos marcados por FISH. Barra = 5µm.

## 5 - DISCUSSÃO

Mesmo utilizando estratégias diferentes para a obtenção dos cromossomos humanos e de plantas, os esforços para padronização de cada protocolo proporcionaram metáfases morfológicamente adequadas e preservadas, contendo cromossomos sem sobreposição, bem definidos nos centrômeros e nas extremidades, individualizados e uma menor condensação da cromatina. Tais características foram essenciais para o sucesso na construção de sondas cromossomo-específicas. As metáfases provenientes do banco de linfócitos humanos são oriundas de culturas de células já padronizadas e foi avaliado se elas, apesar de armazenadas há longo período, atendiam aos requisitos de morfologia e preservação dos cromossomos. O tempo de estocagem do material aparentemente não interferiu e os cromossomos foram considerados adequados para microdissecção e FISH, conforme marcação da sonda. Para milho e pimentão, foi testado o melhor antitubulínico, sua concentração e tempo de ação. O bloqueador APM foi efetivo para as duas plantas, em concentrações e tempo específicos para cada espécie. Desde sua primeira descrição por Morejohn e Fosket (1984), o antitubulínico APM vem sendo utilizado com sucesso por diversos autores. Doležel et al. (1992) relataram acúmulo de metáfases apropriadas para caracterização morfológica a partir de meristema radicular em *Vicia fabba* (L.) utilizando esse bloqueador. Clarindo and Carvalho (2006) também utilizaram APM e consideraram adequado para obtenção de metáfases com condensações variadas na espécie *Coffea canephora*, cujo cariótipo era anteriormente considerado homomórfico. De acordo com Planchais et al.

(2000), para cada espécie vegetal, é necessário avaliar rigorosamente e monitorar a concentração e tempo de ação dos agentes inibidores de microtúbulos para se obter cromossomos metafásicos de qualidade.

O preparo das lâminas por meio da técnica de dissociação celular enzimática seguida da secagem ao ar resultou em cromossomos sem sobreposição, bem espalhados e com pouco *background*. Carvalho e Saraiva (1993) propuseram esse método para milho e obtiveram cromossomos com morfologia mais bem preservada comparado à técnica de esmagamento. Sabe-se que os cromossomos obtidos por esmagamento apresentam deformações na morfologia, não espalham suficientemente na lâmina e pode haver perda de material na remoção da lamínula, desvantagens para a microdissecção e FISH. A qualidade e morfologia preservada dos cromossomos obtidos dispensou a necessidade de coloração prévia com Giemsa para identificação dos cromossomos. Conforme relatado por Christian et al., (1999) apesar da coloração auxiliar na identificação, também pode ser uma fonte de contaminação, o que deve ser evitado nos procedimentos de construção de sondas cromossomo-específicas. De acordo com Houben (2012), a qualidade do DNA microdissectado depende do pré-tratamento, fixação do cromossomo e coloração das amostras. Engelen et al., (1998) e Houben et al., (2001) recomendaram um contato mínimo do material com ácido acético já que essa substância provoca a depurinação do DNA. Esses autores sugerem lavar as lâminas após o preparo e antes da microdissecção. Zhou et al., (1999) fixaram o material por apenas 10 minutos em metanol:ácido acético, transferiram para etanol 70% por pelo menos um dia e prepararam as lâminas utilizando água bidestilada ao invés de ácido acético 45% para evitar depurinação e danos

mecânicos ao DNA. Entretanto, essa fixação em etanol 70% prejudica a dissociação celular e os cromossomos apresentam aspecto refringente, condições consideradas inadequadas para microdissecção e FISH.

As condições para uma microdissecção relativamente adequada, onde toda a integridade cromossômica é preservada, foram determinadas considerando se os cromossomos estavam adequadamente hidratados. Foi observado que cromossomos muito ressecados se tornam quebradiços e se esfarelam na tentativa de remoção. Cromossomos muito hidratados apresentam aspecto gelatinoso e não se aderem à microagulha. A lavagem da lâmina em PBS possibilitou a hidratação considerada ideal do material e a umidade relativa do ar em torno de 60-70% evitou o ressecamento da lâmina durante a microdissecção. Essas estratégias facilitaram a remoção de um cromossomo inteiro, sem perdas de fragmentos visíveis e asseguraram uma aderência adequada do material na microagulha de coleta, garantindo uma transferência segura para o microtubo, tanto para humano quanto para plantas. Engelen et al. (1998) utilizaram uma 5 µl de água ultra pura em cima do cromossomo alvo para reidratá-lo. Entretanto esse método atrapalha a visualização do cromossomo e a remoção do mesmo é prejudicada pela camada de água. Christian et al., (1999) lavaram a lâmina em solução de SSC 4X antes da microdissecção. Essa estratégia não é considerada adequada já que o excesso de sal dificulta a visualização e impossibilita a remoção do cromossomo.

Houve a necessidade de um tratamento enzimático para remoção das proteínas da cromatina antes da amplificação por PCR e o melhor resultado foi utilizando Proteinase K. Foi realizada a transferência direta do cromossomo

para o próprio microtubo de PCR contendo 0,1 µl de solução de coleta, a fim de evitar etapas extras de manipulação do material e diminuir chances de contaminação com DNA exógeno. O pouco volume foi a fim de aumentar a probabilidade de encontro da enzima com o cromossomo e evitar que a solução de coleta interferisse na solução de PCR. Meltzer et al., (1992) transferiram 25-50 cromossomos para 20 µl de solução contendo essa enzima. Segundo Christian et al., (1999), uma vantagem de se capturar um único cromossomo está na redução de uma potencial contaminação, uma vez que o microtubo necessita ser aberto apenas uma vez. Weimer et al., (1999), Henning et al., (2008) também utilizaram Proteinase K, mas o tratamento foi realizado em uma micropipeta coletora contendo 0,3 µl de solução. Entretanto, o tempo de ação da enzima nessas condições aumenta as chances de contaminação do material. Guan et al., (1993) utilizaram a enzima Topoisomerase para remover as torções do DNA e Engelen et al., (1998) relataram que foi possível solubilizar o DNA apenas com ciclos de temperaturas alternando 30°C e 50°C por 30 minutos. Entretanto, essas alternativas não se repetem na literatura.

A utilização de *primer* degenerado representa um avanço na amplificação de um dado cromossomo já que não se necessita conhecer a sequência do alvo. Entretanto, o DOP-PCR para a construção de sondas envolve etapas críticas, tais como temperatura e tempo de anelamento, rampa entre anelamento e extensão, número de ciclos e volume da reação, bem como a enzima utilizada. Segundo Vega et al., (1994), o DOP-PCR é relativamente simples e não necessita de etapas com enzimas de restrição ou adaptadores. Embora a amplificação preferencial de algumas sequências não possa ser

descartada, o padrão obtido no FISH fornece evidência direta do sucesso da amplificação ao longo de todo o molde de DNA microdissectado. De acordo com Christian et al., (1999), preferências sutis no anelamento do primer durante os ciclos iniciais de baixa estringência podem produzir assimetrias durante a amplificação, resultado em cobertura incompleta da sonda. Yang et al. (2009) consideraram que nem todas as *Taq* polimerases funcionam bem para DOP-PCR de cromossomos, sendo necessário adequar desde a enzima até os componentes críticos do tampão de reação. Guan et al., (2003) ressaltaram que para a iniciação do PCR, que é a fase mais crítica quando se utiliza DNA dissecado, as enzimas termoestáveis não são tão eficientes já que o anelamento ideal do primer degenerado é a 30 °C.

A marcação fluorescente direta do tipo *random primer*, aproveitando o mesmo iniciador degenerado das amplificações, foi efetiva para as sequências de DNA humano e das plantas utilizadas. Foi observado que seis diferentes enzimas marcaram adequadamente as sondas, mostrando a versatilidade da técnica. A possibilidade de se optar por uma dessas enzimas na incorporação do fluorocromo permite redução no custo da técnica e facilita a adaptação da metodologia por outros laboratórios. Telenius et al., (1992) propuseram o uso do DOP-PCR para marcação das sondas empregando a segunda etapa do ciclo e encontraram resultados satisfatórios para marcação em humanos, rato e drosófila. De acordo com Koch (2003), a escolha do fluorocromo e do tipo de marcação vai interferir diretamente no nível de *background* e na qualidade da sonda, sendo necessário comparar diferentes métodos a fim de se encontrar um resultado aceitável. Morrison et al. (2003) consideraram a marcação por PCR apropriada para limitar o tamanho das sondas entre 200-600 pares de

bases, tamanhos considerados ideais para uma performance adequada no FISH. Entretanto, Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000) ressaltaram que todos os parâmetros críticos intrínsecos da técnica de PCR devem ser também avaliados cuidadosamente na marcação fluorescente por *random primer*, podendo tornar o método exaustivo.

A utilização de um único cromossomo para construção da sonda representa vantagens quanto à diminuição do esforço de micromanipular e à ausência da necessidade de classificação prévia do cromossomo alvo. Os primeiros trabalhos envolvendo microdissecção utilizavam cerca de 100 cópias do cromossomo, tornando o processo laborioso, além da necessidade de muitas metáfases na lâmina e de classificação do cromossomo. Para algumas espécies vegetais, cujos cariótipos são considerados homomórficos, a utilização de um único cromossomo representa um enorme avanço na construção de sondas específicas, diminuindo o esforço, o custo e as chances de erro na captura. De acordo Zhou et al., (1999), muitos autores escolhem plantas contendo cromossomos com características morfológicas proeminentes, como o maior ou o menor, a fim de facilitar a identificação. Weimer et al., (1999) consideraram que utilizar múltiplas cópias de cromossomos aumenta o risco de erros relacionados a identificação errônea que pode resultar em contaminação cruzada, comprometendo a qualidade da sonda. De acordo com Christian et al., (1999), dentre as possíveis razões da necessidade de coletar múltiplos cromossomos para construir uma biblioteca de sondas suficientemente complexa, uma delas é a dificuldade de microdissectar um cromossomo inteiro e garantir que toda a cromatina tenha sido transferida para o tubo.

A sonda obtida para o cromossomo humano número 2 apresentou sinal forte de marcação e alta reprodutibilidade no FISH. A marcação do par maior de milho também foi coerente com a microdissecção de um cromossomo considerado grande. A sonda obtida para pimentão apresentou marcação específica, mas o cariótipo muito similar dificultou diferenciarmos entre o par 7 e 8 na marcação. Abreu et al., (2008) já havia relatado o alto grau de similaridade morfológica entre alguns cromossomos de pimentão, inclusive os pares 7 e 8. As sondas cromossomo-específicas obtidas tanto para humano quanto para plantas mostraram-se complexas, com sinal uniforme sem *spots* individuais. De acordo com Christian et al., (2002) a uniformidade na marcação é um parâmetro adequado para avaliação da complexidade da sonda. Nós identificamos pouco ou nenhuma hibridização cruzada. Guan et al., (1994) sugerem evitar microdissectar regiões contendo sequências altamente repetitivas a fim de se evitar marcações inespecíficas em cromossomos indesejados.

## **6. CONCLUSÃO**

Nossos resultados demonstraram que, apesar da construção de sondas cromossomo-específicas ser uma metodologia extensa e desafiadora, a padronização de cada etapa possibilitou, dentro das nossas condições, a marcação específica a partir de um único cromossomo para humano, milho e pimentão. A microdissecção, transferência para o tubo e a comparação de diferentes parâmetros no DOP-PCR foram consideradas como as etapas mais críticas do processo. A qualidade das preparações cromossômicas foi um fator crucial para aplicação das metodologias de microdissecção e FISH. Cromossomos, tanto de humano quanto de plantas, com morfologia e estrutura preservadas proporcionaram um molde de DNA adequado para a construção de sondas.

A eficiência das sondas foi relativamente maior em humanos, conforme esperado para um modelo já bastante utilizado, principalmente no campo da citogenética molecular médica. Em plantas, tanto a heterogeneidade das lâminas, inerente da preparação, quanto a deficiência de metodologia reprodutível podem ter sido responsáveis por uma eficiência relativamente menor na hibridização. Embora tenhamos realizado a padronização para as nossas condições considerando nossos equipamentos e reagentes, esperamos que nossas metodologias sirvam como base para que outros pesquisadores possam também otimizá-las e aplicá-las em espécies vegetais, difundindo a construção de sondas cromossomo-específicas em plantas.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu IS, Carvalho CR, Clarindo WR. Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. *Plant Cell Rep.* 27: 1227-1233, 2008.

Barbaux S, Poirier O. Use of degenerate nucleotide primed PCR (DOP-PCR) for the genotyping of low-concentration DNA samples. *J. Mol. Med.* 79: 329-332, 2001.

Barch, M.J.; Knustsen, T.; Spurbeck, J.L. The AGT cytogenetics laboratory manual. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

Cai Q, Zhang D, Liu Z-L, Wang X-R. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Ann Bot* 97:715–722, 2006.

Cápal P., Blavet N., Vrána J., Kubaláková M., Doležel J. Multiple displacement amplification of the DNA from single flow sorted plant chromosome. *The Plant Journal*, 84, 4 838–844, 2015.

Carvalho CR, Saraiva LS. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique in maize chromosomes. *Heredity* 70: 515-519, 1993.

Carvalho CR, Clarindo WR, Praça MM, Araújo FS, Carels N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Science*, 174: 613-617, 2008.

Cheng Z, Buell CR, Wing RA, Jiang J. Resolution of fluorescence *in-situ* hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. *Chromosome Res.* 10:379-387, 2002.

Christian AT, Garcia HE, Tucker JD. PCR *in situ* followed by microdissection allows whole chromosome painting probes to be made from single microdissected chromosomes. *Mamm. Genome* 10: 628-631, 1999.

Christian AT, Pattee MS, Marchetti F. Meiotic chromosomes as templates for microdissection. *Chromosome Research* 10: 45-48, 2002.

Clarindo WR & Carvalho CR. A high quality chromosome preparation from cell suspension aggregates culture of *Coffea canephora*. *Cytologia*, 71:243-249, 2006.

D'Hont A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. *Cytogenet Genome Res* 109:27–33, 2005.

Deng HX, Yoshiura KI, Dirks RW, Harada N, Hirota T, Tsukamoto K, Jinno Y, Niikawa N. Chromosome-band-specific painting: chromosome *in situ* suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as a probe tool. *Hum Genet*: 89:13-17, 1992.

Doležel J, Čížalíková J, Lucretti S A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. *Planta* 188: 93–98, 1992.

Doležel, J., Vrána, J., Cápál, P., Kubaláková, M., Burešová, V. and Šimková, H. Advances in plant chromosome genomics. *Biotechnol Adv* 32, 122-136, 2014.

Engelen JJ, Albrechts JC, Hamers GJ, Geraedts JP. A simple and efficient method for microdissection and microFISH. *J Med Genet* 35, 65–268, 1998.

Gribble S, Bee NL, Prigmore E, Burford DC, Carter NP. Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Res.* 12: 143-151, 2004.

Guan XY, Trent JM, Meltzer PS. Generation of band-specific painting probes from a single microdissected chromosome. *Hum Mol Genet* 2, 1117–1121, 1993.

Guan XY, Meltzer PS, Trent JM. Rapid generation of whole chromosome painting probes (WCPs) by chromosome microdissection. *Genomics* 22: 101-107, 1994.

Guerra, M. Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: Guerra, M. (Ed.). FISH: conceitos e aplicações na citogenética. 1. ed. Brasil: Sociedade Brasileira de Genética, 176 p., 2004.

Hamon P, Siljak-Yakovlev S, Srisuwan S, Robin O, Poncet V, Hamon S, de Kochko A. Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. *Chromosome Res.* 17(3): 291-304, 2009.

Harper IC, Cande WZ. Mapping a new frontier: development of integrated cytogenetics maps in plant. *Funct Integrat Genomics* 1: 89-98, 2000.

Henning F, Trifonov V, Toledo LFA. Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. *Gent. Mol. Biol.* 31(1): 279-283, 2008.

Hobza R, Lengerova M, Cernohorska H, Rubes J, Vyskot B. FAST-FISH with laser beam microdissected DOP-PCR probe distinguishes the sex chromosomes of *Silene latifolia*. *Chromosome Res* 12: 245-250, 2004.

Houben A, Field BL, Saunders VA. Microdissection and chromosome painting of plant B chromosomes. *Methods in Cell Science* 23: 115–124, 2001.

Houben A, Carchilan M. Plant B chromosomes – What makes them different?, pp. 345 in *Plant Cytogenetics: Genome Structure and Chromosome Function*, ed H. W. BASS e J. A. BIRCHLER. Springer-Verlag, Nova York, 2012.

Hozier JC, Hall BK, Sims KR, Liechty MC, Chen-Liu L, Davis LN. Chromosome microdissection-based techniques for genome analysis. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 9: 74-83, 1996.

Koch J. Primed *in situ* labeling. Chapter 6, 77-84. *Molecular Cytogenetics: Protocols and applications*, Humana Press Inc. vol 204, 411 pp., New Jersey, 2003.

Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J. Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in

comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 18: 94-101, 1997.

Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch J. *In situ* hybridization: a practical guide. Royal Microscopical Society, Microscopy Handbooks, 27. 1. ed. Estados Unidos: Bios Scientific Publishers, 118 p., 1994.

Lim KY, Soltis DE, Soltis PS, Tate J, Matyasek R, et al. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae). *PloS One* 3:1–13, 2008.

Liu XH, Wang HW, Li YM, Tang YH, Liu YL, Hu X, Jia PX, Ying K, Feng Q, Guan JP, Jin CQ, Zhang L, Lou LR, Zhou Z, Han B. Preparation of single rice chromosome for construction of a DNA library using a laser microbeam trap. *J Biotechnol.* 109:217–226, 2004.

Lo K, Lin Y, Chen L. Bor-yaw Lin Isolation and characterization of new maize B sequences from a microdissected library. *Plant Mol Biol Rep* 27:350-354, 2009.

Lou Q, Iovene M, Spooner DM, Buell CB, Jiang J. Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping. *Chromosoma*, 119:435–442, 2010.

Lukaszewski AJ, Lapinski B, Rybka K. Limitations of *in situ* hybridization with total genomic DNA in routine screening for alien introgressions in wheat. *Cytogenet. Genome Res.* 109: 373-377, 2005.

Meltzer PS, Guan X-Y, Burgess A, Trent JM. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nature Genet* 1: 24±28. 1992.

Morejohn LC, Fosket DE. Inhibition of Plant Microtubule Polymerization in vitro by the Phosphoric Amide Herbicide Amiprofos-Methyl. *Science*, Vol. 224, Issue 4651, pp. 874-876, 1984.

Morel G, Cavalier A. *In situ* hybridization in light microscopy. Morel G. (Ed.). Methods in visualization series. 1. ed. Estados Unidos: CRC Press, 327 p., 2001.

Morrison LE, Ramakrishnan R, Ruffalo TM, Wilber KA. Labeling fluorescence *in situ* hybridization probes for genomic targets. Chapter 2, 21-40. Molecular Cytogenetics: Protocols and applications, Humana Press Inc. vol 204, 411 pp., New Jersey, 2003.

Ohmido N, Fukui K., Kinoshita T. Recent advances in Rice genome and chromosome structure research by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Proc Jpn Acad Ser B 86:103-115, 2010.

Planchais S, Glab N, Inzé D, Bergounioux C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. FEBS Letters 476: 78–83, 2000.

Qi LL, Pumphrey MO, Friebe B, Chen PD, Gill BS. Molecular cytogenetic characterization of alien introgressions with gene Fhb3 for resistance to *Fusarium* head blight disease of wheat. Theor Appl Genet 117:1155–1166, 2008.

Rohme, D., Fox, H., Herrmann, B., et al. Molecular clones of the mouse t complex derived from microdissected metaphase chromosomes. Cell 36, 783–788, 1986.

Scalenghe F, Turco E, Edström JE, Pirrotta V, Melli M. Microdissection and Cloning of DNA from a Specific Region of *Drosophila melanogaster* Polytene Chromosomes. Chromosoma (Berl.) 82, 205-216, 1981.

Šimková, H., Svensson, J.T., Condamine, P., Høibová, E., Suchánková, P., Bhat, P.R., Bartoš, J., Šafář, J., Close, T.J. and Doležel, J. () Coupling amplified DNA from flow-sorted chromosomes to high-density SNP mapping in barley. BMC Genomics 9, 294, 2008.

Schwarzacher T e Heslop-Harrison P. Chapter 4: Labeling the probe, 27-49 Practical *in situ* hybridization. Springer-Verlag, Nova York, pp. xii + 203 pp, 2000.

Speicher MR e Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics* 6, 782-792, 2005.

Stephens JL, Brown SE, Lapitan NLV, Knudson DI. Physical mapping of barley genes using an ultrasensitive fluorescence *in situ* hybridization technique. *Genome* 47:179-189, 2004.

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA and Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718-725, 1992.

Vega J, Abbo S, Feldman M, Levy AA. Chromosome painting in plants: *In situ* hybridization with a DNA probe from a specific microdissected chromosome arm of common wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12041-12045, 1994.

Wang CJ, Chen CC. Cytogenetic mapping in maize. *Cytogenet. Genome Res.* 109:63-69, 2005.

Weimer J, Kiechle M, Senger G, Wiedemann U, et al. An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosome Research* 7: 355±362, 1999.

Yamamoto M, Mukai Y. High-resolution physical mapping of the secalin-1 locus of rye on extended DNA fibers. *Cytogenet. Genome Res.* 109:79-82, 2005.

Yang F, Trifonov V, Ng BL, Kosyakova N, Carter NP. Generation of Paint Probes by Flow-Sorted and Microdissected Chromosomes. In: *Fluorescence in situ Hybridization (FISH) – Application Guide*. Germany: Springer Protocols, Chapter 3, 35-52, 2009.

Zhou Y, Hu Z, Dang B, Wang H, Deng X, Wang L, Chen Z. Microdissection and microcloning of rye (*Secale cereale* L.) chromosome 1R. *Chromosoma* 108: 250–255, 1999.

Zhou Y, Dang B, Wang H, Hu Z, Wang L, Chen Z. Microdissection of ., 121: 129-135, 2001.

Zhou RN, Hu ZM. The development of chromosome microdissection and microcloning technique and its applications in genomic research. *Cur. Genomics*, 8: 67-72, 2007.