



OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA DESCONDENSAÇÃO E CITOPLASMA EM ENSAIOS CITOLÓGICOS DE *Gossypium*

Kaliny Veiga Pessoa da Silva¹; Maria Isabel Gomes Martins²; Péricles de Albuquerque Melo Filho³; Roseane Cavalcanti dos Santos⁴, Reginaldo de Carvalho⁵

Doutoranda em Biotecnologia – RENORBIO – kalinyveiga@hotmail.com; 2. Doutoranda em Biotecnologia – RENORBIO-belgomes@gmail.com; 3. Prof. Departamento de Agronomia UFRPE- Pericles@depa.ufrpe.br; 4. Pesquisadora Embrapa Algodão, Doutora em Biologia Molecular – caval@cnpa.embrapa.br 5. Professor departamento de Biologia UFRPE-Reginaldo.ufrpe@gmail.com;

RESUMO- A citogenética vegetal tem sido uma ferramenta útil para o melhoramento de plantas uma vez que possibilita a identificação de alterações cromossômicas mitóticas e meióticas analisando híbridos e seus descendentes e realizando estudos relacionados a transferência de genes entre espécies nativas e cultivadas, entre outros. As espécies do gênero *Gossypium* possuem diferenças quanto ao número cromossômico, *G. hirsutum* e *G. barbadense* alotetraplóides, com 52 cromossomos e *G. arboreum* e *G. herbaceum*, diplóides com $2n=26$ cromossomos. Apesar das conhecidas recalcitrâncias para a propagação do algodão por meios somáticos *in vitro*, a elevada condensação do seu citoplasma também dificulta os estudos citomoleculares como coloração com fluorocromos cromomicina A_3 (CMA), 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e hibridização *in situ* (FISH), principalmente em estudos meióticos. Neste trabalho apresenta-se uma otimização de protocolo que melhora visualização dos cromossomos de algodão, por meio do clareamento do seu citoplasma. Entre os protocolos testados, três diferentes metodologias de fixação foram adotadas: Fixação 1- Fixador Carnoy; Fixação 2- Fixador modificado 1 (Álcool, clorofórmio e ác. Acético, 6:2:1) e fixação 3- Fixador modificado 2 (Álcool, Ác. Acético e clorofórmio, 6:2:1). Botões florais jovens (5 a 8 mm) foram coletados em casa de vegetação e fixados nos fixadores acima descritos, sendo as fixações trocadas, pelos mesmos fixadores, imediatamente a chegada ao laboratório a fim de garantir uma melhor eficácia na fixação. Nas fixações 2 e 3, após 2 e 4 h de fixação inicial, os fixadores foram trocados por fixador Carnoy e armazenados em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a utilização. Em todas as fixações após a digestão enzimática, os botões foram lavados com água destilada por 5 min e Ác. Acético 60% por 24 h para auxiliar no clareamento do citoplasma. A preparação das lâminas seguiu o método clássico de esmagamento com uso de fixador Carnoy, ao invés do uso do Ác. Acético 45% (utilizado em protocolos convencionais), as lâminas foram flambadas e fixadas em N_2 . As preparações foram analisadas com uso do fotomicroscópio Leica DM 2500 em contraste de fase. Verificou-se que com o uso do fixador Carnoy os citoplasmas das células apresentaram-se densos, o que dificultaria uma posterior análise cromossômica. Já as lâminas preparadas com botões fixados nos fixadores 2 e 3, com 4 h de fixação, apresentaram resultados satisfatórios, com células que apresentavam citoplasmas menos densos. Entretanto, o fixador 2, mostrou os melhores resultados, as células apresentaram citoplasmas menos densos e bem mais claros, dando um melhor contraste aos cromossomos.

Palavras-chave: Algodão, Fixação, Citogenética

Apoio: Embrapa Algodão, CNPq – bolsa DTI