



Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas

Departamento de Genética
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE FEULGEN

Adaptado por: Mondin, M e Aguiar-Perecin MLR

- **Metodologia:**

1.) Retirar o material (raízes conservadas em álcool 70%) da geladeira com antecedência, deixando atingir a temperatura ambiente.

Obs: Raízes conservadas em fixador também podem ser utilizadas, mas há casos que a coloração não ocorre.

2.) Lavar as raízes, 2x (duas vezes) em água destilada por 5 minutos.

3.) Hidrólise Ácida: colocar o material em HCL 1 N, 60°C durante 8 minutos.

Obs: No momento da hidrólise o ácido clorídrico já deve estar na temperatura indicada.

4.) Lavar as raízes, 2x (duas vezes) em água destilada por 5 minutos.

5.) Colocar as raízes em Reativo de Schiff, em frascos escuros, tampados. Conservar o frasco em ambiente escuro para o desenvolvimento da reação de coloração por 45 minutos.

Obs: O reativo de Schiff deve ser retirado com antecedência da geladeira e estar a temperatura ambiente para o desenvolvimento da reação de coloração. Se não houver frasco escuro, o mesmo pode ser envolvido em papel alumínio. Os frascos devem estar devidamente secos, pois o reativo se desmancha em água. O reativo de Schiff é fotossensível por isso a exposição à luz deve ser mínima.

6.) Lavar as raízes em placa de Petri com água. Trocar as raízes de placa assim que a água estiver corada de rosa. Repetir as trocas até que a água fique cristalina.

Obs: Esta lavagem pode ser realizada com água de torneira. Alternativamente pode-se utilizar água sulfurosa preparada a base de ácido sulfúrico.

Considerações

A partir do momento em que a lavagem estiver concluída as raízes estão prontas para serem utilizadas na preparação de lâminas pelo método do esmagamento ou serem digeridas com enzimas que degradam a parede celular.



Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas

Departamento de Genética
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Deve ficar claro que as lâminas preparadas após a coloração pelo método de Feulgen não podem ser utilizadas em outras metodologias, uma vez que as purinas do DNA foram retiradas no processo de hidrólise e substituídas por Pararosanilina (Fucsina)

- **Modo básico de Preparo da Lâmina**

- 1.) Em uma placa de Petri colocar ácido acético a 45%.
- 2.) Escolher uma ponta de raiz e colocar no ácido acético a 45% por tempo a ser determinado.
- 3.) Sob a lâmina colocar uma gota de Carmim Acético a 1%.
- 4.) Colocar a raiz sob a gota de Carmim Acético e retirar o meristema.
- 5.) Cuidadosamente dissecar e dissociar o meristema para a liberação das células meristemáticas.

Obs: Pode-se utilizar diferentes utensílios para a dissociação das células como, agulhas, barrinhas de ferro ou vidro, pinças de relojoeiro, etc. de acordo com a prática e gosto do pesquisador.

- 6.) Retirar o excesso de tecido que ficar sobre a lâmina.
- 7.) Colocar cuidadosamente a lamínula.

Obs: Se a raiz foi digerida em enzimas que degradam a parede celular, a lâmina não precisa ser aquecida e pode ser diretamente esmagada.

- 8.) Aquecer cuidadosamente o material (longe da chama) para que as células possam inchar.

Obs: A solução não pode ferver

- 9.) Esmagar entre papel de filtro sobre uma superfície rígida.
- 10.) Verificar se não há bolhas de ar; caso haja colocar uma gota de Carmim Acético a 1% junto à lamínula. Analisar ao microscópio.



Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas

Departamento de Genética
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Preparo das Soluções e Reagentes

Reativo de Schiff:

- Substâncias e Quantidade:

Pararosanilina (Fucsina Básica) - 3,0 g

Metabissulfito de Potássio ou sódio - 9,0 g

HCl a 1N (1M) - 90,0 ml

Água Destilada - 600,0 ml

Carvão ativado - 1,5 gr

- Modo de Preparo:

1. Dissolver a Pararosanilina em água destilada a 100°C (fervura), sob agitação (placa aquecedora com agitador magnético) até dissolução total do corante. Filtrar o corante.

Obs: Todas as etapas a partir do passo 2 devem ser feitas protegendo ao máximo a solução do contato com a luz

2. Após a filtração, adicionar o metabissulfito de K ou Na e o HCl 1N, manter sob agitação por pelo menos 1 hora e guardar em frasco escuro, bem fechado, pernoite.
3. No dia seguinte adicionar o carvão ativado, agitar bem por pelo menos 4 horas e filtrar.

Obs: Lembre-se de que a solução é fotossensível e a filtração é a etapa crucial do método e deve ser feita totalmente no escuro.

4. Aliquotar o reativo em frascos escuros com até 100 ml e manter geladeira ou no armário de corantes. Os frascos podem ser envolvidos por papel alumínio garantindo ainda mais proteção contra luz. Etiquetar os frascos com nome do reativo e data de preparo.



Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas

Departamento de Genética

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Esta metodologia de preparação resulta em grande quantidade de reativo. Alternativamente as quantidades podem ser adequadas a demanda do laboratório. Não é recomendado que o reativo seja guardado por longos períodos (mais de 6 meses), pois pode perder suas propriedades. Nunca agite o frasco antes do uso, pois o reativo pode ter precipitado e a agitação torna o reagente turvo e algumas vezes menos ativo. Devido aos precipitados não é recomendado utilizar o corante a partir do momento que este começa sair junto com o reativo; neste caso recomenda-se que os últimos ml sejam descartados e um novo reativo seja preparado.

Carmim Acético a 1% :

- Substâncias e Quantidades:

Carmim - 1,0 g

Ácido acético - 45,0 ml

Água Destilada - 55,0 ml

- Modo de Preparo:

1. Aquecer o ácido acético a 45% até a fervura em Erlenmeyer tampado com papel alumínio.
2. Acrescentar o Carmim sob agitação constante em placa aquecedora; ferver por um minuto.
3. Esfriar, filtrar e alíquotar em frascos escuros com até 10 ml. Etiquetar com nome do corante, data de preparo e manter em geladeira.



Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas

Departamento de Genética
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



- **Como citar este protocolo:**

Exemplo 1

Coloração pelo Método de Feulgen foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Mondin e Aguiar-Perecin (2009) (disponível no sítio <http://www.genetica.esalq.usp.br/citogenetica/protocolos/Feulgen.pdf>)

Exemplo 2

Os cromossomos foram corados pelo Método de Feulgen (Mondin e Aguiar-Perecin 2009)

Mondin M, Aguiar-Perecin MLR (2009) Coloração pelo Método de Feulgen. Protocolo disponibilizado pelos autores no sítio: [HTTP://www.genetica.esalq.usp.br/citogenetica/protocolos/Feulgen.pdf](http://www.genetica.esalq.usp.br/citogenetica/protocolos/Feulgen.pdf).

Alguns periódicos podem preferir formatações específicas para a citação de fontes de sítios da internet, por isso recomendamos que antes do artigo ser enviado para publicação, que seja consultada as normas de citações bibliográficas disponibilizada pelo periódico.

- **Referências**

Bertão MR, Aguiar-Perecin MLR. 2002. Maize somatic chromosome preparation: pretreatments and genotypes for obtention of high index of metaphase accumulation. *Caryologia* **55**: 115-119.

Cuco SM, Mondin M, Vieira MLC, Aguiar-Perecin MLR. 2003. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). *Acta Botanica Brasilica* **17**: 363-370.

Mello MLS, Vidal BC. 1977. A reação de Feulgen. *Ciência e Cultura* **30**: 665-676.