

## CARACTERIZAÇÃO CITOMOLECULAR DE TRÊS ESPÉCIES DE *Coffea L*: *C. eugenioides*, *C. canephora* E *C. dewevrei* \*

BARBOSA, R.L. <sup>\*\*1</sup>; PIEROZZI, N.I. <sup>1</sup>; LOMBELLO, R.A. <sup>\*\*1</sup>; SILVAROLLA, M.B. <sup>2</sup> e PINTO-MAGLIO, C.AF. <sup>1</sup>

- INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC) – C.P. 28 - CEP 13001-970, <maglio@iac.br > -

\* Parcialmente financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café; \*\* Bolsistas da FAPESP; <sup>1</sup> CENTRO DE GENÉTICA, BIOLOGIA MOLECULAR E FITOQUÍMICA; <sup>2</sup> CENTRO DE CAFÉ E PLANTAS TROPICAIS.

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo a caracterização de três espécies diplóides do gênero *Coffea* - *C. eugenioides*, *C. canephora* e *C. dewevrei* - através da qualificação do padrão da cromatina, utilizando-se os fluorocromos DAPI (4'6-diamino-2-phenylindole) e CMA<sub>3</sub> (cromomicina); bem como a determinação das seqüências de rDNA das regiões organizadoras do nucléolo, por meio da técnica de hibridação *in situ* fluorescente de DNA (FISH). O bandamento com DAPI foi negativo para as três espécies. O bandamento com a cromomicina mostrou-se positivo e revelou diferenças em intensidade e número de bandas nas três espécies. Igualmente, a técnica de hibridação *in situ* revelou diferenças nas regiões nucleolares para essas espécies.

**Palavras-chave:** *Coffea*, *C. eugenioides*, *C. canephora*, *C. dewevrei*, caracterização cromossômica, FISH, DAPI, CMA<sub>3</sub>, região organizadora do nucléolo.

### CITOMOLECULAR CHARACTERIZATION OF THREE SPECIES OF *Coffea L*: *C. eugenioides*, *c. canephora* E *C. dewevrei*.

**ABSTRACT:** The objective of this work is the characterization of three diploid species the of the genus *Coffea*, *C. eugenioides*, *C. canephora*, *C. dewevrei* utilizing the fluorochromes DAPI (4'6-diamino-2-phenylindole) and CMA<sub>3</sub> (cromomicin) to qualify the pattern of chromatin; and localize the sequences of rDNA of the nucleolar organizing regions through the technique of *in situ* hybridization (FISH). The DAPI banding was negative for the three species, and the CMA<sub>3</sub> banding was positive for all of them, showing differences in number of bands and intensity of de signals. The same occurred with the FISH technique, that revealed differences at nucleolar organizing regions among these species.

**Key words:** *Coffea*, *C. eugenoides*, *C. canephora*, *C. dewevrei*, chromosome characterization, DAPI banding, CMA<sub>3</sub> banding, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), nucleolar organizing region (NOR), rDNA.

## INTRODUÇÃO

O número básico de cromossomos, para o gênero *Coffea*, é  $n=11$ , sendo todas as espécies diplóides e incompatíveis, com exceção da espécie *Coffea arabica*, que é poliplóide ( $n=22$ ) e autocompatível. Considerando de modo geral o valor comercial do café, pouca atenção tem sido dada à genética das espécies silvestres, sendo os trabalhos praticamente confinados a *C. arabica*, por ser a espécie de maior importância econômica. Atualmente, estudos na área de melhoramento do café arábica vêm utilizando, de maneira crescente, espécies diplóides, visando a introdução de novos caracteres para obtenção de híbridos mais resistentes, com diferentes formas e tamanho dos grãos e com diferentes características organolépticas. Assim, torna-se necessário um melhor conhecimento da base genética das diferentes espécies de café existentes nos bancos de germoplasma (Wrigley, 1988).

Alguns trabalhos visando a caracterização citológica das espécies de café foram já realizados; dentre estes destaca-se o estudo efetuado por Pierozzi et al. (1999) em duas espécies, *C. canephora* e *C. dewevrei*, onde foi usada a técnica de banda-C em cromossomos mitóticos. No entanto, embora efetiva na caracterização cromossômica de vários grupos vegetais, a técnica de bandamento C em café não revelou um heteromorfismo de bandas suficiente que permitisse uma caracterização relativamente fácil e efetiva das espécies analisadas. Outros trabalhos, envolvendo a caracterização de cromossomos na fase meiótica do paquiteno (Pinto-Maglio & Cruz, 1987; Pinto-Maglio & Cruz, 1998), foram feitos em nove espécies diplóides e em *C. arabica*, tendo resultado na identificação dos cromossomos destas espécies. Entretanto, a técnica de caracterização em paquiteno também não oferece a facilidade necessária para se efetuar a detecção de cromossomos individuais dentro e entre os diferentes genomas.

Atualmente, com a disponibilização de técnicas de citogenética molecular, FISH e GISH (hibridação fluorescente de DNA genômico total), a caracterização de cromossomos não fica essencialmente limitada pela forma ou pelo tamanho destes, mas baseada na presença de seqüências específicas de DNA, as quais fazem com que os cromossomos se destaquem dentro dos genomas através dos sinais fluorescentes. Nesse novo contexto, alguns trabalhos apresentados por Raina et al. (1998) e Lashermes et al. (1999) têm já empregado tais técnicas em café. Assim, o objetivo deste trabalho foi a

caracterização citológica de três espécies diplóides de café utilizando bandamento com fluorocromos e hibridação *in situ* e adicionalmente oferecer a possibilidade de se efetuar o monitoramento visual, em nível citológico, da introgressão de material genético de interesse, eventualmente presente nestas espécies.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta e preparações citológicas

As preparações citológicas foram feitas, a partir de meristemas de ponta de raízes, de sementes recém-germinadas das espécies *C. canephora*, *C. eugenioides* e *C. dewevrei*. As sementes foram coletadas de plantas do banco de germoplasma de café do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e colocadas para germinar em placas de Petri com papel-filtro úmido, à temperatura ambiente. As raízes foram coletadas e tratadas com solução saturada de paradiclorobenzeno (PDB) por duas horas a 16 °C; para acúmulo de metáfases, foram fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol e ácido acético, respectivamente) e estocadas a – 20 °C.

Para preparação das lâminas, as raízes foram hidrolisadas com uma solução enzimática de celulase e pectinase 0,2% a 37 °C por uma hora. Após o período de hidrólise, as lâminas foram preparadas por esmagamento das pontas de raízes em ácido acético aquoso 45%. O descolamento das lamínulas foi feito em nitrogênio líquido.

### DAPI e CMA<sub>3</sub>

Foram utilizados os fluorocromos 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI) e cromomicina A (CMA<sub>3</sub>) de acordo com o descrito por Schweizer (1976). Após a preparação, as lâminas foram montadas em solução de água com glicerina na concentração de 1:1 e observadas ao microscópio de fluorescência, com filtro específico para cada fluorocromo.

### FISH

O protocolo utilizado nesta técnica seguiu o descrito por Leitch et al. (1994), com adaptações feitas para as espécies de café. A sonda utilizada, denominada pTa71, corresponde à seqüência de DNA ribossômico de *Triticum aestivum* 26S, 5.8S e 18S, que foi clonada no plasmídeo pUC19 e contém 9 Kb. Esta sonda, por ter uma seqüência altamente conservada, é usada para caracterizar as regiões

organizadoras do nucléolo. A marcação da sonda foi feita através da técnica de “nick translation” com biotina-16-dUTP, e os sinais de hibridação foram detectados com anticorpo avidina associado ao fluorocromo rodamina. A contracoloração foi feita com DAPI. As lâminas foram montadas com o “anti-fading” Vecta Shield.

## RESULTADOS

### DAPI e CMA<sub>3</sub>

Nas três espécies estudadas, o resultado de DAPI, específico para regiões ricas em pares de bases AT, foi negativo, ou seja, a coloração foi uniforme, não evidenciando nenhuma banda cromossômica.

A coloração com CMA<sub>3</sub>, que é específica para regiões ricas em pares de bases CG, mostrou resultado positivo. Na espécie *C. eugenioides* foram evidenciados quatro sinais, relativamente fortes, nas regiões terminais dos cromossomos.

Já nas espécies *C. canephora* e *C. dewevrei* foram evidenciadas seis regiões, sendo duas de coloração intensa, localizadas na região terminal; duas de coloração fraca, também localizadas terminalmente; e duas de coloração média, com localização intercalar.

### FISH

Em todas as espécies estudadas, os sinais de hibridação obtidos mostraram-se fortemente corados em vermelho, devido ao uso do corante rodamina, evidenciando as correspondentes regiões de rDNA ou regiões responsáveis pela organização do nucléolo.

A espécie *C. eugenioides* mostrou a presença de quatro regiões hibridizadas com a sonda pTa71 e localizadas numa posição distal dos cromossomos.

Em *C. canephora*, apenas duas regiões de rDNA foram detectadas, estando localizadas também na região distal dos cromossomos, evidenciando uma região satélite bem característica.

Na espécie *C. dewevrei*, também duas regiões foram evidenciadas, estando elas localizadas igualmente na região distal dos cromossomos.

## DISCUSSÃO

Os resultados negativos obtidos com o uso do fluorocromo DAPI mostram que as três espécies analisadas não possuem regiões específicas ricas em pares de bases AT, estando estes espalhados uniformemente nos cromossomos.

Na espécie *C. eugenioides*, todos os sinais de hibridação *in situ* coincidiram com os sinais da CMA<sub>3</sub>, mostrando que todas as regiões evidenciadas com estes fluorocromos são as regiões de rDNA, regiões organizadoras do nucléolo, sendo estas ricas em pares de bases CG. Estudos realizados por Pinto-Maglio (1987) mostraram a presença de apenas um par cromossômico nucleolar em *C. eugenioides*; já Medina et al. (1977) mostraram a presença de mais de um par cromossômico. No presente trabalho, através da hibridação *in situ*, foi constatada a presença de quatro sinais, ou dois pares cromossômicos, que possuem a região de rDNA, sendo elas ativas ou não. A confirmação da atividade dessas regiões deverá ser realizada através da impregnação pela prata, que evidencia a região organizadora do nucléolo que são ativas. O presente resultado difere ainda do Raina et al. (1998), que, utilizando a mesma sonda pTa71, observou a presença de apenas dois sinais de hibridação.

Os resultados com o CMA<sub>3</sub> em *C. canephora* mostraram que as seis regiões cromossômicas caracterizam comparativamente a espécie. Duas destas seis regiões detectadas pelo CMA<sub>3</sub> coincidiram com as regiões organizadoras do nucléolo, evidenciadas pela localização das regiões de rDNA através da hibridação *in situ*, confirmando os resultados apresentados por Pinto-Maglio (1987) e Pierozzi (1999).

A espécie *C. dewevrei* apresentou dois sinais de hibridação que coincidiram com dois sinais de CMA<sub>3</sub>, mostrando que essa região de rDNA, nesta espécie, também é rica em pares de bases CG. Foram observadas ainda bandas CMA<sub>3</sub> positivas em regiões intercalares de alguns cromossomos, provavelmente pericentroméricas, da mesma forma que em *C. canephora*.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a possibilidade de utilização das técnicas citomoleculares para: a) caracterização de cromossomos em café, em geral; b) monitoramento de introgressões de genes de interesse presentes nas espécies analisadas; c) diferenciação desses cromossomos dentro do complemento dessas espécies; e e) incrementar a caracterização das espécies do Banco de Germoplasma de Café do IAC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. Genome. Mol. Gen. Genet. 261:259-266.
- LEITCH, AR.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. 1994. ***In situ* hibridization**: a practical guide. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford.
- PIEROZZI, N.I.; 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-bands techniques. **Caryologia**, 52:1-8.
- PINTO-MAGLIO, C.A.F. & CRUZ, N.D., 1987. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. **Caryologia**, 40:7-23.
- PINTO-MAGLIO, C.A.F. & CRUZ, N.D. 1998. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. **Caryologia**, 51:19-35.
- RAINA, S.N.; MUKAI, Y.; YAMAMOTO, M., 1998. In situ identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). **Theor Appl Genet.**, 97: 1204-1209.
- SCHWEIZER, D.; 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. **Chromosoma** 58: 307-324.