

# APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DA ESPÉCIE *Coffea arabica* L.<sup>1</sup>

PINTO-MAGLIO, Cecília. A. F.; CUÉLLAR, Teresa; BARBOSA, Rosicler L.  
Instituto Agronômico de Campinas (IAC)  
E-mail: maglio@cec.iac.br

**ABSTRACT:** Molecular cytogenetical techniques were applied in some *C. arabica* accessions for chromosome characterization. Nucleolar organizing regions (NORs) of *C. arabica* complement were localized through fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using the probe pTa71 probe. Also, the heterochromatic AT- rich regions and GC – rich regions of these chromosomes were characterized by staining with 4'6 diamidino-2- phenylindole (DAPI) and chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), respectively. The results here presented, although preliminary, indicates that identification of NORs is suitable as cytological markers for *C. arabica* species.

**KEY WORDS:** *Coffea arabica*, chromosomes, molecular cytogenetics, DAPI banding, CMA<sub>3</sub> banding, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), rDNA, pTa71 probe.

**RESUMO:** Visando a caracterização dos cromossomos da espécie *C. arabica* L. foram empregadas técnicas de citogenética molecular. Foram utilizados fluorocromos específicos que revelam a composição das regiões heterocromáticas dos cromossomos tais como 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que revela as regiões de ADN ricas em pares de bases AT, e Cromomicina A (CMA<sub>3</sub>) que revela as regiões ricas em GC. Foi empregada ainda a técnica de hibridação *in situ* (FISH), com uso da sonda pTa 71, que determina o número e distribuição das regiões organizadoras de nucléolo (NORs). Os dados aqui apresentados, embora preliminares, permitem já a utilização dos cromossomos nucleolares como marcadores citológicos nesta espécie.

**PALAVRAS CHAVE:** *Coffea arabica*, cromossomos, citogenética molecular, hibridação *in situ* fluorescente (FISH), DAPI, CMA<sub>3</sub>, rDNA, sonda pTa71.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* L. possui cerca de 100 espécies, sendo a espécie de maior importância econômica *C. arabica* L., uma exceção no gênero, pois é a única espécie tetraplóide com  $2n=44$  cromossomos e autocompatível, enquanto todas as demais são diplóides e incompatíveis. Estudos citológicos no gênero *Coffea* têm sido feitos com a tentativa de caracterizar os cromossomos mitóticos, através de técnicas convencionais e de bandamento C (PIEROZZI *et al.*, 1999). No entanto, essas análises comparativas de cariótipos, mostraram-se difíceis e, até certo ponto, ineficientes devido ao pequeno tamanho e similaridade dos cromossomos, o que tem impedido a identificação de cada um deles dentro e entre os diferentes genomas. Informações citológicas adicionais, realizadas a partir de análises de padrão cromomérico, na fase de paquíteno da divisão meiótica (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1987; PINTO-MAGLIO & CRUZ 1998), confirmaram essa similaridade morfológica. Concluiu-se portanto, que há a necessidade de se utilizar outras técnicas para determinar a estrutura dos cromossomos das várias espécies desse gênero, para tentar estabelecer marcadores cromossômicos adequados, com a finalidade de empregá-los no monitoramento da transmissão e introgressão de caracteres de interesse para o melhoramento genético e para o estudo das relações evolutivas neste gênero.

Uma nova perspectiva na caracterização de cromossomos, tem surgido com o emprego de fluorocromos e de técnicas de citogenética molecular, mais precisamente as técnicas de hibridação *in situ*, FISH (fluorescent *in situ* hybridization) e GISH (genomic *in situ* hybridization).

## MATERIAL E MÉTODOS

O material usado neste estudo, foi coletado de seis plantas da espécie *C. arabica* L., sendo três plantas da variedade arábica e três do cultivar Bourbon vermelho, todas pertencentes à coleção de café do Centro de Café e Plantas Tropicais, do Instituto Agronômico de Campinas. Usaram-se tanto os botões florais, como

<sup>1</sup> CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ

raízes germinadas a partir de sementes, para a obtenção de cromossomos meióticos e mitóticos, respectivamente. Os botões florais foram coletados e fixados conforme o procedimento estabelecido por PINTO-MAGLIO & CRUZ, (1987), PINTO-MAGLIO & CRUZ (1998) para a técnica de esmagamento de anteras. Para o tratamento das raízes foi usado o protocolo convencional com tratamento enzimático das raízes antes do esmagamento dos meristemas.

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

Foi usado o protocolo descrito por SCHWEIZER 1976, e 1980, para DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) e CMA<sub>3</sub> (Cromomicina A<sub>3</sub>), com algumas modificações e adaptações feitas especificamente para o material de *C. arabica*.

#### **FISH**

O protocolo, da técnica de hibridação *in situ* (FISH), usado foi descrito por PENDÁS *et al.*, (1993) e foi adaptado para *C. arabica*. A sonda utilizada foi um fragmento de DNA ribossômico (rDNA) de trigo de 9 kb que contém as regiões 18S, 5.8S e 26 S mais os seus espaçadores, obtido do clone pTa71 (GERLACH E BEDBROOK, 1979). A marcação foi feita através da técnica de "nick translation" com biotina-16-dUTP e os sinais de hibridação foram detectados com o anticorpo avidina associado ao fluorocromo rodamina. As lâminas foram montadas com a solução anti-fading Vecta Shield (Laboratórios Vector). A contra coloração foi feita com DAPI.

## **RESULTADOS**

### **Coloração com DAPI e CMA<sub>3</sub>**

A coloração com DAPI e a coloração DA-DAPI não mostraram resposta positiva, observando-se uma coloração uniforme em todos os cromossomos, tanto na meiose como na mitose em todas as variedades nas quais foi aplicado o tratamento. A coloração com CMA<sub>3</sub> e a coloração DA-CMA<sub>3</sub> ao contrário, mostraram uma resposta positiva na heterocromatina associada às regiões organizadoras do nucléolo, as quais se localizam na posição distal, em três pares cromossômicos, podendo ser observadas tanto na meiose como na mitose. Não foram evidenciadas outras regiões heterocromáticas nos cromossomos destacadas com a CMA<sub>3</sub>.

#### **FISH**

A técnica de hibridação *in situ*, usando a sonda pTa71, permitiu determinar o número e a localização das regiões de DNA ribossômico 18S, 5.8S e 26 S (rDNA), nos cromossomos. Foram identificados 6 sinais de hibridação que correspondem aos cistrons ribossomais Estes sinais evidenciaram-se na posição distal de três pares cromossômicos, sendo dois sinais relativamente fortes, dois sinais medianos e ainda, dois outros sinais mais fracos. Os núcleos interfásicos exibiram também seis sinais de hibridação. Não foram observados, além destes, quaisquer outros sinais de hibridação em qualquer outra localização do complemento cromossômico.

## **DISCUSSÃO**

As seqüências altamente repetitivas presentes na heterocromatina podem ser detectadas com o uso de fluorocromos como DAPI e CMA<sub>3</sub>, devido à sua especificidade por regiões ricas em pares de bases AT e GC, respectivamente. Segundo estudo de cromossomos meióticos na fase de paquíteno na espécie *C. arabica*, observa-se padrão heterocromático restrito às regiões pericentroméricas em todos os cromossomos do complemento e também associado às regiões organizadoras de nucléolo em três pares cromossômicos (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1998). No entanto identificam-se dois tipos de regiões heterocromáticas quando da coloração com estes fluorocromos. A heterocromatina pericentromérica não respondeu a nenhum dos tratamentos usados, com DAPI ou CMA<sub>3</sub>. Estas regiões provavelmente possuem uma composição equivalente de pares de bases AT ou GC, ou ainda, estas bases estariam distribuídas de forma alternativa. Já a heterocromatina associada às regiões organizadoras do nucléolo reagiu positivamente ao tratamento com CMA<sub>3</sub>. Portanto, os sinais fluorescentes observados na posição distal em três pares cromossômicos, decorrentes do tratamento com a CMA<sub>3</sub>, sugerem a riqueza relativa em pares de bases GC destas regiões. A hibridação *in situ*, através da sonda de pTa71, discriminou os cistrons ribossômicos, identificando o número e localização destas regiões na espécie *C. arabica*, em três pares cromossômicos, localizados na posição distal. Estas observações confirmam dados, obtidos na divisão meiótica, sobre o número de cromossomos associados ao nucléolo nesta mesma espécie (PINTO-MAGLIO & CRUZ, 1998). No entanto, dados de RAINA, *et al.*(1998), sobre hibridação *in situ* em mitose, com a mesma sonda pTa71, revelaram apenas dois pares cromossômicos contendo regiões de rDNA, no complemento desta espécie. Como relatado nos resultados, os seis sinais aqui observados, diferem em intensidade, sendo dois relativamente fortes, dois medianos e dois bem fracos. Possivelmente, estes autores não detectaram estes dois últimos sinais. A constatação de que a heterocromatina associada às constrições secundárias apresenta riqueza relativa em pares de bases GC, revelada pelo tratamento com o fluorocromo CMA<sub>3</sub>, e estar associada às regiões

organizadoras de nucléolo em *C. arabica*, confirma um fenômeno de ocorrência comum, tanto nos animais como em plantas. De fato, segundo SCHWEIZER (1980) e SUMNER (1990), parece existir uma riqueza relativa em pares de bases GC nos cistrons ribossômicos, por isto estas regiões se revelam habitualmente positivas com o fluorocromo CMA<sub>3</sub>.

## CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados, embora preliminares, permitem já a utilização dos cromossomos nucleolares como marcadores nesta espécie. As técnicas aqui testadas para a espécie *C. arabica*, serão empregadas de forma extensiva nas demais espécies do gênero, tornando possível a identificação de tais cromossomos marcadores, e também a comparação de padrões diferenciais dos demais cromossomos dos diferentes complementos, para elaboração de cariótipos mais detalhados, o que permitirá a caracterização do Banco de Germoplasma de café do IAC auxiliando a seleção de genótipos dentro dos programas de melhoramento.

## BIBLIOGRAFIA

- Gerlach, W.L. & Bedbrook, J.R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.*, 7:1869-1885.
- Pendás, A.M., Morán, P & García-Vázquez, E. 1993. Ribosomal genes are interspersed throughout a heterochromatic arm in Atlantic salmon. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 63:128-130
- Pierozzi, N.I., Pinto-Maglio, C.A.F. & Cruz, N.D. da. 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. da. 1987. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. *Caryologia*, 40:7-23.
- Pinto-Maglio, C.A.F. & Cruz, N.D. da. 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 hybridization identifies the diploid species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Thero. Appl. Genet.*, 97:1204-1209.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58:307-324.
- Schweizer, D. 1980. Fluorescent chromosome bands in plants: applications, mechanisms and implications for chromosome structure. "The Plant Genome". Ed. by Davies, D.R. & Hopwood, R.A. John Innes Charity, Norwich, U.K. Proceedings of the 4<sup>th</sup> John Innes Symposium.
- Sumner, A.T. 1990. Chromosome banding. Unwin Hyman Ltd. London, UK.

## **AVISO**

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS  
SEGUINTE ENDEREÇOS:

### **FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES**

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV  
Viçosa - MG  
Cep: 36571-000  
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485  
Fax : (31) 3891-3911

### **EMBRAPA CAFÉ**

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)  
Edifício Sede da Embrapa - sala 321  
Brasília - DF  
Cep: 70770-901  
Tel: (61) 448-4378  
Fax: (61) 448-4425