

ESTUDO DOS CROMOSSOMOS DE *Coffea arabica* POR MÉTODO DE ANÁLISE DE IMAGEM

FONTES, Bárbara Pereira Dantas e CARVALHO, Carlos Roberto de. Dept^o de Biologia Geral
- UFV, Viçosa - MG. barbara@alunos.ufv.br e ccarvalh@mail.ufv.br

RESUMO: O *Coffea arabica*, apesar da grande importância econômica, tem sido pouco estudado citogeneticamente. O pequeno tamanho de seus cromossomos tem dificultado análises morfológicas mais detalhadas. No presente estudo, foram utilizadas técnicas citogenéticas com dissociação celular e secagem ao ar para obtenção de cromossomos morfológicamente mais preservados. Metodologias computacionais foram realizadas para obter medições mais precisas, ampliações de imagens cromossômicas, além da montagem do kariograma desta espécie. Sementes de *C. arabica* foram germinadas em placas de Petri à 28 °C, no escuro. Meristemas radiculares foram pré-tratados com solução de Trifluralin a 3µM com 100µl de DMSO, por 18h à 5 °C. A fixação foi realizada com solução de metanol ácido acético (3:1) com três trocas. Após 24 horas, as raízes foram digeridas enzimaticamente com Flaxzyme diluída em água destilada (1:10). As lâminas foram preparadas por dissociação do meristema, gotejamento e técnica de secagem ao ar. A coloração foi realizada pela metodologia convencional de Giemsa à 2% em tampão fosfato de pH 6,8. As técnicas permitiram a identificação de cada par de homólogos, possibilitando a obtenção do kariograma do *C. arabica*, com cromossomos bem definidos, além de proporcionarem a observação de diferenças e similaridades quanto a morfologia.

ABSTRACT: The *Coffea arabica*, although have economical importance, the cytogenetic it's not well studied. The small size of the chromosomes makes it difficult a detailed morphologic analysis. In this study, cytogenetic techniques were used to obtain exact measures, to amplify chromosomes images, and set the kariogram of the species. Seeds of *Coffea arabica* germinated in Petri dishes at 28 °C, in the dark. Meristematic roots were pre-treated with Trifluralin solution 3 µM, and DMSO 100 µL, during 18 hours at 4°C. The fixation was made with methanol and acetic acid (3:1) changed three times. After 24 hours, the roots were digested with Flaxzyme and destileded water solution (1:10). The slides were prepared dissociating the meristem, dripping the fixative and the air drying technique was used. The dye was with Giemsa 2% in phosphate buffer, pH 6,8. These techniques allowed the identification of each homologous pair and forming the *C. arabica* kariogram, with well defined chromosomes and make it possible the observation of similarities and differences on the morphology.

PALAVRAS CHAVE: Citogenética, café, análise de imagem, kariograma

INTRODUÇÃO

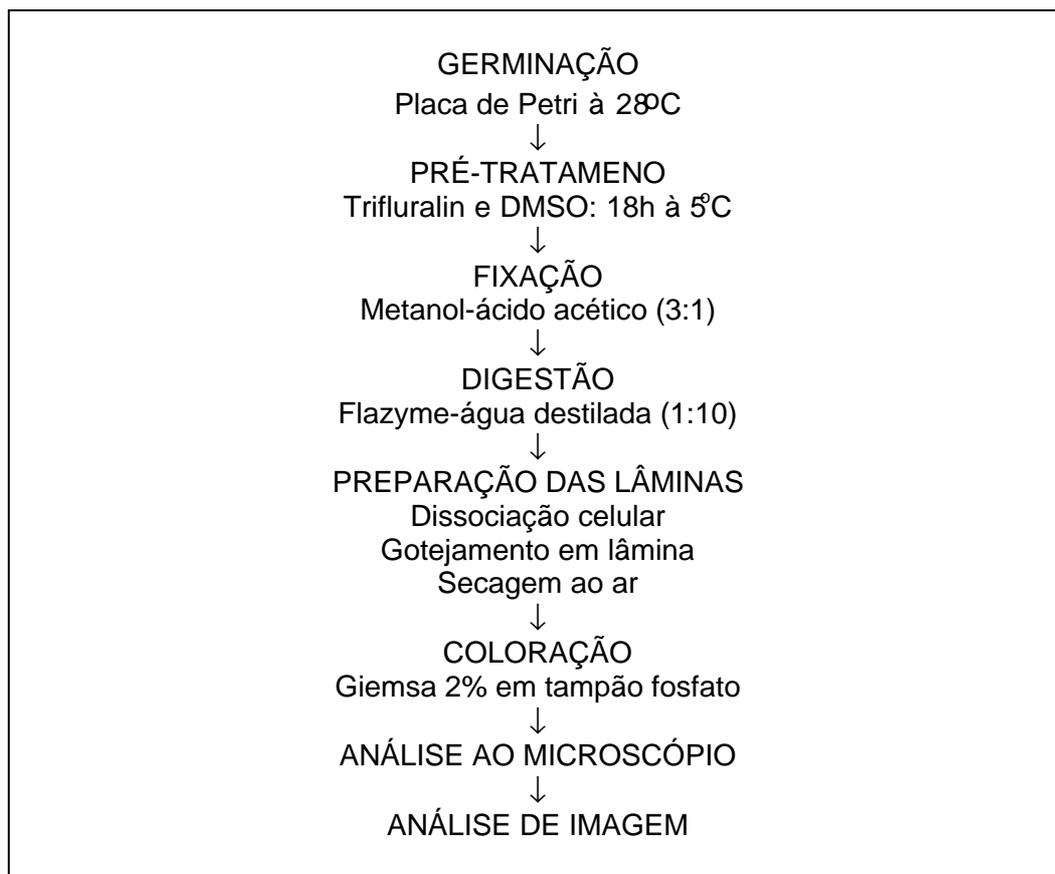
A cultura do café ocupa posição de destaque na economia mundial, sendo explorada por mais de 70 países. Das espécies cultivadas, o *Coffea arabica* tem maior interesse econômico, representando 75% da produção mundial exportável de café. Estudos de distribuição geográfica das espécies *C. eugenioides* e *C. canephora* (diplóides, com 2n=22), associados à técnicas moleculares, sugerem estes como os prováveis genitores do *C. arabica*, uma espécie tetraplóide que apresenta 2n=44 cromossomos (LASHERMES et al., 1999).

Apesar da grande importância desta espécie e de suas pesquisas citogenéticas terem sido iniciadas ainda no início do século, por FABER em 1912, seus cromossomos mitóticos foram pouco estudados. Com o advento da biotecnologia e das recentes técnicas de mapeamento molecular, tornou-se imperativo o levantamento citogenético mais detalhado das populações utilizadas em programas de melhoramento. Isto pode ser obtido por meio da associação de técnicas citogenéticas à metodologias computacional, possibilitando análises mais precisas do kariograma do *C. arabica*.

Assim, objetivou-se a identificação dos pares de homólogos com a montagem do kariograma e identificação dos grupos cromossômicos que sugere a tetraploidia desta espécie.

Apoio financeiro: CNPq, CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ

MATERIAL E MÉTODOS



RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas permitiram a identificação de cada par de homólogo, possibilitando a montagem do cariógrama dos cromossomos do *Coffea arabica* (Figura 1). Observou-se que esse complemento cromossômico pode ser subagrupado em 11 conjuntos de dois pares de homólogos, considerando a sua similaridade morfológica (Figura 2). Os agrupamentos com dois conjuntos diplóides confirma a herança tetraplóide do *C. arabica*.

O núcleo interfásico, (Figura 3), apresenta regiões heterocromáticas evidentes. Imagens digitalizadas foram analisadas com os recursos e filtros do software para realçar estas regiões (Figura 4). Gráficos de 3 dimensões, destas regiões heterocromáticas correspondentes aos cromossomos, foram gerados para auxiliar na contagem automatizada (Figura 5). O número de picos, neste gráfico, representa as 44 regiões mais densamente coradas nos cromossomos.

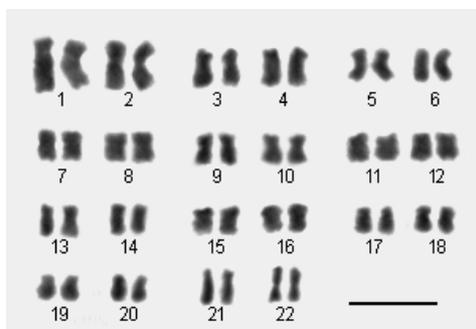


Figura 1- Cariograma mitótico dos 22 pares de homólogos do *Coffea arabica* L. Barra = 5 micrometros.

Pares de cromossomos	GRUPOS										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	10-20	21-22

Figura 2- Agrupamento dos 2 conjuntos diplóides do *C. arabica*.

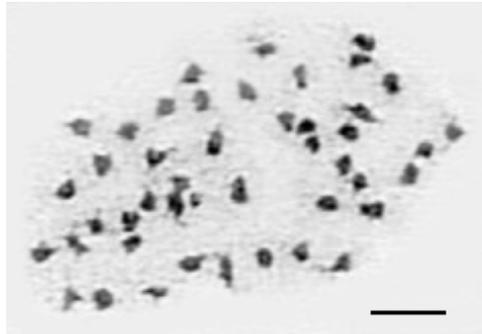


Figura 3- Interfase do *C. arabica* evidenciando regiões heterocromáticas correspondentes a 44 cromossomos. Barra = 5 micrometros.

LASHERMES et al. (1999) sugeriram que o *C. arabica* é um amfidiplóide formado pela hibridação entre o *C. eugenioides* e *C. canephora*, ambos diplóides ($2n=22$). Os resultados foram obtidos por meio de técnicas moleculares (RFLPs) mostrando que 75% dos loci analisados apareciam duplicados, interpretados como representando os dois pares de cromossomos homólogos, o que demonstra que o *C. arabica* é resultado da composição de dois genomas de ancestrais distintos.

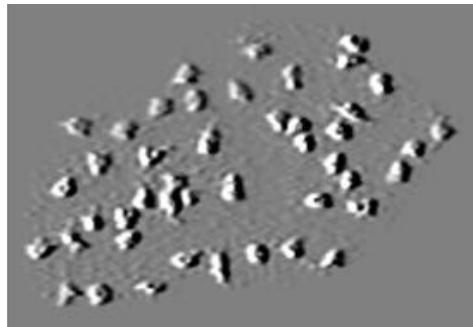


Figura 4- Núcleo interfásico com imagem filtrada por ferramentas do software que realça as regiões heterocromáticas.

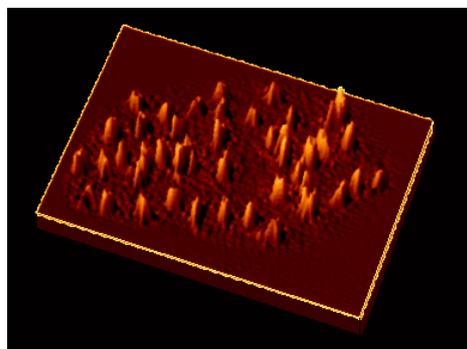


Figura 5 -Gráfico 3D pseudocolorizado, das regiões heterocromáticas presentes nos núcleos interfásicos, com base nas densidades de 255 tonalidades de cinza.

CONCLUSÕES

Foi possível, com o uso dos recursos disponíveis, a identificação dos pares de homólogos do *Coffea arabica*, a montagem do kariograma e o pareamento dos respectivos homólogos em grupos que confirma a sua origem tetraplóide, conforme os dados moleculares citados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FABER, F.C.V. Morphologisch-physiologische Untersuchungen an Blüthen Von Coffea-Arten. Ann. Jardin Bot. Buitenzorg. v.2, p.59-160, 1912.
- LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterisation and origin of the Coffea arabica L. genome. Mol. Gen. Genet.,v.261, p.259-266, 1999.

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