

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE *Coffea canephora***FONTES, B.P.D.<sup>1</sup> e CARVALHO, C.R.<sup>1</sup><sup>1</sup> Dep. de Biologia Geral - UFV, Viçosa-MG, <barbara@alunos.ufv.br e ccarvalh@mail.ufv.br>

**RESUMO:** Com o objetivo de obter cromossomos de *C. canephora* ( $2n=2x=22$ ) morfologicamente adequados para serem caracterizados citogeneticamente e identificados para montagem do cariógrama desta espécie, empregaram-se novas técnicas citogenéticas associadas às metodologias computacionais de análise de imagens. Sementes foram germinadas em placas de Petri a 28 °C, em estufa. Raízes com aproximadamente 0,5 cm foram pré-tratadas com brometo de etídeo a 10 µM com 100 µl de DMSO, por 24 h a 5 °C. Fixaram-se as pontas de raízes excisadas em solução de metanol: ácido acético (3:1), armazenando-as -20 °C. Após 24 horas, as pontas de raízes foram digeridas enzimaticamente com solução de Flaxzyme diluída em água destilada (1:60) por 10 minutos à temperatura ambiente. Prepararam-se as lâminas por dissociação celular do meristema, simultaneamente com gotejamento da solução fixadora, sendo elas, em seguida, secadas ao ar. A coloração foi obtida com solução de Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 6,8. As metodologias empregadas permitiram a obtenção de cromossomos com alta qualidade citogenética e resolução adequada para caracterização de cada par de homólogos, aparentemente semelhantes, quando obtidos por meio de técnicas convencionais. A caracterização da morfologia desses cromossomos resultou em dados que diferiram daqueles relatados na literatura.

**Palavras-chave:** citogenética, *Coffea canephora*, café, cariógrama, análise de imagem.

**CYTOGENETIC ANALYSIS OF *Coffea canephora*.**

**ABSTRACT:** With the objective of obtaining chromosomes morphologically adequate to make a caryogram of this species, it was used a new cytogenetics technique associated to a computer methodology of the image analysis. Seeds were germinated in Petri dishes in the dark at 28 °C. Root 0.5 cm in length were pre-treated at 10 µM ethidium bromide solution plus 100 µl DMSO, for 24 h at 5 °C. Root tips were fixed in fresh cold methanol-acetic acid (3:1) and were stored at -20 °C. One day later the root tips were macerated using a Flaxzym enzymatic solution diluted in distilled water (1:60), for 10 min at room temperature. The chromosome slides were prepared by meristem celular dissociations with dropping fixing

solution at the same time, air drying and stained with Giemsa 2% in phosphate buffer, pH 6.8, for 5 min. The methodologies used show a good definition to help chromosome identification, apparently similar when obtained by conventional techniques. The chromosomes characterisation as showing in this study do not agree with those related by other authors.

**Key words:** cytogenetics, *Coffea canephora*, Coffee, caryogram, image analysis.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor mundial de café, cultura que representa uma das maiores fontes de divisas do país. Das espécies cultivadas, apenas o *C. canephora* ( $2n=2x=22$ ) e o *C. arabica* ( $2n=4x=44$ ) são de maior interesse econômico, tendo sido objeto de vários estudos citogenéticos tanto para subsidiar programas de melhoramento quanto para estudos evolutivos no gênero. Iniciaram-se, em 1912 por Faber, investigações numéricas em *Coffea*, porém foi efetuado por Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), um estudo mais amplo sobre a morfologia de cromossomos somáticos em *Coffea*, dentre os quais o *C. canephora*, com elaboração de um ideograma médio para o gênero. Entretanto, técnicas citogenéticas convencionais têm dificultado a caracterização cromossômica das espécies de café, o que resulta em preparações cromossômicas com poucas possibilidades de identificação dos pares homólogos. A similaridade morfológica, o tamanho relativamente pequeno dos cromossomos e os baixos índices metafásicos obtidos em meristemas radiculares também têm dificultado a caracterização citogenética mais adequada dos cromossomos de café. Técnicas mais recentes, associadas com metodologias computacionais de análise de imagem, têm possibilitado resolver, com mais definição, pequenas diferenças entre cromossomos aparentemente semelhantes, morfológicamente, de muitas plantas, principalmente daquelas com cariótipos homomórficos. O presente trabalho teve como objetivo adaptar técnicas citogenéticas, utilizadas com sucesso em outras plantas, para obtenção de preparações com cromossomos morfológicamente mais definidos de *C. canephora*, a fim de caracterizar o cariótipo desta espécie.

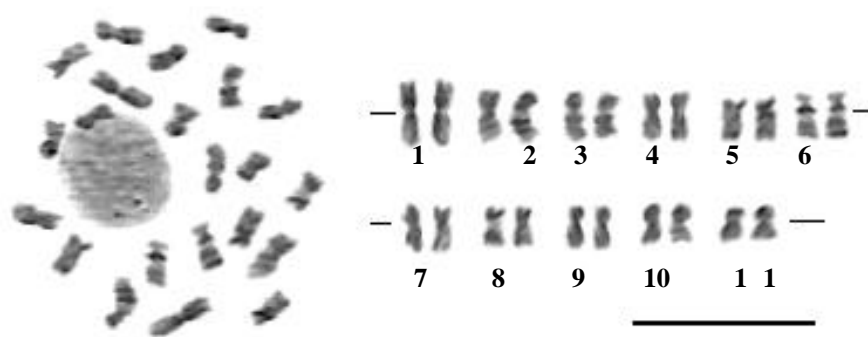
## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *C. canephora* var. Robusta foram germinadas em placas de Petri a 28 °C, em estufa, no escuro. Os meristemas radiculares com aproximadamente 0,5 cm foram pré-tratados com brometo de

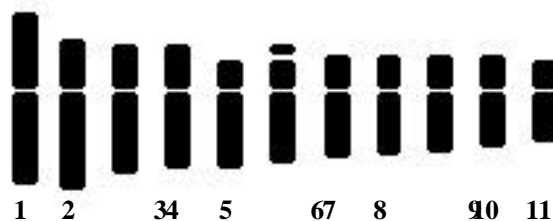
etédeo a 10  $\mu\text{M}$  com 100  $\mu\text{l}$  de DMSO, por 24 h a 5  $^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, as pontas de raízes foram retiradas e fixadas com solução de metanol: ácido acético (3:1), com três trocas a cada 15 minutos, e armazenadas a -20  $^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Digeriram-se as pontas de raízes, enzimaticamente, em solução de Flaxzyme diluída em água destilada (1:60) por 10 minutos. As lâminas foram preparadas por dissociação celular do meristema, simultaneamente ao gotejamento da solução fixadora sobre a lâmina, e, em seguida, secas ao ar, conforme CARVALHO (1995). A coloração foi obtida com solução de Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 6,8 por 5 min. As lâminas foram analisadas ao microscópio, acoplado ao computador, e as imagens mitóticas capturadas analisadas por software específico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a metodologia descrita, foi possível montar o kariograma de *Coffea canephora* ( $2n=22$ ), (Figura 1) e o ideograma, conforme Figura 2. As técnicas citogenéticas empregadas, usando-se brometo de etídeo, um agente intercalante de DNA, dissociação celular e secagem ao ar, resultaram em metáfases e prometáfases morfológicamente definidas, alongadas e espalhadas no mesmo plano de foco na lâmina.



**Figura 1** - Metáfase mitótica e kariograma de *Coffea canephora* var. Robusta ( $2n=2x=22$ ). Observa-se a presença de satélites no par de homólogos 6. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2** - Ideograma do kariótipo mitótico de *Coffea canephora* var. Robusta ( $2n=2x=22$ ), conforme os dados obtidos do Quadro 1.

A qualidade morfológica dos cromossomos permitiu a obtenção de dados morfométricos com resolução suficiente para caracterizar cada par de homólogos. As metodologias computacionais utilizadas permitiram obter medidas com resolução de, aproximadamente, 1 pixel = 0,13  $\mu\text{m}$ , o que facilitou as análises das imagens cromossômicas para montagem do kariograma desta espécie. A fórmula cariotípica foi representada por um par de cromossomos 1m (metacêntricos) e 10sm (submetacêntricos). Identificou-se a presença de satélite, associada com a região de constrição secundária, no braço curto do cromossomo número 6, sugerindo que esta constrição seja a de região organizadora de nucléolo (NOR). Os valores de comprimento médio absoluto variaram de 3,33  $\mu\text{m}$  (cromossomo 1) a 1,57  $\mu\text{m}$  (cromossomo 11) e os de comprimento médio relativo, de 6,86 a 3,23 %. Os dados morfométricos, a relação de braços (r) e o índice centromérico (ic) também foram determinados (Quadro 1).

**Quadro 1** - Dados morfométricos dos cromossomos de *C. canephora* var. Robusta

Cromossomo número	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )			Média	r	ic	Classe	Comprimento relativo (%)
	Braço		Total					
	Curto	Longo						
1A	3,30	1,50	1,80	3,33	1,20	45,45	m	6,81
1B	3,35	1,52	1,83		1,20	45,37	m	6,91
2A	2,81	1,00	1,81	2,90	1,81	35,59	sm	5,80
2B	2,98	0,95	2,03		2,14	31,88	sm	6,15
3A	2,60	0,90	1,70	2,49	1,89	34,62	sm	5,37
3B	2,38	0,80	1,58		1,98	33,61	sm	4,91
4A	2,36	0,90	1,46	2,38	1,62	38,14	sm	4,87
4B	2,40	0,95	1,45		1,53	39,58	sm	4,95
5A	2,10	0,60	1,50	2,11	2,50	28,57	sm	4,33
5B	2,12	0,60	1,52		2,53	28,30	sm	4,37
*6A	1,91	0,50	1,41	1,96	2,82	26,18	sm	3,94
*6B	2,00	0,59	1,41		2,39	29,50	sm	4,13
7A	1,90	0,75	1,15	1,95	1,53	39,47	sm	3,92
7B	1,99	0,70	1,29		1,84	35,18	sm	4,11
8A	1,90	0,70	1,20	1,91	1,71	36,84	sm	3,92
8B	1,91	0,67	1,24		1,85	35,08	sm	3,94
9A	1,86	0,60	1,26	1,88	2,10	32,26	sm	3,84
9B	1,89	0,75	1,14		1,52	39,68	sm	3,90
10A	1,80	0,71	1,09	1,81	1,54	39,44	sm	3,71
10B	1,82	0,70	1,12		1,60	38,48	sm	3,76
11A	1,55	0,60	0,95	1,57	1,58	38,71	sm	3,20
11B	1,58	0,60	0,98		1,63	37,97	sm	3,26

\* medidas não se considerando os satélites.

r = razão entre os braços longo e curto.

ic = índice centromérico.

m = metacêntrico; sm = submetacêntrico.

Os dados das análises cromossômicas, em *C. canephora*, confirmaram que esta espécie tem cromossomos relativamente pequenos, com valores entre 3,33 e 1,57  $\mu\text{m}$ , conforme as observações prévias de Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), e de PIEROZZI et al. (1999). Bouharmont analisou a morfologia de cromossomos somáticos em *Coffea* com base em 13 espécies desse gênero, entre elas o *Coffea canephora*, em que os valores dos comprimentos para o gênero variaram de 1,92 a 2,41  $\mu\text{m}$  para o cromossoma 1 e de 0,97 a 1,18  $\mu\text{m}$  para o cromossomo 11, enquanto as porcentagens correspondentes do genoma variaram de 13,6 a 6,4%. Os resultados obtidos por Bouharmont não concordaram com aqueles obtidos por Mendes (1938), citado por SYBENGA (1960), para *C. dewevrei* (café Excelsa). Ambos trabalharam com pontas de raízes fixadas em Craff e inclusas em parafina, coradas com hematoxilina ou com violeta genciana e seccionadas para análise. Estas técnicas que utilizam cortes seriados limitam e dificultam a interpretação, não sendo mais utilizadas em análises citogenéticas. PIERROZZI et al. (1999), analisando os cromossomos de *C. canephora*, observaram variação no comprimento absoluto de  $2,38 \pm 0,07 \mu\text{m}$  a  $0,85 \pm 0,03 \mu\text{m}$ , bem como de comprimento relativo de  $14,00 \pm 0,23\%$  a  $5,03 \pm 0,19\%$  do cromossomo 1 para o 11, respectivamente. Entretanto, essas observações diferem de SELVARAJ (1987), que analisou o cariótipo somático de 41 espécies pertencentes a 24 gêneros da Rubiaceae, provenientes do sul da Índia. *C. canephora* var. Robusta, com diferentes níveis de ploidia ( $2n=22, 40, 44$ ), foi estudada, e o comprimento dos cromossomos variou em extensão - de 2,8 a 5,5  $\mu\text{m}$ , apresentando comprimento absoluto de 40,1  $\mu\text{m}$ . Esses valores também diferiram dos de LOUARN (1976), que citou variação de comprimento de 1,0 a 1,94  $\mu\text{m}$ . Os diferentes valores dos cromossomos mitóticos relatados na literatura podem ter sido obtidos de análises realizadas em cromossomos, provenientes de tratamentos que resultam em diferentes níveis de compactação, ou pelo uso de sementes de diferentes procedências e variedades.

No presente estudo, a utilização de brometo de etídeo permitiu obter cromossomos metafásicos relativamente mais alongados, o que auxiliou na observação de detalhes morfológicos, principalmente das construções primárias e secundárias. A análise de imagem, associada às técnicas, permitiu medições do comprimento total em micrômetros de cada braço.

A classificação dos cromossomos de *C. canephora*, relatada na literatura, não é consenso quanto aos aspectos morfológicos e à relação de braços. Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), constatou grande uniformidade no comprimento e na morfologia dos cromossomos das várias espécies, relatando ser impossível a individualização dos cariótipos das diferentes espécies. O autor optou pela construção de um cariótipo médio padrão para o gênero *Coffea*, em que se destacam apenas cinco dos

onze cromossomos constituintes do complemento básico do gênero. Os cromossomos 1, 2 e 11 foram classificados como submetacêntricos, os cromossomos 3 e 4 como metacêntricos e os demais (5, 6, 7, 8, 9 e 10) não puderam ser distinguidos pelo autor, o qual apenas relatou que estes variaram de metacêntricos a submetacêntricos. A proposta de criar um mesmo ideograma sem o respaldo da documentação fotográfica original dos cromossomos, para as diferentes espécies, pode ter dificultado a classificação do cariótipo de *C. canephora*, além de os dados terem sido obtidos dentro da limitação imposta pela técnica utilizada, considerando que os cortes citológicos seccionam os cromossomos em vários planos. PIEROZZI et al. (1999) e SELVARAJ (1987), utilizando técnica de esmagamento, chegaram a conclusões quase antagônicas quanto à classificação dos cromossomos de *C. canephora*. PIEROZZI et al. (1999) relataram a ocorrência de três cromossomos metacêntricos (5, 10 e 11) e oito submetacêntricos, enquanto SELVARAJ (1987) documentou os cromossomos por desenhos com tinta nanquim, sem documentação fotográfica, e a ocorrência de oito cromossomos metacêntricos, um submetacêntrico e dois acrocêntricos, não especificando quais deles se enquadravam em cada classe. Os diferentes resultados podem ter sido gerados em consequência da qualidade das preparações citológicas utilizadas, uma vez que o esmagamento, em função da pressão imposta à lamínula, pode gerar cromossomos com morfologia distorcida e dispostas em diferentes planos de foco, o que interfere na análise adequada do cariótipo, principalmente se for considerado o tamanho relativamente pequeno dos cromossomos de *Coffea*.

A presença de satélite nos cromossomos desta espécie também foi relatada por Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), no cromossomo número 4, enquanto SELVARAJ (1987) identificou dois satélites, mas não especificou em quais cromossomos, e estes também não podem ser comprovados pela documentação apresentada.

A constrição secundária no braço longo do cromossomo 1 foi notificada por Bouharmont (1959), citado por SYBENGA (1960), e nos cromossomos 1 e 3 por PIERROZI et al. (1999), com identificação de NOR no cromossomo 3.

Além das técnicas utilizadas nesses estudos, a documentação apresentada das características morfológicas dos cromossomos também não favorece o reconhecimento e a identificação dos dados citados. Alguns autores utilizaram, na caracterização do cariótipo de *C. canephora*, desenhos em tinta nanquim para representar os cromossomos ou fotografias com imagens dos cromossomos em diferentes planos de foco.

## CONCLUSÕES

Neste estudo, a caracterização citogenética revelou que *C. canephora* possui um par de cromossomos metacêntricos (m) e 10 pares submetacêntricos (sm). Foi observada a presença de satélite associado à constrição secundária no braço curto do cromossomo 6. O comprimento médio absoluto variou de 3,33 a 1,57  $\mu\text{m}$ , e o comprimento relativo, de 6,86% a 3,23%. A preservação morfológica dos cromossomos resultou em preparações de alta qualidade citogenética, o que possibilitou a obtenção de dados morfométricos dos cromossomos, suficiente para caracterização e montagem do cariótipo desta espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, C.R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa : UFV, 1995, 127p. (Tese Doutorado/Genética e Melhoramento).
- PIERROZI, N.I.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; CRUZ, N.D. Characterization of somatic chromosomes of two diploid species of *Coffea* L. with acetic and C-band techniques. **Caryologia**, vol 52, n.1-2, 1999.
- SELVARAJ, R. Karyomorphological studies in south Indian Rubiaceae. **Caryologia**, 2:343-3, 1987.
- SYBENGA, J. Genética y citología del café. **Turrialba**, vol.10, n.3, p.82-137, 1960.