

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS CROMOSSOMOS DE *Coffea congestis* OBTIDOS DE SUSPENSÕES DE AGREGADOS CELULARES

Wellington Ronildo Clarindo¹ Email: wellecris@yahoo.com.br, Marcelo Antoniol Fontes², Ana Cláudia F. Cruz² e Carlos Roberto de Carvalho¹.

¹ Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. ² Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BIOCAFÉ), BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Resumo:

O Brasil lidera o mercado mundial de café em produção e exportação e é o segundo maior consumidor desse grão. Parte do aumento da produção tem sido atribuída aos investimentos em programas de melhoramento e às inovações geradas pelos processos biotecnológicos. Espécies do gênero *Coffea* têm sido objetos de estudos citogenéticos, os quais procuram dados de base citológica e genética para contribuir com programas de melhoramento. Entre os diversos níveis de contribuição, essa linha de pesquisa tem forte potencial como ferramenta de prospecção e monitoramento de genomas, considerando-se que a caracterização dos cariótipos gera informações que se estendem da cultura de tecidos a processos de hibridação. Citogeneticamente procurou-se obter cromossomos com morfologia adequada para caracterização de *C. congestis*, com aplicação de metodologias que aumentam o índice metafásico e fornecem cromossomos com morfologia mais adequada para caracterização e montagem de kariogramas. O complemento de *C. congestis* corresponde a $2x=22$ cromossomos, sendo quatro metacêntricos (4, 6, 8 e 9) e sete submetacêntricos (1, 2, 3, 5, 7, 10 e 11). A constrição secundária foi identificada na porção distal do braço curto do cromossomo 7. Com este estudo, espera-se que os resultados descritos representem um avanço na prospecção do genoma do cafeeiro.

Palavras-chave: *Coffea congestis*, cromossomos, suspensão de agregados celulares.

MORFOMETRIC ANALYSIS OF *Coffea congestis* CHROMOSOMES OBTAIN BY CELL AGREGATES SUSPENSION

Abstract:

Brazil leads the world coffee market in production and exportation, and it is the second major worldwide consumer of this grain. Part of the production increasing is ascribed to the investments on breeding programs, and the innovations brought by the biotechnological processes. Species pertained to the genus *Coffea* have been investigated to cytogenetical studies, which search for data with cytological and genetical basis to contribute with breeding programs. Among varied contribution levels, this approach has strong potential as a prospecting and genome monitoring tools, considering that karyotype characterizations generate data ranging from tissue culture to hybridization processes. Cytogenetically it searched to obtain chromosomes with adequate morphology for the characterization of *C. congestis*, with use of methodologies that increase the metaphasic index and provide chromosomes with adequate morphology for karyogram characterization and assembly. The complement of *C. congestis* corresponds to $2x=22$ chromosomes, being four metacentric chromosomes (4, 6, 8 and 9) and seven submetacentric (1, 2, 3, 5, 7, 10 and 11). The secondary constriction was identified on the distal portion of the short arm of chromosome 7. With this study, it is expected that the described results represent an advance on the research of the coffee tree genome.

Key words: *Coffea congestis*, chromosomes, cell aggregates suspension.

Introdução

KRUG (1938), por meio de preparações incluídas em parafina e corte histológico, determinou que *C. congestis* Froehner apresenta $2n=2x=22$ cromossomos. Essa espécie vem sendo utilizada em programas de melhoramento do cafeeiro, com a finalidade de obter híbridos resistentes a patógenos, e em estudos que visam gerar informações acerca da sua contribuição na origem de *C. arabica* (CAIXETA, 2001).

Dados adicionais a respeito da caracterização citogenética de *C. congestis* foram relatados por PINTO-MAGLIO e CRUZ (1987). No preparo das lâminas, os autores utilizaram anteras e a técnica de esmagamento e, com auxílio de um microscópio de contraste de fase, caracterizaram o cromossomo paquitênico que possuía constrição secundária. Os pesquisadores constataram que *C. congestis* apresenta um cromossomo com constrição secundária, sendo esse metacêntrico.

Visando obter uma análise mais detalhada dos cromossomos foram adaptadas técnicas citogenéticas para obtenção de prometáfases e metáfases adequadas para caracterizar morfometricamente os cromossomos de *C. congestis*.

Material e Métodos

As suspensões de agregados celulares foram obtidas de calos embriogênicos friáveis cultivados em Erlenmeyers contendo 100 ml de meio de cultura líquido VB2 (van BOXTEL e BERTHOULY, 1996) sob agitação contínua a 110 rpm e subcultivadas em intervalos de 15 dias. O agente anti-tubulínico amiprofos-metil (APM) foi adicionado numa concentração final de 4 μ M nos Erlenmeyers. Após 4 h os agregados foram fixados em metanol:ácido acético (3:1) e armazenados à -20^o C.

Os agregados, depois de transferidos para tubos de microcentrifuga Eppendorfs, foram lavados em água destilada, para remoção do fixador. Em seguida, foram adicionadas solução enzimática FlaxzymTM (NOVO) e água destilada, na proporção de 1:30 (enzima: água). Os tubos foram mantidos à temperatura de 34 ^oC por 30 minutos. Após a maceração, a solução enzimática foi retirada, e os agregados foram fixados em solução de metanol: ácido acético (3:1) (CLARINDO et al., 2002; 2003). As lâminas foram preparadas pelas técnicas de dissociação celular e secagem ao ar (CARVALHO, 1995), e coradas com solução de Giemsa 5%, por 3 minutos.

As preparações foram observadas em fotomicroscópio OlympusTM, modelo BX60, equipado com acessórios de análise de imagem, iluminação de campo claro e de fluorescência; com objetiva de imersão de 100X. As figuras cromossômicas adequadas foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera acoplada ao microscópio e a um computador MacintoshTM equipado com placa digitalizadora. As análises morfométricas dos cromossomos foram realizadas usando o programa Image SXM (BARRETT, 2002) de domínio público, o qual pode ser obtido via internet (<http://reg.ssci.liv.ac.uk>). Os braços de cada cromossomo foram medidos em pixels e convertidos em escala de micrômetros. A razão entre os braços (r) e o índice centromérico (ic) foram determinadas segundo o critério de classificação morfológica dos cromossomos descrito por GUERRA (1986).

Resultados e Discussão

O cariógrama de *C. congensis* é composto por 11 pares de cromossomos sendo quatro metacêntricos (4, 6, 8 e 9) e sete submetacêntricos (1, 2, 3, 5, 7, 10 e 11). A análise citogenética revelou, também, a presença de um cromossomo com constrição secundária, cromossomo 7 (figura 1a). O idiograma da espécie (figura 1b) foi montado com base nos dados morfométricos listados no quadro 1.

Para montagem do cariógrama de *C. congensis* foram utilizadas prometáfases apresentando constrições primárias e secundárias definidas (figura 1a). Os cromossomos nessa fase do ciclo celular apresentam-se com baixo grau de compactação o que facilitou a identificação de cada par de homólogo e a caracterização morfométrica dos mesmos.

No cariógrama de *C. congensis* observou-se que a constrição secundária está localizada no cromossomo 7 (figura 1a). Esse cromossomo provavelmente possui, na constrição secundária, os genes rDNA responsáveis pela formação e manutenção do nucléolo no núcleo interfásico, ou seja, a região organizadora do nucléolo (RON) ativa. Essas informações poderão ser utilizadas em estudos que visam confirmar a presença da RON ativa nessa região cromossômica.

Quadro 1- Medidas morfométricas dos cromossomos prometafásicos de *C. congensis*.

<i>C. congensis</i>						
Cromossomo	Total (μ m)	Braço (μ m)		r	Classe	Comprimento Relativo(%)
		Curto	Longo			
1	5,45	2,15	3,30	1,53	SM	13,20
2	4,60	1,55	3,05	1,97	SM	11,14
3	4,40	1,50	2,90	1,93	SM	10,65
4	3,90	1,80	2,10	1,17	M	9,44
5	3,65	1,45	2,20	1,52	SM	8,84
6	3,60	1,65	1,95	1,18	M	8,72
7	3,35	1,00	2,35	2,35	SM	8,11
8	3,30	1,45	1,85	1,28	M	7,99
9	3,15	1,40	1,75	1,25	M	7,63
10	2,95	1,15	1,80	1,57	SM	7,14
11	2,95	1,10	1,85	1,68	SM	7,14
Total	41,30					100,00

M - metacêntrico; SM - submetacêntrico.

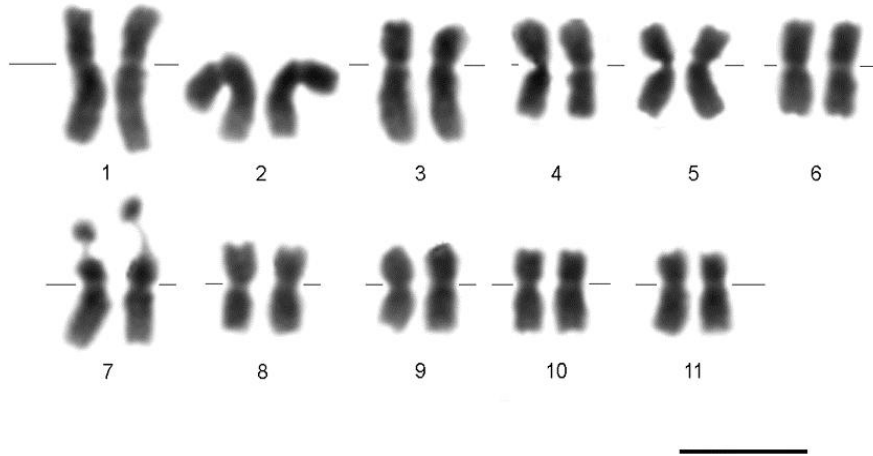


Figura 1a- Cariograma de *C. congestis* ($2x=22$ cromossomos). Cromossomos prometáfásicos pré-tratados com APM a $4 \mu\text{M}$, por 4 h, e corados com Giemsa a 5%. Observar as constrições primárias e secundárias definidas. (barra = $5 \mu\text{m}$).

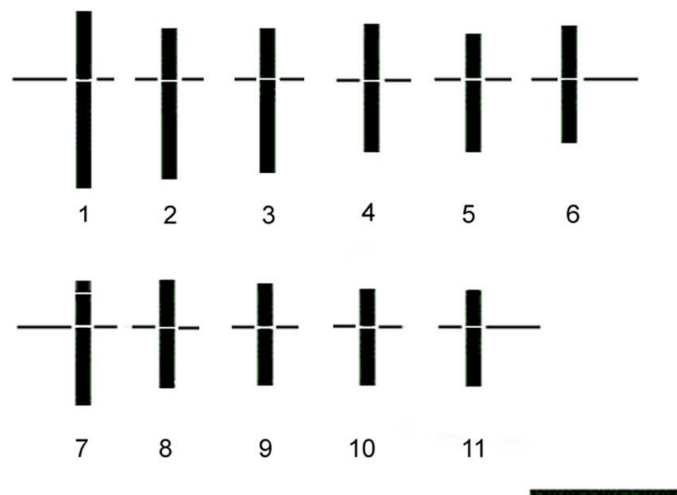


Figura 1b- Idiograma da espécie *C. congestis*, estruturado com base nas informações do quadro 1, evidenciando constrições primárias e secundária (barra = $5 \mu\text{m}$).

A metodologia utilizada no presente estudo proporcionou o acúmulo de prometáfases e metáfases. Nesta metodologia emprega-se, para obtenção de células em divisão, suspensões de agregados celulares. Considerando as dificuldades existentes, baixa taxa de germinação e baixo índice metafásico, quando meristemas radiculares de café são utilizados como fonte de material citogenético; as suspensões de agregados celulares representam uma alternativa viável para aquisição de células em divisão.

A utilização do anti-tubulínico APM, as etapas de fixação, maceração enzimática, dissociação celular e secagem ao ar também foram importantes no acúmulo de células prometáfásicas e metafásicas e proporcionaram cromossomos morfológicamente preservados e não sobrepostos, adequados para análise citogenética.

A presença de prometáfases com cromossomos morfológicamente bem preservados, pouco condensados e com constrições bem definidas possibilitou a montagem do cariótipo de *C. congestis* e a obtenção de informações acerca da organização do genoma dessa espécie. Com este estudo, espera-se que os resultados descritos representem um avanço na prospecção do genoma do cafeeiro.

Referências bibliográficas

- BARRETT, S. D. Software for scanning microscopy. *Proceedings of the Royal Microscopy Society*, 37: 7-14, 2002.
- CAIXETA, G. Z. T. Gerenciamento da cafeicultura em época de crise. *Tecnologias de produção de café com qualidade*. Visconde de Rio Branco, MG: 2001. 80 p.
- CARVALHO, C. R. Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.). Viçosa, MG: UFV, 1995. 127 p. (Tese D. S.).
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; GASPERAZZO, T. A.; FONTES, M. A. Morfometria dos cromossomos de *Coffea arabica* L. var. Catuaí Vermelho. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindóia, SP. Resumos... (CD-ROM).
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; FONTES, M. A. Bandeamento NOR e coloração com laranja de acridina em cromossomos metafásicos de *Coffea canephora*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia, SP. Resumos... (CD-ROM).
- GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, 9: 741-743, 1986.
- KRUG, C. A. Variações somáticas em *Coffea arabica* L. Instituto Agrônomo do Estado, em Campinas, 12: 1-11, 1938.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. *Caryologia*, 40: 7-23, 1987.
- van BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44: 7-17, 1995.