

DISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS EM CROMOSSOMOS DE *coffea arabica*¹

Carlos R. M. da Silva²; Fabrício R. Lopes³; Claudia M. A. Carareto⁴; André L. L. Vanzela⁵;
Douglas S. Domingues⁶; Luiz Filipe Pereira⁷

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

²Bolsista CBP&D/Café, D.Sc., Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina-PR, carmaxbio@hotmail.com

³Bolsista FAPESP, MSc. Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto-SP fabricio@ibilce.unesp.br

⁴ Professora Titular, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto-SP carareto@ibilce.unesp.br

⁵ Professor, D.Sc., Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-PR andrevanzela@uel.br

⁶ Pesquisador, D.Sc., Lab. de Biotecnologia Vegetal (LBI), IAPAR, Londrina-PR, doug@iapar.br

⁷ Pesquisador, PhD, Embrapa Café/LBI-IAPAR, filipe.pereira@embrapa.br

RESUMO: Nos últimos anos o Brasil vem se destacando na pesquisa genética de cafeeiros, principalmente na área de melhoramento. Recentemente, a pesquisa em biotecnologia de cafeeiros vem ganhando espaço devido aos trabalhos em genômica, estes trabalhos juntamente com estudos citogenéticos têm contribuído muito para o entendimento da organização genômica em algumas espécies de *Coffea*. Neste gênero com mais de 100 espécies, as mais importantes economicamente são *Coffea arabica* e *C. Canephora*. A primeira espécie é a única e tetraplóide ($2n = 44$) do gênero, enquanto as demais são auto-incompatíveis e diplóides. Apesar das análises citogenéticas e moleculares indicarem que *C. arabica* é um anfidiplóide, ainda existe dificuldade para se confirmar os seus parentais. Isto se deve possivelmente a alta similaridade do genoma entre estas espécies de *Coffea*, uma possível consequência da presença de famílias repetitivas de DNA comuns a essas espécies. Porém, ainda são escassos os estudos sobre a distribuição e caracterização de famílias de DNA repetitivos em *Coffea*. Estes estudos limitam-se a identificar regiões heterocromáticas e localização de sítios de DNA ribossômico (DNAr) 45S e 5S. Com relação aos elementos transponíveis (TEs), foi encontrado um predomínio de retrotransposons *Copia* e *Gypsy*. Uma vez que a identificação e localização destes elementos transponíveis pode auxiliar a compreensão da organização genômica das espécies de *Coffea*, o objetivo deste estudo foi identificar a distribuição cromossômica em *C. arabica* de três elementos transponíveis. Para isso sondas de três clones contendo as sequências de elementos transponíveis, dois transposons *MuDR* e *Tip100* (Ca_TE-009, Ca_TE-050) e um retrotransposon LTR *deal* (Ca_TE-079), foram hibridadas em *Coffea arabica*. Os resultados indicam uma distribuição co-localizada entre os transposons analisados e regiões terminais heterocromáticas, contudo o retroelemento possui uma distribuição mais dispersa. Estudos futuros serão feitos para identificar a distribuição destes elementos transponíveis nas espécies consideradas progenitoras de *C. arabica*.

Palavras-chave: citogenética, *Coffea arábica*, elementos transponíveis, FISH

DISTRIBUTION OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN CHROMOSOMES OF *COFFEA ARABICA*

Abstract: In recent years Brazil has been increasing its genetic research of *Coffea*, especially in the area of plant breeding. Recently, research in *Coffea* biotechnology has gained ground due to genomics research, these works together with cytogenetic studies have contributed greatly to the understanding of genome organization in some species of *Coffea*. In this genus with over 100 species, the most important economically are *Coffea arabica* and *C. canephora*. The first species is the only tetraploid ($2n = 44$) of the genus, while the others are self-incompatible and diploid. Although cytogenetic and molecular analysis indicate that *C. arabica* is a allopolyploid, there is still difficulty to confirm their parents. This may be due to high similarity of the genome between these species of *Coffea*, and a possible consequence is the presence of families of repetitive DNA common to these species. However, there are still few studies on the distribution and characterization of the families of repetitive DNA in *Coffea*. These studies are limited only to identify heterochromatic regions and locate sites of ribosomal DNA 45S and 5S. With respect to transposable elements (TEs) it has been found a predominance of *Gypsy* and *Copia* retrotransposons. Since the identification and location of these transposable elements may aid the understanding of genomic organization of *Coffea* species, the objective of this study was to identify the chromosome distribution in *C. arabica* of three transposable elements. To do this, probes of three clones containing sequences of transposable elements, two transposon *MuDR* and *Tip100* (Ca_TE-009, Ca_TE-050) and an LTR retrotransposon *deal* (Ca_TE-079), were hybridized with *Coffea arabica*. The results indicate a co-located distribution between the transposon and heterochromatic terminal regions, but the retrotransposon *deal* showed a more dispersed distribution in the chromosomes. Future studies will be made for the identification of the distribution of transposable elements in different *Coffea* species regarded as progenitor of *C. arabica*.

Key words: cytogenetics, *Coffea arabica*, transposable elements, FISH

Introdução

O gênero *Coffea* L. (família Rubiaceae, subfamília Cinchonoideae, tribo Coffeae) é formado por mais de 100 espécies nativas das florestas tropicais da África e de Madagascar, das quais apenas *Coffea arabica* L., *C. canephora* Pierre ex A. Froehner são utilizadas na produção da bebida, sendo as duas primeiras mais importantes economicamente (Leroy et al., 2005). O Brasil é o líder mundial em produção e exportação de café, com o segundo maior mercado consumidor do grão (Vidal et al., 2010). Além desta importância econômica, o Brasil também se destaca na pesquisa genética de cafeeiros, principalmente na área de melhoramento. Recentemente a pesquisa em biotecnologia de cafeeiros vem ganhando espaço devido aos trabalhos em genômica (Vidal et al., 2010; Mondego et al., 2011). O mapeamento genético é uma das ferramentas de biologia molecular mais importante para o auxílio no melhoramento de plantas. Aliado a estes estudos, as análises cito-moleculares têm contribuído muito para o entendimento da organização genômica em algumas espécies de *Coffea* (Lashermes et al., 1999; Hamon et al., 2009; Yuyama, 2010).

Coffea arabica é uma espécie autógama e a única tetraplóide ($2n = 44$) do gênero, enquanto as demais são auto-incompatíveis e diplóides (Berthaud & Charrier, 1988). Estudos citogenéticos e moleculares indicam que *C. arabica* é um anfidiplóide formado a partir da hibridação dos genomas de *C. eugenioides* e *C. canephora* ou *C. congensis* Frohner (Raina et al., 1998; Lashermes et al., 1999). A dificuldade para identificar os parentais de *C. arabica*, pode ser devido a alta similaridade do genoma entre estas espécies de *Coffea*, como mostrado por Lashermes et al. (1999), que pode ser, em parte, uma consequência da presença de famílias repetitivas de DNA comuns a essas espécies. Contudo, são escassos os estudos sobre a distribuição e caracterização de famílias de DNA repetitivos em *Coffea*.

As sequências repetitivas podem ser classificadas em dois grandes grupos, de acordo com sua organização e disposição nos genomas. O primeiro grupo inclui sequências em tandem, por exemplo, as repetições teloméricas, DNAr e os DNAs satélites. O segundo grupo é formado por sequências dispersas nos genomas, compreendendo principalmente a maioria dos elementos transponíveis. Tais elementos possuem a capacidade de mobilização no genoma de um organismo, podendo produzir mutações instáveis, dependendo do local de inserção. Esses elementos são classificados de acordo com a similaridade da sequência e o modo de transposição, podendo ser por meio de DNA (transposons) ou a partir de RNA (retrotransposons) (Charlesworth et al., 1994; Kubis et al., 1998).

Os estudos de DNAs repetitivos no gênero se concentram na localização de sítios de DNAr 45S e 5S. Hamon et al. (2009) mostraram que o número de segmentos de DNAs ribossômicos (DNAr) em *Coffea* está correlacionado com a possível região de origem das espécies na África. As espécies da África Oriental, como *C. eugenioides*, *C. racemosa* Lour. e *C. sessiliflora* D. M. Bridson, apresentaram quatro sítios de DNAr 45S e dois sítios de 5S, enquanto que as espécies da África Ocidental e Central, como *C. canephora* e *C. congensis* mostraram dois sítios de 45S e quatro sítios de 5S. *Coffea arabica* apresentou seis sítios de 45S e quatro de 5S. Variações no número de sítios de DNAr 45S também foram observados por Yuyama et al. (2010), estes autores encontram dois sítios de hibridação em *C. canephora* e *C. liberica* var. *dewevrei*, quatro sítios em *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. racemosa* e *C. stenophylla* e também seis sítios em *C. arabica*, todos terminais e coincidentes com regiões heterocromática ricas em CG (bandas CMA₃⁺). Com relação aos elementos transponíveis (TEs), o principal estudo em larga escala (Lopes et al., 2008), baseado em sequências expressas, observou que as superfamílias mais abundantes de retrotransposons foram *Copia* e *Gypsy*, que correspondem ao principal componente do genoma em plantas (Kumar & Bennetzen, 1999). Apesar destes estudos, a caracterização citogenética de TEs para as espécies de *Coffea* é, até o momento, limitada. Uma vez que a identificação e localização destes elementos transponíveis pode auxiliar a compreensão da organização genômica das espécies de *Coffea*, o objetivo deste estudo foi identificar a distribuição cromossômica em *C. arabica* de três elementos transponíveis: um retroelemento (*deal*) e dois transposons de DNA (*MuDR* e *Tip100*).

Materiais e Métodos

As plântulas de *C. arabica* var. *typica* utilizadas no estudo foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina, Paraná, e cultivadas em tubetes no viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) na Universidade Estadual de Londrina. Para a obtenção de lâminas foram utilizados meristemas radiculares pré-tratados, com uma solução saturada de paradiclorobenzeno (PDB), por uma hora a temperatura ambiente, seguido de 23 horas a 14°C. As amostras foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v:v) e diretamente utilizadas no preparo de lâminas ou mantidas a -20 °C até o uso.

As hibridações *in situ* (FISH) foram feitas como descrito por Vanzela et al. (2002). Para o preparo das lâminas as raízes foram digeridas em uma solução enzimática contendo celulase 4% (m:v) e pectinase 40% (v:v) a 37°C, dissecadas em uma gota de ácido acético 60% e esmagadas. Após a confecção da lâmina, o material foi tratado com RNase (100 µg/mL) e desidratadas em uma série alcoólica (70% e 100%). Os clones contendo as sequências de elementos transponíveis foram obtidos por Lopes et al. (2011). Três clones contendo as sequências de elementos transponíveis, dois transposons *MuDR* e *Tip100* (Ca_TE-009, Ca_TE-050) e um retrotransposon LTR *deal* (Ca_TE-079), foram utilizados como sonda para a FISH. Estes clones (plasmídeos) foram marcados com biotina-14-dATP por *nick translation*. Sobre cada lâmina foi aplicada uma mistura de hibridação (31 µL) contendo 5 µL de sonda marcada (100 a 200 ng), 15 µL de formamida a 50%, 6 µL de polietilenoglicol a 50%, 3 µL de 20× SSC (pH 7,0), 1 µL de DNA de timo de bezerro fragmentado (100 ng) e 1 µL SDS a 10%. A mistura de hibridação foi desnaturada a 70 °C e a

hibridação foi feita a 37 °C por pelo menos 12 h em uma câmara úmida. As lavagens pós-hibridação foram feitas em 2× SSC, formamida a 20% em 0,1× SSC, 0,1× SSC e 4× SSC/Tween 20 2%, todas a 37 °C. As sondas foram detectadas com avidina/FITC 1:100 (v:v) em BSA 50%. As lavagens pós-deteção foram feitas em 4× SSC/Tween 20 2%, em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com solução composta de glicerol (90%), 1,4-diaza-bicyclo (2,2,2)-octane (2,3%), 20 mM TrisHCl, pH 8,0 (2%), 2,5 mM MgCl₂ (4%), água destilada (1,7%), e 1 µL de 2 µg/mL DAPI.

As análises citogenéticas foram feitas em pelo menos cinco metáfases para cada sonda e as imagens foram capturadas separadamente em tons de cinza com um microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B, equipado com uma câmera DFC 300FX e sobreposto com a cor vermelho para DAPI e verde-amarelado para FITC (sonda). As imagens foram otimizadas para o melhor contraste e brilho, utilizando o software Adobe Photoshop CS.

Resultado e Discussão

Os resultados revelaram sinais terminais e intersticiais, com as três sondas, em vários cromossomos de *C. arabica* ($2n = 44$). A hibridação *in situ* (FISH) com a sonda Ca_TE-009 (com o transposon *MuDR*) mostrou sinais terminais em 18 cromossomos e apenas um par cromossômico exibiu sinais intersticiais (Fig. 1A). A hibridação *in situ* com a sonda Ca_TE-050 (com o transposon *Tip100*) revelou sinais terminais em 10 cromossomos, sendo que em um par cromossômico dois sinais foram observados (Fig. 1B). A sonda Ca_TE-079 (com o retroelemento *deal*) revelou sinais em 24 cromossomos, estes sinais apareceram mais dispersos ao longo dos cromossomos, com dois pares revelaram fortes sinais terminais e outros dois revelaram sinais pericentromérico (Fig. 1C).

A maioria dos sinais de hibridação em *C. arabica*, obtidos com a sonda Ca_TE 009 e Ca_TE-050 está localizada na região terminal dos cromossomos, possivelmente coincidindo com regiões de heterocromatina CG⁺, pois *C. arabica* possui vários cromossomos com regiões terminais heterocromáticas (Hamon et al., 2010; Yuyama, 2010). Além desta co-localização, houve uma variação no número de sítios entre *MuDR* e *Tip100*, com predomínio de *MuDR* em relação a *Tip100*. O retroelemento *deal*, apesar dos sinais também terminais, exibiu uma maior quantidade de sinais intersticiais. Yuyama (2010) estudou a distribuição de um fragmento do retroelemento Ty3-gypsy-like, em sete espécies de *Coffea*, entre elas *C. arabica*, e encontrou um padrão de distribuição disperso e coexistência ou não com regiões ricas em heterocromatina, para esta espécie. Contudo, segundo a autora esses retroelementos não foram responsáveis por grandes alterações na organização dos cariótipos, das espécies por ela estudadas.

CONCLUSÕES

Ainda são escassos na literatura dados de distribuição de elementos transponíveis em *Coffea*, os resultados indicam uma distribuição co-localizada entre os transposons analisados e regiões terminais heterocromáticas, contudo o retroelemento possui uma distribuição mais dispersa. Estudos futuros serão feitos para identificar a distribuição destes elementos transponíveis nas espécies consideradas progenitoras de *C. arabica*. Os estudos de FISH revelaram a dificuldade na determinação dos progenitores de *C. arabica*, provavelmente porque o grupo apresenta genomas semelhantes e, assim, partilham de famílias repetitivas em comum. Portanto, a identificação destas famílias em muito poderá auxiliar nos estudos de caracterização genômica em *Coffea*.

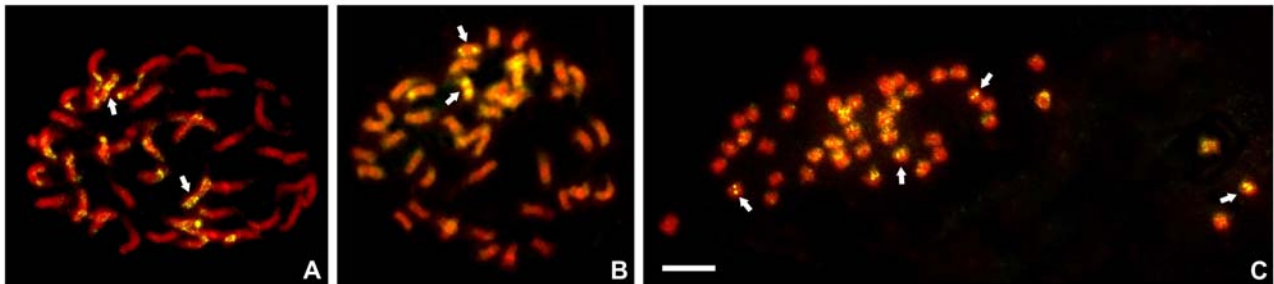


Figura 1. A) FISH com a sonda Ca_TE-009, contendo o transposon *MuDR*, em prometáfase de *Coffea arabica*. As setas apontam os sinais intersticiais. B) FISH, com a sonda Ca_TE-050, contendo o transposon *Tip100*, em prometáfase de *Coffea arabica*. As setas apontam para os cromossomos que possuem dois sinais de hibridação. C) FISH com a sonda Ca_TE-079 contendo o retroelemento *deal*, em metáfase de *Coffea arabica*. Note os sinais dispersos nos cromossomos. As setas apontam os sinais pericentroméricos. Barra = 5µm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHAUD J.; CHARRIER A., Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE RJ, MACRAE R (eds) *Coffee*. London: Elsevier Applied Science, 42p 1988.
- CHARLESWORTH B; SNIEGOWSKI P; STEPHAN W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, n. 371, p. 215-220, 1994.

- HAMON P; SILJAK-YAKOVLEV S; SRISUWAN S; ROBIN O; PONCET V; HAMON S; KOCHKO A., Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. **Chromosome Research**, n. 17, p. 291-394, 2009.
- KUBIS S; SCHMIDT T; HESLOP-HARRISON J.S., Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. **Annals of Botany**, n. 82 (Suplementar A), p. 45-55, 1998.
- KUMAR A.; BENNETZEN J. L., Plant retrotransposons. **Annual Review of Genetics**, n. 33 p. 479-532 1999.
- LASHERMES P; COMBES M.C; ROBERT J; TROUSLOT P; D'HONT A; ANTHONY F; CHARRIER A., Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Mol Gen Genet** n. 261 p. 259–266. 1999.
- LEROY T; MARRACCINI P; DUFOUR M; MONTAGNON C; LASHERMES P; SABAU X; FERREIRA L.P; JOURDAN I; POT D; ANDRADE A.C; GLASZMANN J.C; VIEIRA L.G.E; PIFFANELLI P Construction and characterization of a *Coffea canephora* BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes, **Theor Applied Genet**. 111: 1032-1041 2005.
- LOPES F.R; CARAZZOLLE M.F; PEREIRA G.A.G; COLOMBO C.A; CARARETO C. M. A., Transposable elements in *Coffea* (Gentianales: Rubiaceae) transcript and their role in the origin of protein diversity in flowering plants. **Molecular Genetics and Genomics**, n. 279 p. 385-401, 2008.
- MONDEGO J.M; VIDAL R.O; CARAZZOLLE M.F; TOKUDA E.K; PARIZZI L.P; COSTA G.G; PEREIRA L.F; ANDRADE A.C; COLOMBO C.A; VIEIRA L.G; PEREIRA G.A., An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biol**. n. 8 p 11-30. 2011.
- RAINA S.N; MUKAI Y; YAMAMOTO M., *In situ* hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). **Theoretical and Applied Genetics** n. 97 p.1024-1029 1998.
- VANZELA A.L.L; RUAS C.F; OLIVEIRA M.F; RUAS P.M., Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica* n.114: p.105-111. 2002.
- VIDAL R.O; MONDEGO J.M; POT D; AMBRÓSIO A.B; ANDRADE A.C; PEREIRA L.F; COLOMBO C.A; VIEIRA L.G; CARAZZOLLE M.F; PEREIRA G.A., A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiol**. n. 154 p. 1053-1066 2010.
- YUYAMA P., M., MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO EM ESPÉCIES DE *Coffea L.* (RUBIACEAE) Londrina. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 58 p. 2010.