



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PRISCILA MARY YUYAMA

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO EM ESPÉCIES DE *Coffea*
*L. (RUBIACEAE)***

PRISCILA MARY YUYAMA

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO EM ESPÉCIES DE *Coffea*
*L. (RUBIACEAE)***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Y95m Yuyama, Priscila Mary.

Mapeamento cromossômico em espécies de *Coffea L.* (Rubiaceae) /
Priscila Mary Yuyama. – Londrina, 2010.
47 f. : il.

Orientador: André Luis Laforga Vanzela.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Rubiácea – Teses. 2. Café – Pesquisa – Teses. 3. Mapeamento
cromossômico – Teses. 4. Sondas DNA – Teses. 5. Cariótipos – Teses. 6.
Citogenética vegetal – Teses. I. Vanzela, André Luis Laforga. II.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 582.972.3

PRISCILA MARY YUYAMA

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO EM ESPÉCIES DE *Coffea L.*
(*RUBIACEAE*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal
UFPE – Recife – PE

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
UEL – Londrina – PR

Londrina, 26 de fevereiro de 2010.

Aos meus pais Mineo e Paula e familiares dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, André, pelo incentivo, aprendizado, dedicação, paciência e confiança no meu trabalho. Sobretudo agradeço por ter me ajudado no meu crescimento profissional e pessoal nesses cinco anos.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), pela amizade, paciência, ajuda e pela agradável convivência: Marquinhos, Vanessa, Carol, Carlos, Edihanne, Adriano e Paula.

Aos meus antigos companheiros de laboratório, mas que eu não poderia deixar de agradecer: Thiago, Mari, Elson, Letícia. A todo do LABRE, em especial ao Prof. Dr. José Marcelo D. Torezan, Prof. Dr. Rogério Fernandes Souza e à bióloga Alba Lúcia Cavalheiro.

Aos funcionários do LABRE pela grande ajuda.

Ao Prof. Dr. Laurival Vilas-Boas, Prof. Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira e Prof. Dr. Tumoru Sera pela ajuda, conselhos e experiência compartilhada. Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em especial a Sandra e a Gislaine. Ao Dário e Melissa pela ajuda, paciência e carinho. A Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e principalmente a Maria Sueli Trindade Miranda, pela ajuda, disposição e paciência.

Aos professores e alunos da Pós-Graduação, pelo grande aprendizado e amizade. Aos alunos e professores dos Laboratórios de Citogenética de Peixes, em especial a Profa. Dra. Ana Lúcia Dias.

À Profa. Dra.. Andrea Pedrosa Harand, pela oportunidade de ter conhecido o seu laboratório. Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida. A todas as pessoas que me ajudaram ou torceram pelo meu sucesso. Enfim, agradeço a oportunidade e o prazer de ter realizado este trabalho. Em especial agradeço aos meus pais Mineo e Paula, e aos meus irmãos, Nelson, Carina e Fernando, pela compreensão e ajuda nos momentos difíceis, carinho, sacrifício, torcida e confiança.

YUYAMA, Priscila Mary. **Mapeamento cromossômico em espécies de *Coffea L.* (*Rubiaceae*)**. 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Celular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

O gênero *Coffea L.* (*Rubiaceae*) possui mais de 100 espécies, nativas das florestas tropicais da África e Madagascar. *Coffea arabica L.* é a espécie mais importante economicamente, autocompatível e a única tetraplóide do gênero com $2n = 44$. As demais espécies são diplóides com $2n = 22$ e autoincompatíveis. Estudos moleculares e de hibridação genômica *in situ* revelaram que as espécies de *Coffea* apresentam uma elevada similaridade genômica, podendo ser consequência da presença de famílias de DNA repetitivo em comum. Neste sentido, este estudo buscou isolar e caracterizar elementos repetitivos em *C. arabica* variedade *typica* para utilizá-los como sondas em experimentos de hibridação *in situ* (FISH) em outras seis espécies do gênero, como *C. canephora*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. liberica var. dewevrei*, *C. racemosa* e *C. stenophylla*. Foram feitas análises convencionais, de bandamento C-CMA/DAPI e FISH com DNAr 45S e retroelementos. Os resultados mostraram que as espécies possuem cromossomos do tipo meta e submetacêntrico e núcleos do tipo arreticulado a semirreticulado em todas as espécies, mas rico em cromocentros em *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica var. dewevrei* e *C. stenophylla*. O bandamento cromossômico mostrou predomínio de bandas terminais e intersticiais com diferenças no tamanho, número, distribuição e composição de bases. *Coffea arabica* e *C. canephora* mostraram bandas CMA⁺ e DAPI⁺ intersticiais próximas ao centrômero na maioria dos cromossomos, enquanto as outras espécies mostraram poucas bandas. As bandas CMA⁺ foram encontradas nas regiões terminais, associadas ou não à RON, e intersticiais próximos ao centrômero. As bandas DAPI⁺ foram encontradas somente nas regiões intersticiais próximos ao centrômero, exceto em *C. liberica var. dewevrei* e *C. racemosa*. A FISH com a sonda de DNAr 45S mostrou dois e quatro sítios de hibridação, com exceção de *C. arabica*, com seis sítios. A partir da DOP-PCR, foram feitos o isolamento e a caracterização de dois retroelementos: i) fragmento da transcriptase reversa de grupo indeterminado com 311 pb (pCa21) e ii) fragmento do retroelemento Ty3-gypsy-like com 775 pb (pCa06). Esses clones foram utilizados como sondas na FISH, mostrando blocos e sinais dispersos na maioria dos cromossomos. Foram observados sinais co-localizados para os dois clones e alguns sinais específicos em determinadas regiões para cada clone, sugerindo que pCa21 e pCa06 sejam elementos diferentes. A distribuição das regiões heterocromáticas, sítios de DNAr 45S e dos retroelementos indicam que as famílias de DNA repetitivo se acumularam de modo independente na formação cariotípica dessas espécies. Apesar da ocorrência elevada desses retroelementos na maioria das espécies de *Coffea*, eles não foram responsáveis por grandes alterações na organização dos cariótipos. Ao contrário, este estudo mostrou que a elevada similaridade genômica entre estas espécies podem em parte ser explicada pelo ocorrência comum desses retroelementos.

Palavras-chave: Bandamento. DNAr. FISH. Transcriptase reversa. Ty3-gypsy-like

YUYAMA, Priscila Mary. **Mapping chromosomal species *Coffea L. (Rubiaceae)***. 2010. 47 f. Dissertação (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Coffea L. (Rubiaceae) consists of more than 100 species, native of tropical forests of Africa and Madagascar. The most economically important specie is *Coffea arabica L.*, self-compatible and the only tetraploid with $2n = 44$. The other species are diploid with $2n = 22$ and self-incompatible. Molecular and genomic *in situ* hybridization studies revealed the species of *Coffea* has a high genomic similarity, and this could be due to common families of repetitive DNA. Thus, this study intended to isolate and characterize repetitive elements in *C. arabica* variety *typica* to use them as FISH probes in six species: *C. canephora*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. liberica var. dewevrei*, *C. racemosa* and *C. stenophylla*. Analysis involved conventional, C-CMA/DAPI banding and FISH with 45S rDNA and retroelements. The results showed meta and submetacentric chromosomes and non-reticulate to semi-reticulate nuclei in all species, with evident chromocenters in *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica var. dewevrei* e *C. stenophylla*. The chromosomal banding showed a predominance of terminal and interstitial bands that differ in size, number, distribution and composition of bases. *Coffea arabica* and *C. canephora* showed interstitial CMA and DAPI bands in most chromosomes, while other species showed few bands. CMA bands were found in terminal regions, associated or not with NOR, and interstitial close to the centromere. DAPI bands were found only in the interstitial regions near the centromere, except in *C. liberica var. dewevrei* and *C. racemosa*. FISH with 45S rDNA probe showed two and four sites, except *C. arabica* with six sites. From DOP-PCR products two retroelements were isolated and characterized: i) fragment of reverse transcriptase with indeterminate group of 311 bp (pCa21) and ii) fragment of Ty3-gypsy-like retroelement of 775 bp (pCa06). These clones were used as probes in FISH, showing blocks and dispersed signals in most chromosomes. Co-located signs of two clones and some specific signs in certain regions for each clone indicated that pCa21 and pCa06 are different elements. The distribution of heterochromatic regions, 45S rDNA and retroelements indicate that families of repetitive DNA accumulated independently in the karyotype formation of the group. Despite the high occurrence of these retroelements in most species of *Coffea*, they were not responsible for major changes in the organization of the karyotypes. Although, this study showed the high similarity genomic among these species could be explained by the common occurrence of these retroelements.

Keywords: Banding. DNAr. FISH. Reverse transcriptase. Ty3-gypsy-like.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura dos <i>retrotransposons</i> dos grupos copia e gypsy	14
Capítulo 1	
Figura 1 – Coloração convencional em espécies de <i>Coffea</i>	30
Figura 2 – Bandamento C-CMA/DAPI em espécies de <i>Coffea</i>	32
Figura 3 – Géis mostrando os produtos de PCR para o isolamento de retroelementos.....	34
Figura 4 – Descrição das sequências dos clones pCa21 e pCa06 e sua comparação com outras sequências	35
Figura 5 – Distribuição dos clones pCa21 e pCa06 nos cromossomos de <i>C. arabica</i> variedade <i>typica</i>	37
Figura 6 – Distribuição do DNAr 45S e dos clones pCa21 e pCa06 nos cromossomos de <i>C. canephora</i> e <i>C. eugenioides</i>	41
Figura 7 – Distribuição do DNAr 45S e dos clones pCa21 e pCa06 nos cromossomos de <i>C. liberica</i> var. <i>dewevrei</i> , <i>C. kapakata</i> , <i>C. racemosa</i> e <i>C. stenophylla</i>	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	ASPECTOS GERAIS DE <i>COFFEA</i>	9
1.2	ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE <i>COFFEA</i>	11
1.3	SEQUÊNCIAS DE DNA REPETITIVO	13
	REFERÊNCIAS	17
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
	CAPÍTULO 1 – DISTRIBUIÇÃO DE HETEROCROMATINA E RETROELEMENTOS EM CROMOSSOMOS DE <i>COFFEA</i> <i>L</i>	24
	Introdução.....	25
	Materiais e métodos.....	27
	Resultados.....	30
	Discussão.....	38
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DE *COFFEA*

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. Dessas espécies, cerca de 70% estão ameaçadas de extinção, resultado da degradação florestal (Berthaud e Charrier 1988; Davis et al. 2006). O grupo foi dividido por Bridson (1982) em dois gêneros: *Psilanthus* Hook. F. e *Coffea*. Esses subdividem-se em subgêneros baseados no hábito de crescimento (monopodial ou simpodial) e tipo de inflorescência (axial ou terminal): *Psilanthus* é composto por *Psilanthus* Hook. F. e *Afrocoffea* (Moens) Bridson, e *Coffea*, por *Coffea* L. e *Baracoffea* J.-F.Leroy (Bridson 1987; 1994).

O café é um dos cinco produtos agrícolas mais comercializados e consumidos no mundo, sendo uma das commodity mais valorizada nos mercados internacionais. O Brasil lidera o mercado mundial de café em produção e exportação, sendo o segundo maior mercado consumidor do grão (Food and Agriculture Organization, <http://apps.fao.org>, 2010). As duas espécies economicamente mais importantes são *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (ICO, International Coffee Organization, <http://www.ico.org>, 2010).

Coffea arabica é autógama e a única espécie tetraplóide ($2n = 44$) do gênero, enquanto *C. canephora* e as demais espécies são autoincompatíveis e diplóides (Berthaud e Charrier 1988). *Coffea arabica* é considerada um anfidiplóide (*alotetraplóide*) formado a partir da hibridização natural de *C. canephora* e *C. eugenioides* Moore (Lashermes et al. 1999). A maioria de suas cultivares comerciais foram selecionadas a partir de duas bases populacionais:

C. arabica var. *bourbon* (B. Rodr.) Choussy e *C. arabica* var. *arabica* (usualmente chamada de *C. arabica* var. *typica* Cramer) (Carvalho et al. 1969). Dados históricos indicam que a base genética da var. *bourbon* se originou a partir de poucas plantas de Mocha (Iémen) na Ilha de *Bourbon* (Ilha de Reunião) entre 1715 e 1718 (Haarer 1956), enquanto que a base genética da var. *typica* surgiu a partir de uma única planta na Indonésia,

que foi posteriormente cultivada em Amsterdã no século 18 (Carvalho 1946). Embora a variabilidade genética seja bastante limitada (Anthony et al. 2001; 2002), as variedades apresentam uma grande diversidade morfológica (Krug et al. 1938). Além disso, espécies silvestres estão sendo bastante estudadas para a introdução de caracteres, a fim de obter híbridos mais resistentes a diferentes doenças.

Coffea arabica é considerada a espécie preferida do gênero devido à melhor qualidade da bebida (Campa et al. 2004). É caracterizada por apresentar plantas de dois a sete metros de altura e frutos vermelhos ou amarelos, quando maduros (Carvalho et al. 1988). Por outro lado, *C. canephora* fornece uma bebida de qualidade inferior ao *C. arabica*, mas é muito utilizada no consumo de cafés solúveis e como blend em cafés torrados e moídos (Malavolta 2000). As variedades são de porte médio a grande e frutos vermelhos a amarelos quando maduros. Algumas delas, como a var. *robusta* (Linden) Chev. e a var. *laurentii* (De Wild.), apresentam resistência a ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br) (Fazuoli 1986; Fazuoli et al. 1999).

O Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) mantém desde 1972 uma coleção com espécies selvagens (IAPAR, <http://www.iapar.br>, 2010), as quais são utilizadas em experimentos de melhoramento do café, como: i) *Coffea eugenoides*, com altura média de dois a três metros, frutos vermelhos quando maduros e resistência à ferrugem; ii) *Coffea kapakata* (A. Cheval.) D. M. Bridson, de porte pequeno, cerca de um a três e meio metros de altura, e frutos vermelhos-alaranjados quando maduros; iii) *Coffea liberica* var. *dewevrei* Hiern, de porte alto (até 20 metros de altura), frutos vermelhos quando maduros, com resistência à ferrugem, nematóides e ao bicho-mineiro (*Perileuoptera coffeella* Guer-Men) (Fazuoli et al. 1999); iv) *Coffea racemosa* Lour., com altura aproximada de três metros, frutos roxos quando maduros, resistência ao bicho-mineiro e à seca, além de ser extremamente precoce em relação ao desenvolvimento e à maturação dos frutos (Guerreiro-Filho, 1992); e v) *Coffea stenophylla* G. Don, de porte alto, com cerca de três a seis metros de altura, frutos pretos quando maduros, também com resistência à seca e ao bicho-mineiro (Carvalho 1988).

1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE COFFEA

Estudos para determinar a morfologia dos cromossomos somáticos de café foram realizados inicialmente por Mendes (1938) em *C. excelsa* Chev. (atualmente reconhecida como *C. liberica* var. *dewevrei*). Contudo, este autor encontrou dificuldades técnicas, uma vez que os cromossomos são muito pequenos (1 a 3 μm) e morfologicamente similares. Clarindo e Carvalho (2008, 2009) desenvolveram o primeiro cariógrama de alta definição para *C. arabica* e *C. canephora*. *Coffea arabica* é composta por cinco pares metacêntricos, 16 pares submetacêntricos e um par acrocêntrico, originados de progenitores com cariótipos muito semelhantes. *Coffea canephora* é composta por dois pares metacêntricos e nove submetacêntricos. Os pares 1, 10 e 11 de *C. canephora* são muito similares aos pares 1, 19 e 21 de *C. arabica*. Essas informações básicas reforçam a posição de *C. canephora* como progenitor de *C. arabica* como observado em estudos de ITS (Lashermes et al. 1997), RFLP e hibridação genômica in situ (Lashermes et al. 1999) e ISSR (Ruas et al. 2003).

Estudos com bandamento-C e fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) foram realizados para determinar a ocorrência e a localização da heterocromatina em espécies de *Coffea* (Lombello e Pinto-Maglio 2004a; 2004b; Hamon et al. 2009). Estudos de bandamento CMA/DAPI foram feitos inicialmente em sete espécies de *Coffea* (Lombello e Pinto-Maglio 2004a, 2004b). Esses autores encontraram variações no número e na localização das bandas CMA⁺ em *C. canephora* cv. Apoatã (terminal (T) em um par), *C. humilis* A. Cheval. (cerca de quatro pares, sem posição definida), *C. kapakata* (A. Cheval.) D. M. Bridson (T em um par e intersticial (I) em um par), *C. salvatrix* Swynnerton & Philipson (T em dois pares), *C. sessiliflora* D. M. Bridson (T em dois pares), *C. sp.* Moloundou (T em um par, com duas bandas em cada cromossomo do par de homólogos) e *C. stenophylla* G. Don (T em um par e I em um par). Bandas DAPI⁺ foram encontradas somente em *C. stenophylla*, porém, sem definição do número de bandas e do par cromossômico. Em um estudo mais recente realizado por Hamon et al. (2009), 16 espécies de *Coffea* foram analisadas, observando variações no número e na localização das bandas CMA⁺ e DAPI⁺. As bandas CMA⁺ foram localizadas nas regiões terminais, subterminais, intersticiais e/ou proximais. Das 16 espécies, as cinco espécies citadas no trabalho anterior apresentaram variações com relação ao número de bandas: *C. canephora* (T em dois pares e I em um par),

C. salvatrix (T em dois pares e I em um par), *C. sessiliflora* (T em dois pares e I em dois pares), *C. sp. Moloundou* (T em um par e I em um par) e *C. stenophylla* (T em um par, I em um par e proximal (P) em dois pares). As bandas DAPI⁺ foram encontradas nas regiões intersticiais na maioria das espécies e sem definição do par. Interessante que Hamon et al. (2009) não evidenciaram bandas DAPI⁺ em *C. stenophylla*, como observado por Lombello e Pinto Maglio (2004a).

Em relação à localização física do DNA ribossomal (DNAr), Lombello e Pinto-Maglio (2004a, 2004b) mostraram dois sítios terminais de DNAr 45S em *C. canephora* cv. Apoatã, *C. kapakata*, *C. humilis*, *C. salvatrix*, *C. sessiliflora* e *C. stenophylla* e quatro sítios terminais em *C. sp. Moloundou*. Em relação ao DNAr 5S, todas as espécies analisadas mostraram dois sítios intersticiais. Contudo, Raina et al. (1998) revelaram quatro sítios de DNAr 45S e seis de 5S em *C. arabica*, com dois sinais de 5S localizados em um cromossomo de cada homólogo (sem identificação do par).

Hamon et al. (2009) mostraram que o número de segmentos de 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*, *C. salvatrix* e *C. sessiliflora*, apresentaram quatro sítios de 45S e dois sítios de 5S, enquanto que espécies da África Ocidental e Central, como *C. canephora*, *C. liberica var. dewevrei*, *C. sp. Moloundou* e *C. stenophylla*, mostraram dois sítios de 45S e quatro sítios de 5S. *Coffea arabica* apresentou seis sítios de 45S (T) e quatro de 5S (I). A perda de sítios de DNAr em espécies *alotetraplóides*, comparado com os seus progenitores, tem sido documentada em *Chlorophytum Ker Gawl.* e *Glycine L.* (Krishman et al. 2001; Lavania et al. 2005). Segundo Mishima et al. (2002), sítios de 5S geralmente são eliminados depois do processo de poliploidia, enquanto os sítios de 45S são mais conservados, por ocorrência de processos de crossing-over desigual, conversão de genes e eventos de transposição (Leitch e Heslop-Harrison 1993; Taketa et al. 1999; Hasterok et al. 2001).

1.3 SEQUÊNCIAS DE DNA REPETITIVO

As famílias de DNA repetitivo são formadas por motivos que variam desde dinucleotídeos a mais de 10.000 pares de bases. Esses motivos podem aparecer repetidos de centenas até milhares de vezes no genoma, podendo estar localizados em regiões definidas ou amplamente dispersos nos cromossomos (Kubis et al. 1998). 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*, como 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 *retrotransposons* utilizam um RNA intermediário e a enzima transcriptase reversa para produzir uma nova molécula de DNA. Por ação da integrase, o DNA recém sintetizado é integrado ao genoma em posições cis (formando blocos) ou trans (caráter disperso) (Kazazian 2004). Este tipo de mecanismo pode levar ao acúmulo de muitas cópias, aumentando significativamente o tamanho dos genomas, como por exemplo, em espécies de Poaceae (Langdon et al. 2000). Os *retrotransposons* podem ser divididos dentro de duas subclasses principais, considerando a presença ou não de longas repetições terminais: os LTRs (long terminal repeats) e non-LTR *retrotransposons*, respectivamente (Hansen e Heslop-Harrison 2004).

Os principais retroelementos com LTRs são os dos grupos Ty1-copia e Ty3-gypsy presentes em animais e plantas (Kumar e Bennetzen 1999). Hull (2001) propôs um sistema de classificação filogenética dos elementos que transcrevem de modo reverso, composto por duas ordens: Retrales e Retrovirales. Retrales inclui os elementos sem LTRs e que não foram estudados aqui. Retrovirales consiste dos elementos potencialmente capazes de infecção, como os retrovírus (genoma de RNA), os pararetrovírus (genoma de DNA) e os *retrotransposons* copia e gypsy. Os elementos do grupo Ty1-copia-like (família Pseudoviridae) e do grupo Ty3-gypsy-like (família Metaviridae) fazem parte dessa ordem.

Apresentam uma estrutura similar, com diferenças na ordem dos genes dentro do segmento pol, sendo AP (proteínase aspártica), IN (integrase), RT (transcriptase reversa) e RH (RNase H) para Ty1-*copia*-like e AP, RT, RH e IN para Ty3-*gypsy*-like (Todorovska 2007) (Figura 1).

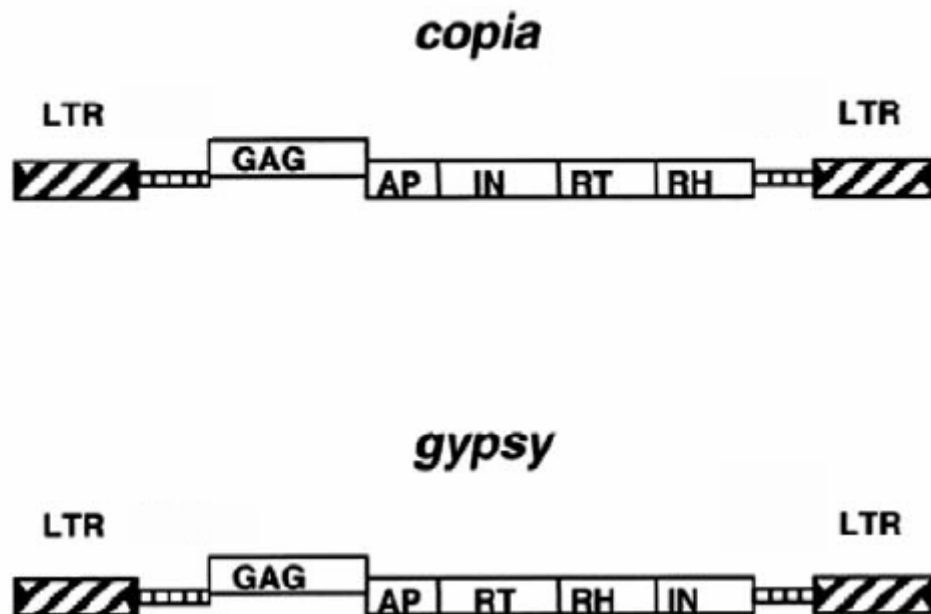


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura dos *retrotransposons* dos grupos *copia* e *gypsy*.

Fonte: Adaptado de Todorovska (2007).

Existe um número grande de classes de retroelementos, os quais variam entre as diferentes espécies. Esses elementos podem se acumular de modo independente em diferentes genomas, como por exemplo, em *Beta vulgaris* L., onde há predominância de elementos Ty1-*copia*-like e dos segmentos repetidos intercalados longos – LINE, este sendo um non-LTR retrotransposon (Schmidt et al. 1995). Estudos sobre a distribuição cromossômica desses elementos são muito importantes para o entendimento da estrutura e da organização funcional dos cromossomos e podem esclarecer a dinâmica e o papel desses elementos nos processos evolutivos (Belyayev et al. 2001). Diversas investigações mostraram a localização física *in situ* de retroelementos simples (Suoniemi et al. 1996) ou em grupos (Heslop-Harrison et al. 1997, Kubis et al. 1998). A localização física dos retroelementos na

FISH utilizando sondas amplificadas de domínios conservados da transcriptase reversa foi empregada em diversas espécies de plantas como *Brassica campestris* L., *Gossypium* L. e *Sellaginella apoda* L. (VanderWiel et al. 1993; Brandes et al. 1997).

Em muitas plantas, os centrômeros, as regiões terminais e heterocromáticas podem conter um número grande de *retrotransposons*, sendo possível que eles tenham adquirido algum papel estrutural ou funcional (Kumar e Bennetzen 1999). Retroelementos Ty1-copia observados em *Aegilops speltoides* Tausch (Triticeae), por exemplo, foram localizados em todas as regiões heterocromáticas terminais, o que poderia indicar alguma importância desse elemento na organização da heterocromatina. Além disso, esses autores encontraram diferenças na distribuição e na quantidade de Ty3-gypsy, Ty1-copia e LINE em *A. speltoides* e *Hordeum spontaneum* K. Koch, indicando uma possível atividade variável desses retroelementos durante a evolução desses genomas (Belyayev et al. 2001).

Outros exemplos da ocorrência e co-localização de retroelementos com regiões específicas dos cromossomos são: Ty3-gypsy associado aos centrômeros em cereais, como centeio, cevada e trigo (Presting et al. 1998), Ty1-copia disperso nos cromossomos em *Brassica campestris* (Brandes et al. 1997), Ty1-copia-like das subfamílias Tos17 de *Oryza sativa* L. e Tpv2 de *Phaseolus vulgaris* L. próximas ou dentro de genes (Hirochika et al. 1992; Garber et al. 1999), retroelemento Ppgy1 (*gypsy-like*) co-localizado com a RON em *Pinus pinaster* Aiton (Friesen et al. 2001). Portanto, a história evolutiva dos *retrotransposons* parece mostrar que estes evoluem de modo independente dentro dos genomas (Kumar e Bennetzen 1999).

Lopes et al. (2008) buscaram elementos transponíveis em bancos de dados de ESTs de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*, e encontraram Ty1-copia-e Ty3-gypsy-like (63,7%), transposons (21,4%), LINEs (0,78%), Helitrons e MITEs (14%) (Miniature Inverted-repeat Transposable). Contudo, os autores não relataram os locais de ocorrência nem sobre o comportamento disperso ou em blocos desses elementos. LINEs, transposons e MITEs foram detectados como segmentos distribuídos ao longo da sequência de BACs de *C. canephora* (Guyot et al. 2009). Existem poucos estudos sobre a caracterização de famílias de retroelementos em *Coffea*. Estudos com marcadores moleculares e GISH sugerem que as diferentes espécies do gênero, sobretudo aquelas envolvidos na formação de *C. arabica*, possuem uma elevada similaridade nos genomas (Lashermes et al. 1999). Isto poderia ser, em parte, uma consequência da presença de famílias repetitivas de DNA comuns a esses genomas. Assim sendo, nosso estudo procurou responder as seguintes perguntas: 1)

Quais os retroelementos nos genomas de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*? 2) Os genomas progenitores de *C. arabica* possuem elementos transponíveis para cada espécie? 3) A preferência por localização nos cromossomos varia para cada espécie? 4) Os retroelementos típicos de *C. arabica* ocorrem nas demais espécies em quantidade e localização? 5) Há associação entre posição dos retroelementos e o padrão de bandamento CMA/DAPI? 6) Há associação entre posição dos retroelementos e os sítios de DNAr 45S?

REFERÊNCIAS

- ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, v. 118, p. 53–65, 2001.
- ANTHONY, F.; COMBES, M. C.; ASTORGA, C.; BERTRAND, B.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p. 894–900, 2002.
- BELYAYEV, A.; RASKINA, O.; NEVO, E. Chromosomal distribution of reverse transcriptase-containing retroelements in two Triticeae species. **Chromosome Research**, v. 9: 129-136, 2001.
- BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE RJ, MACRAE R (eds) **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, p. 1-42, 1988.
- BRANDES, A.; HESLOP-HARRISON, J. S.; KAMM, A.; KUBIS, S.; DOUDRICK, R. L. SCHMIDT, T. Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of Ty1-copia-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 11-21, 1997.
- BRIDSON, D. Studies in *Coffea* and *Psilanthus* (*Rubiaceae* subfam. *Cinchonoideae*) for part 2 of 'Flora of Tropical East Africa': *Rubiaceae*. **Kew Bulletin**, v. 36, p. 817–859, 1982.
- BRIDSON, D. M. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (*Rubiaceae* tribe *Coffeae*). **Kew Bulletin**, v. 42, p. 453–460, 1987.
- BRIDSON, D. Additional notes on *Coffea* (*Rubiaceae*) from Tropical East Africa. **Kew Bulletin**, v. 49, p. 331–342, 1994.
- CAMPA, C.; BALLESTER, J. F.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S.; HAMON, S.; NOIROT. M. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. **Food Chemistry**, v. 88, p. 39-44, 2004.
- CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie *Arabica*. V. Origem e classificação botânica do *C. arabica* L. **Separata dos Boletins da Superintendência dos Serviços do Café**, v. 21, p. 174–180, 1946.

- CARVALHO, A.; FERWERDA, F. P.; FRAHM-LELIVELD, J. A.; MEDINA, P. M.; MENDES, A. J. T.; MONACO, L. C. 1969. Coffee. In: FERWERDA, F. P.; WIT, F. (eds.), **Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics**. Wageningen: Veenman & Zonen NV, p. 189-241, 1969.
- CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors. *Coffea arabica*. In: CLARK, R. J.; MACRAE, R (eds) **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, p. 129-165, 1988.
- CHARLESWORTH. B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.
- CLARINDO, W. R; CARVALHO, C. R. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. **Plant Systematics and Evolution** , v. 1, p. 1-5, 2008.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. **Plant Systematics and Evolution**, v. 28, p. 73-81, 2009.
- DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON D. M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152: 465-512, 2006.
- FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M. YAMADA, T. (eds). **Cultura do cafeeiro**. Piracicaba: Potafôs. p. 87-113, 1986.
- FAZUOLI, L. C.; MALUF, M. P., GUERREIRO FILHO, O.; MEDINA FILHO, H. P., SILVAROLLA, M. B. Melhoramento clássico do cafeeiro relacionado com a biotecnologia moderna. In: Seminário Internacional sobre biotecnologia na agroindústria cafeeira, 1999. Londrina. **Anais...** Londrina: Elsevier, 1999. p. 217-229.
- FAO, Food and Agriculture Organization. Disponível em: <http://apps.fao.org>. 05/02/2010.
- FRIESEN, N.; BRANDES, A.; HESLOP-HARRISON, J. S. Diversity, origin, and distribution of *retrotransposons* (gypsy and copia) in Conifers. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 1176–1188, 2001.
- GARBER, K.; BILIC, I.; PUSCH, O.; TOHME, J.; BACHMAIR, A. SCHWEIZER, D.; JANTSCH, V. The Tpv2 family of *retrotransposons* of *Phaseolus vulgaris*: structure,

integration characteristics, and use for genotype classification. **Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 797-807, 1999.

GUERREIRO FILHO, O. *Coffea racemosa* **Lour: une revue**. Café Cacao e Thé, Paris, v. 36, p. 171-186. 1992.

GUYOT, R.; MARE M.; VIADER, V.; HAMON, P.; CORITON, O.; BUSTAMANTE-PORRAS, J.; PONCET, V.; CAMPA, C.; HAMON, S.; KOCHKO, A. 2009. Microcollinearity in an ethylene receptor coding gene region of the *Coffea canephora* genome is extensively conserved with *Vitis vinifera* and other distant dicotyledonous sequenced genomes. **BioMed Central Plant Biology** v. 9, p. 1-15, 2009.

HAARER, A. E. **Modern coffee production**. London: Leonard Hill, 1956.

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**, v. 17, p. 291-394, 2009.

HANSEN, C.; HESLOP-HARRISON, J. S. Sequences and phylogenies of plant pararetroviruses, viruses and transposable elements. **Advances in Botanical Research**, v. 41: p. 165-193, 2004.

HASTEROK, R.; JENKINS, G.; LANGDON, T.; JONES, R. N.; MALUSZYNSKA, J. Ribosomal DNA is an effective marker of Brassica chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 486–490, 2001.

HESLOP-HARRISON, J. S.; BRANDES, A.; TAKEDA, S.; SCHMIDT, T.; VERSHININ, A.; ALKHIMOVA, E. G.; KAMM, A.; DOUDRICK, R. L.; SCHWARZACHER, T.; KATSIOTIS, S. K.; KUMAR, A.; PEARCE, S. R.; FLAVELL, A. J.; HARRISON, G. E. The chromosomal distribution of Ty1-copia group *retrotransposons* elements in higher plants and their implication for genome evolution. **Genetica**, v. 100, p. 197-204, 1997.

HIROCHIKA, H.; FUKUCHI, A.; KIKUCHI, F. *Retrotransposons* in rice. **Molecular and General Genetics**, v. 233, p. 209-216, 1992.

HULL, R. Classifying reverse transcribing elements: a proposal and a challenge to the ICTV. **Archives of Virology**, v. 146, p. 2255-2261, 2001.

- IAPAR, Instituto Agrônômico do Paraná. Disponível em <<http://www.iapar.br>>. 07/02/2010.
- ICO, International Coffee Organization. Disponível em <<http://www.ico.org>>. 05/02/2010.
- KAZAZIAN, Jr. H. Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science**, v. 303, p. 1626-1632, 2004.
- KRISHMAN, P.; SAPRA, V. T.; SIMAN, K. M.; ZIPF, A. FISH mapping of the 5S and 18S-28S rDNA loci in different species of Glycine. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 295-300, 2001.
- KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.; CARVALHO, A. **Taxonomia de *Coffea arabica* L. Descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, Boletim Técnico, 1938.
- KUBIS, S.; SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. **Annals of Botany**, v. 82 (Suplementar A), p. 45-55, 1998.
- KUMAR, A.; BENNETZEN, J. L. Plant *retrotransposons*. **Annual Review of Genetics**, v. 33, p. 479-532, 1999.
- LANGDON, T.; SEAGO, C.; MENDE, M.; LEGGETT, M.; THOMAS, H.; FORSTER, J. W.; THOMAS, H.; R. JONES, N.; JENKINS, G. Retrotransposon evolution in diverse plant genomes. **Genetics**, v. 156, p. 313-325, 2000.
- LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; TROUSLOT, P.; CHARRIER, A. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea L.*) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 947-955, 1997.
- 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. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 259-266, 1999.
- LAVANIA, U. C.; BASU, S.; SVRIVASTAVA, S.; MUKAI, Y.; LAVANIA, S. *In situ* chromosomal localization of rDNA sites in 'safed musli' *Chlorophytum Ker-Gawl* and their physical measurement by fiber FISH. **Journal of Heredity**, v. 96, p. 155-160, 2005.

- LEITCH, I. J.; HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of 4 sites of 5S rDNA sequences and one site of the alpha-amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). **Genome**, v. 36, p. 517–523, 1993.
- LOMBELLO, R. A.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea* *L.* chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. I. *C. humilis*, *C. kapakata*, *C. sp.* Moloundou and *C. stenophylla*. **Caryologia**, v. 57, p. 11-17, 2004a.
- LOMBELLO, R. A.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea* *L.* chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. II. *C. canephora* cv. Aboatã, *C. salvatrix*, *C. sessiliflora*. **Caryologia**, v. 57, p. 138-143, 2004b.
- 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**, v. 279, p. 385-401, 2008.
- MALAVOLTA, E. **História do café no Brasil: agronomia, agricultura e comercialização**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2000.
- MENDES, A. J. T. Morfologia dos cromossomos de *Coffea excelsa* Chev. **Boletim Técnico**, v. 56, p. 1-8, 1938.
- MISHIMA, M.; OHMIDO, N.; FUKAI, K.; YAHARA, T. Trends in site number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). **Chromosoma**, v. 110, p. 550–558, 2002.
- PRESTING, G. G.; MALYSHEVA, L.; FUCHS, J.; SCHUBERT, I. A TY3/GYPSY retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes. **The Plant Journal**, v. 16, p. 721-728, 1998.
- RAINA, S. N.; MUKAI, Y.; YAMAMOTO, M. *In situ* hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (*Rubiaceae*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 9, p. 1024-1029, 1998.
- RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; RAMPIM, L.; CARVALHO, V. P.; RUAS, E. A.; SERA, T. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (inter-simple sequence repeat) markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 319–327, 2003.

- SCHMIDT, T.; KUBIS, S.; HESLOP-HARRISON, J. S. Analysis and chromosomal localization of *retrotransposons* in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): LINEs and Ty1-*copia*-like elements as major components of the genome. **Chromosome Research**, v. 3, p. 335-345, 1995.
- SUONIEMI, A.; ANAMTHAWAT-JOHNSSON, K.; ARNA, T.; SCHULMAN, A. H. *Retrotransposons* BARE-1 is a major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome. **Plant Molecular Biology**, v. 30, p. 1321-29, 1996.
- TAKETA, S.; HARRISON, G. E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 1–9, 1999.
- TODOROVSKA, E. *Retrotransposons* and their role in plant – genome evolution. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**; v. 21, p. 294–305, 2007.
- VANDERWIEL, P. L.; VOYTAS, D. F.; WENDEL, J. F. Ty1-*copia*-like retrotransposable element evolution in diploid and polyploid cotton (*Gossypium* L.). **The Journal of Molecular Evolution**, v. 36, p. 429-447, 1993.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo utilizar ferramentas citogenéticas e moleculares para compreender a importância dos elementos repetitivos na organização cariotípica das espécies de *Coffea*. Para isso, foram geradas marcas úteis nos cromossomos a partir do isolamento das sequência repetitivas e localização física nas diferentes espécies.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Definir o padrão de bandas CMA/DAPI em sete espécies de *Coffea*.
- 2 Isolar, caracterizar e localizar por FISH diferentes famílias de DNA repetitivo (DNAr 45S e retroelementos) em sete espécies de *Coffea*.
- 3 Relacionar a distribuição (quantidade e localização) dessas sequência para verificar se há um provável comportamento geral para o gênero.

CAPÍTULO 1

DISTRIBUIÇÃO DE HETEROCROMATINA E RETROELEMENTOS EM CROMOSSOMOS DE *COFFEA L.*

Priscila Mary Yuyama, Luiz Filipe Protasio Pereira, Tumoru Sera, Laurival Vilas-Boas,
André Luís Laforga Vanzela

Artigo a ser enviado para a Revista Chromosome Research.

DISTRIBUIÇÃO DE HETEROCROMATINA E RETROELEMENTOS EM CROMOSSOMOS DE *COFFEA L.*

Priscila Mary Yuyama¹, Luiz Filipe Protasio Pereira², Tumoru Sera³, Laurival Vilas-Boas¹,
André Luís Laforga Vanzela^{1,4}

Título resumido: Distribuição de DNAs repetitivos em *Coffea*

Introdução

O gênero *Coffea* (*Rubiaceae*) apresenta mais de 100 espécies nativas da África e Madagascar (Berthaud e Charrier 1988; Davis et al. 2006). *Coffea arabica L.* e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner são as duas espécies de maior importância econômica do gênero, sendo o café uma das commodity mais valorizadas nos mercados internacionais (International Coffee Organization, <http://www.ico.org>). Muitos estudos são direcionados para o entendimento da organização genômica de *C. arabica*, enquanto as espécies selvagens são utilizadas para subsidiar os programas de melhoramento, como fonte de características relacionadas à resistência a diferentes doenças e adversidades ambientais (Herrera et al. 2002; Prakash et al. 2002).

Estudos citogenéticos e moleculares indicam que *C. arabica* é um anfidiplóide formado a partir da hibridização dos genomas de *C. canephora* e *C. eugenioides* Moore (Lashermes et al. 1999). Os cromossomos de *Coffea* são muito pequenos (1 a 3 μm) e similares (metacêntricos e submetacêntricos), o que dificulta as análises e a identificação dos pares cromossômicos. Os primeiros kariogramas de alta definição foram desenvolvidos para *C. arabica* e *C. canephora* (Clarindo e Carvalho 2008, 2009). Estes estudos reforçaram a idéia de que *C. canephora* poderia ser um dos progenitores de *C. arabica*, como previamente

¹ Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil, Fone/Fax: +55 43 3371-4509.

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA-Cafê, Parque Estação Biológica -PqEB, CEP 70770-901, Brasília, DF, Brasil.

³ Instituto Agronômico do Paraná, IAPAR, Caixa Postal 481, CEP 86047-902, Londrina, PR, Brasil.

⁴ Autor para correspondência: andrevanzela@uel.br

proposto por análises de sequência de ITS2 (Lashermes et al. 1997), RFLP e hibridação genômica *in situ* (GISH) (Lashermes et al. 1999) e ISSR (Ruas et al. 2003).

Estudos envolvendo bandamento CMA/DAPI em sete espécies de *Coffea* mostraram bandas ricas em GC (CMA⁺) nas regiões intersticiais e terminais dos cromossomos (Lombello e Pinto-Maglio 2004a; 2004b). Em um estudo mais recente, Hamon et al. (2009) encontraram bandas adicionais localizadas nas regiões terminais, subterminais, proximais e intersticiais das cinco espécies anteriores de *Coffea*, mas sem definição do par cromossômico. As bandas ricas em AT (DAPI⁺) foram encontradas nas regiões intersticiais na maioria das espécies e sem definição do par. Estes mesmos autores mostraram que o número de segmentos de DNAs ribossomais (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* Frohner mostraram dois sítios de 45S e quatro sítios de 5S. *Coffea arabica* apresentou seis sítios de 45S e quatro de 5S.

Os DNAs repetitivos ocupam uma grande porção dos genomas vegetais, podendo estar localizados em regiões definidas, como as repetições teloméricas, DNAr e os DNAs satélites ou dispersas nos cromossomos, como os elementos transponíveis (Kubis et al. 1998). Os *retrotransposons* mais comuns em plantas são o Ty1-*copia*-like (Pseudoviridae) e o Ty3-*gypsy*-like (Metaviridae) (Kumar e Bennetzen 1999), e representam a maior parte dos elementos transponíveis em bancos de dados de ESTs de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* (Lopes et al. 2008). Contudo, existem poucos estudos sobre a distribuição de retroelementos nos cromossomos de *Coffea*.

Análises moleculares e GISH têm mostrado que as espécies de *Coffea* apresentam grande similaridade genômica, o que em parte poderia ser devido à ocorrência de famílias de DNA repetitivo similares (Lashermes et al. 1999). O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar retroelementos comuns no genoma de *C. arabica var. typica* e utilizá-los como sondas nos genomas de *C. arabica var. typica*, *C. canephora*, *C. eugenioides*, *C. kapakata* (A. Cheval.) D. M. Bridson, *C. liberica var. dewevrei* Hiern, *C. racemosa* e *C. stenophylla* G. Don. Este estudo foi conduzido de modo a entender a distribuição de *retrotransposons* e a associação desses elementos com regiões específicas dos cromossomos, como a heterocromatina e os sítios de DNAr 45S.

Materiais e Métodos

Amostras e coloração convencional

Sete espécies de *Coffea* foram analisadas: *C. arabica* var. *typica*, *C. canephora*, *C. eugenoides*, *C. kapakata*, *C. liberica* var. *dewevrei*, *C. racemosa* e *C. stenophylla*. Plântulas e sementes de cada espécie foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina, Paraná, e cultivadas em tubetes e vasos 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. Para a coloração convencional as raízes foram digeridas em uma solução enzimática contendo celulase 2% (m/v) e pectinase 20% (v/v) a 37 °C, hidrolisadas em HCl 1M por 10 min a 60 °C, dissecadas em uma gota de ácido acético 60% e esmagadas. As lamínulas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido, a coloração das lâminas feita em Giemsa 2% e montadas com Entellan[®]. Cinco metafases de cada espécie foram medidas utilizando o programa MicroMeasure 3.3.

Bandamento cromossômico

Lâminas foram obtidas utilizando meristemas radiculares pré-tratados, fixados e digeridos como descrito acima. As raízes foram dissecadas em uma gota de ácido acético 60% e esmagadas. Depois que as lamínulas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido, as lâminas foram tratadas como proposto por Schwarzacher et al. (1980), com algumas modificações. As lâminas foram envelhecidas por três dias e tratadas com ácido acético 45%, hidróxido de bário 5% e 2× SSC. As lâminas foram coradas com CMA₃ (0,5 µg/µL) por 1,5 h e DAPI (2 µg/µL) por 30 min, e montadas com um meio composto de

glicerol:tampão McIlvaine, pH 7.0 (1:1, v:v) e 2,5 mM MgCl₂. Os materiais foram observados em um microscópio de epifluorescência Leica DM 4500 B.

Extração de DNA

Folhas jovens de *C. arabica var. typica* foram coletadas e usadas para a extração de DNA, de acordo Diniz et al. (2005), com modificações. As amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido, tratadas com tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8, PVP 1% e beta-mercaptoetanol 0,2%) a 65 °C por 30 min. Em seguida, a solução foi centrifugada, purificada com clorofórmio e o DNA foi precipitado em 0,6 volumes de isopropanol. As amostras foram tratadas com RNase (10mg/mL) e proteinase-K a 0,01%, purificadas com fenol:clorofórmio (1:1; v:v), precipitadas em acetato de sódio 3M (1:10, v:v) e 2 volumes de etanol 100%. Posteriormente, foram feitas lavagens em etanol 70% e eluição em TE. A concentração do DNA foi estimada por comparação com diluição seriada de padrão de DNA de fago lambda (0,5 µg/µL - Invitrogen Life Technologies, USA) em gel de agarose a 0,8%.

Isolamento, clonagem e sequenciamento de fragmentos de DNA repetitivo

O DNA genômico de *C. arabica var. typica* foi usado como molde para a reação de DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primer-PCR) utilizando o primer degenerado 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', de acordo com Larsen et al. (2001). Os resultados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, a 3V/cm.

Fragmentos obtidos foram isolados e purificados com o Kit Concert Rapid Gel Extraction System (Gibco) e utilizados em uma nova reação de DOP-PCR. Os produtos foram inseridos no vetor pCR 2.1[®] e transformados em células competentes TOP10 utilizando o Kit T.A. Cloning (Invitrogen). Para verificação da presença de insertos-alvo, as colônias foram isoladas e, após a extração plasmidial, estas foram submetidas a reações de PCR usando primers M13. As amostras foram enviadas para o sequenciamento no Laboratório de Biotecnologia do IAPAR, utilizando o Kit DYEnamic[™] ET Dye Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech) em MegaBACE 1000 DNA Analysis System. A

qualidade da sequência e a construção dos contigs foram desenvolvidas com o software CLC DNA Workbench 5.6. As sequências consenso foram comparadas com outras do GenBank utilizando o programa blastx: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

A hibridação *in situ* foi feita como descrito por Vanzela et al. (2002). Lâminas foram preparadas como descrito para o bandamento cromossômico, tratadas com RNase (100 µg/mL) e desidratadas em uma série alcoólica (70 e 100%). Os clones de DNAr 45S (pTa71) e os fragmentos gerados pela DOP-PCR foram marcados com biotina-14-dATP ou digoxigenina-11-dUTP por nick translation. Sobre cada lâmina foi aplicada uma mistura de hibridação (30 µL) contendo 4 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 hibridização 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 simultaneamente detectadas com avidina/FITC e/ou anti-dig-rodamina 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.

Imagens

As imagens de gel foram capturadas em um transiluminador ultravioleta equipado com o sistema de documentação AlphaDigiDoc-RT. As análises citogenéticas foram feitas em pelo menos cinco metáfases de cada espécie e as imagens dos cromossomos 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 ou rodamina. As imagens foram otimizadas para o melhor contraste e brilho, utilizando o software IGraphx Image.

Resultados

Análise convencional e bandamento cromossômico

Coffea arabica apresentou $2n = 44$ (Figuras 1B-C) e as demais espécies $2n = 22$ (Figuras 1D-I). Os cariótipos foram formados por cromossomos predominantemente do tipo meta e submetacêntrico, com variações de tamanho de 1 a 3 μm . Os núcleos interfásicos foram do tipo arreticulado a semirreticulado em todas as espécies, mas ricos em cromocentros em *C. arabica* (Figura 1A), *C. canephora*, *C. liberica* var. *dewevrei* e *C. stenophylla*, e a condensação profásica do tipo proximal em todas as espécies (Figura 1B).

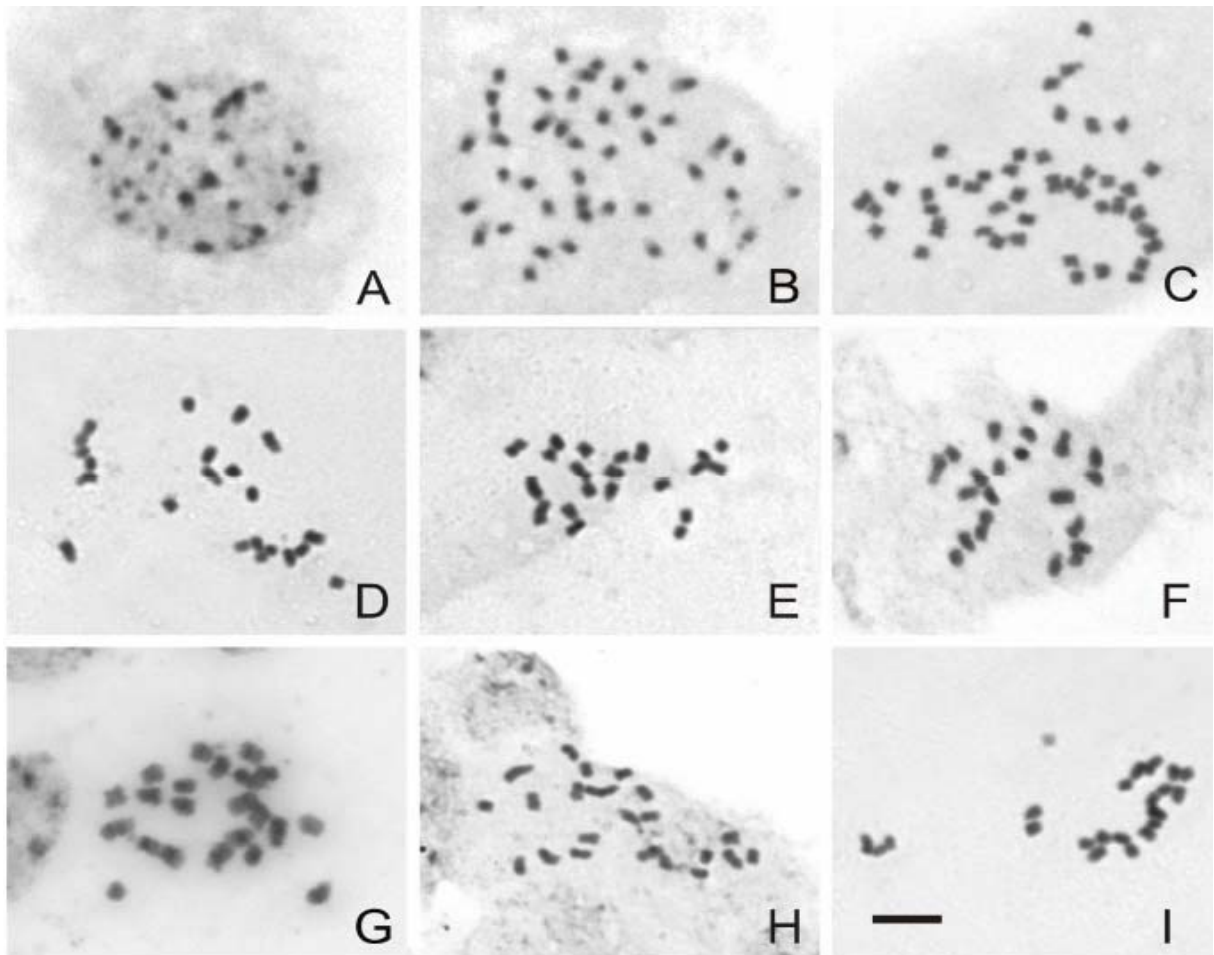


Figura 1 – Coloração convencional em espécies de *Coffea*. A) Núcleo interfásico rico em cromocentros de *C. arabica* variedade *typica*. B) Padrão proximal de condensação em prometáfase de *C. arabica* var. *typica*. C) Metáfase mitótica de *C. arabica* com $2n = 44$. D-I) Metáfases mitóticas de *C. canephora*, *C. liberica* var. *dewevrei*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. racemosa* e *C. stenophylla*, respectivamente, com $2n = 22$. Note o tamanho pequeno e a morfologia similar dos cromossomos. Barra = 5 μm .

O bandamento cromossômico revelou blocos CMA⁺/DAPI⁻, CMA⁻/DAPI⁺ e CMA⁺/DAPI⁺ com diferenças na abundância, tamanho dos blocos e localização da heterocromatina nos diferentes cromossomos e espécies (Figura 2 e Tabela 1). Em geral, blocos ricos em GC foram localizados nas regiões terminais e bandas menores nas regiões intersticiais, sendo estas localizadas próximas ao centrômero, com variações de número entre as espécies: i) grandes blocos terminais em cerca de três pares e menores bandas intersticiais na maioria dos pares em *C. arabica* (Figura 2A), ii) grandes blocos terminais em um par, menores bandas terminais em um par e intersticiais na maioria dos pares em *C. canephora* (Figura 2C), iii) grandes blocos terminais em um par e menores bandas terminais em dois pares em *C. liberica var. dewevrei* (Figura 2E), iv) grande bandas terminais em dois pares e menores bandas intersticiais em um par em *C. eugenioides* (Figura 2G), v) grandes bandas terminais em um par, menores bandas terminais em um par e intersticiais em um par em *C. kapakata* (Figura 2I), vi) grandes bandas terminais em dois pares em *C. racemosa* (Figura 2K), vi) grandes bandas terminais em dois pares em *C. stenophylla* (Figura 2 M) (Tabela 1).

As bandas DAPI⁺ foram observadas nas regiões intersticiais próximos ao centrômero mas com variações no número entre as espécies: i) na maioria dos pares de *C. arabica* (Figura 2B), ii) um par em *C. canephora* (Figura 2D), iii) um par em *C. eugenioides* (Figura 2H), iv) dois pares em *C. kapakata* (Figura 2J) e um par em *C. stenophylla* (Figura 2N). *Coffea liberica var. dewevrei* e *C. racemosa* não apresentaram bandas ricas em AT (Figura 2F e 2L) (Tabela 1). As bandas C-CMA⁺/DAPI⁺ foram observadas somente em *C. arabica* e *C. canephora* (Figura 2A-D).

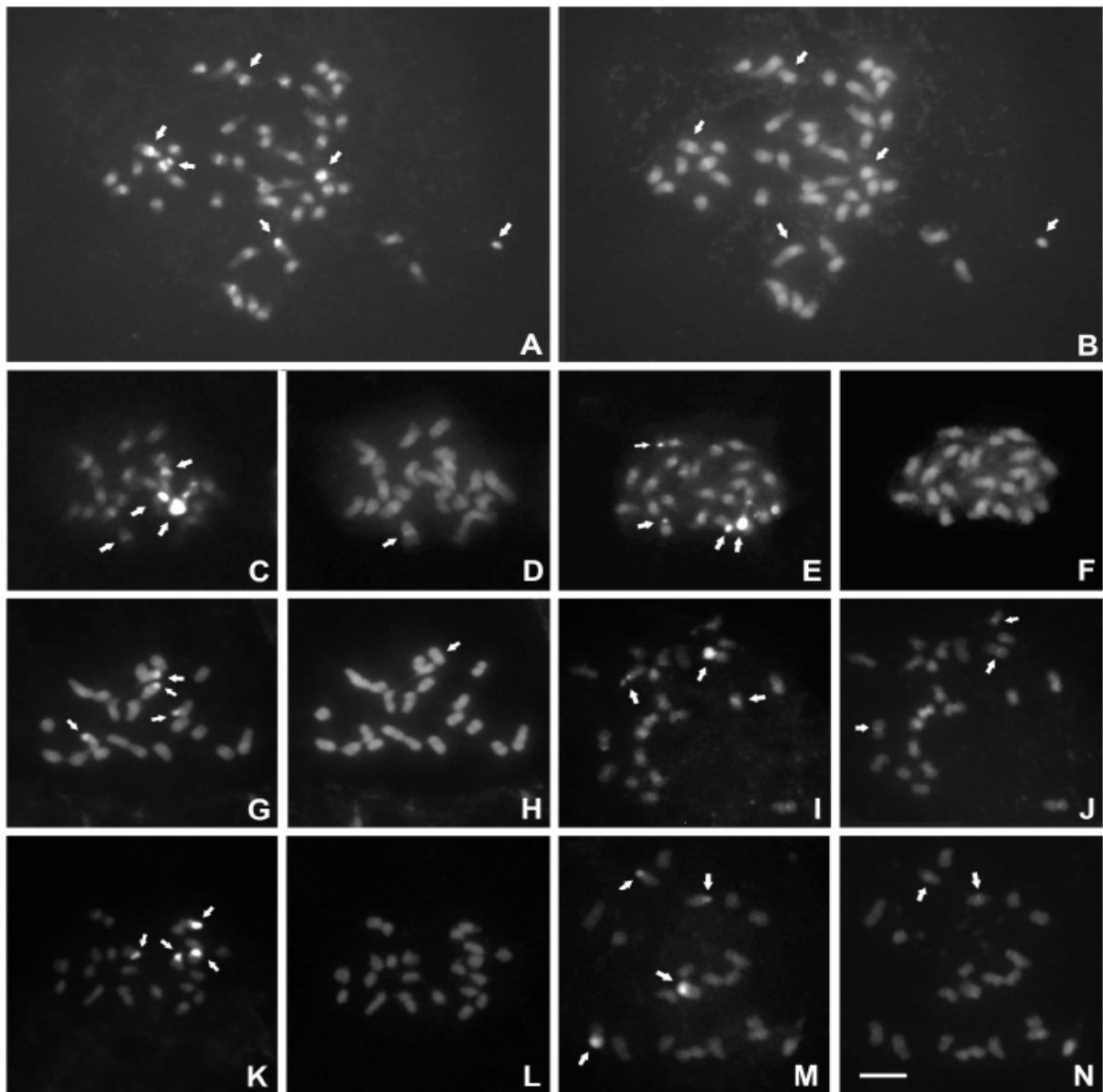


Figura 2 – Bandamento C-CMA/DAPI em espécies de *Coffea*. A) Bandamento C-CMA em *C. arabica* var. *typica*. As setas indicam bandas terminais e intersticiais. B) Bandamento C-DAPI em *C. arabica*. As setas indicam bandas intersticiais. Note a presença de bandas C-CMA /DAPI intersticiais (setas). C) Bandamento C-CMA em *C. canephora*. As setas indicam bandas terminais e intersticiais. D) Bandamento C-DAPI em *C. canephora*. Note a presença da banda C-CMA /DAPI intersticial (seta). E) Bandamento C-CMA em *C. liberica* var. *dewevrei*. As setas indicam somente bandas terminais. F) Bandamento C-DAPI em *C. liberica* var. *dewevrei*. Note a ausência de bandas DAPI. G) Bandamento C-CMA em *C. eugenioides*. As setas indicam bandas terminais. H) Bandamento C-DAPI em *C. eugenioides*. A seta indica a banda intersticial. I) Bandamento C-CMA em *C. kapakata*. As setas indicam bandas terminais e intersticiais. J) Bandamento C-DAPI em *C. kapakata*. As setas indicam bandas intersticiais. K) Bandamento C-CMA em *C. racemosa*. As setas indicam bandas terminais. L) Bandamento C-DAPI em *C. racemosa*. Note a ausência de bandas DAPI. M) Bandamento C-CMA em *C. stenophylla*. As setas indicam bandas terminais. N) Bandamento C-DAPI em *C. stenophylla*. As setas indicam bandas intersticiais. Barra = 5 μ m.

Tabela 1 – Número e localização das bandas CMA/DAPI e sítios de DNAr 45S em sete espécies de *Coffea*.

Espécies	CMA ⁺ /DAPI ⁺	CMA ⁺ /DAPI ⁺	DNAr 45S
<i>C. arabica</i>	6 (T) e na maioria dos cromossomos (I)	Maioria dos cromossomos (I)	6 (T)
<i>C. canephora</i>	4 (T) e na maioria dos cromossomos (I)	2 (I)	2 (T)
<i>C. eugenoides</i>	4 (T) e 2 (I)	2 (I)	4 (T)
<i>C. kapakata</i>	4 (T) e 2 (I)	4 (I)	4 (T)
<i>C. liberica</i> var. <i>dewevrei</i>	6 (T)	-	2 (T)
<i>C. racemosa</i>	4 (T)	-	4 (T)
<i>C. stenophylla</i>	4 (T)	2 (I)	4 (T)

P = proximal, I = intersticial e T = terminal.

Isolamento, caracterização e localização de retroelementos

A reação da DOP-PCR gerou fragmentos de diferentes tamanhos, os quais foram utilizados como molde em uma nova reação de DOP-PCR (Figuras 3A-B). Os fragmentos reamplificados foram marcados com biotina-14-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP por nick translation e testados por hibridação *in situ*. Os fragmentos de 300 pb e 800 pb, que deram sinais positivos após a FISH, foram inseridos em vetor pCR 2.1[®] e os clones submetidos à reação de PCR com primers M13 para a confirmação da presença dos insertos-alvo (Figura 3C).

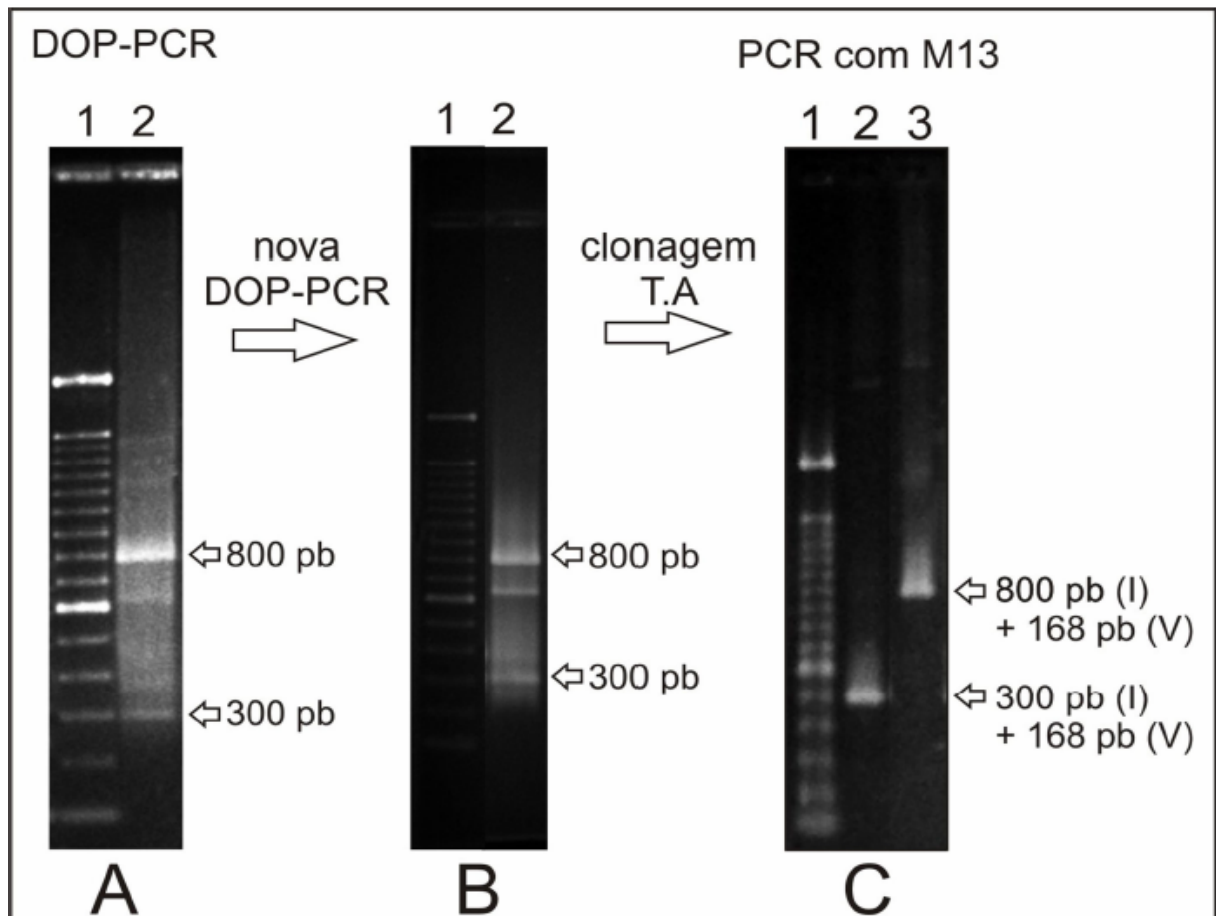


Figura 3 – Géis mostrando os produtos de PCR para o isolamento de retroelementos. A) Reação de DOP-PCR a partir do genoma de *C. arabica* variedade *typica*, sendo a canaleta 1 o marcador de peso de 100 pb e a canaleta 2 o resultado da PCR com a geração de dois fragmentos com cerca de 300 pb e 800 pb. B) Reação de DOP-PCR utilizando os fragmentos de 300 pb e 800 pb como molde. A canaleta 1 contém o marcador de peso de 100 pb e a canaleta 2 o resultado da PCR com a geração de dois fragmentos com 300 pb e 800 pb. C) Reação de PCR com os primers M13, utilizando como molde os vetores pCR 2.1 contendo os fragmentos de 300 pb e 800 pb. A canaleta 1 contém o marcador de peso de 100 pb, a canaleta 2 contém o fragmento de 300 pb somados a dois trechos do vetor (95+73 pb flaqueadores) e a canaleta 3 contém o fragmento de 800 pb somados aos mesmos dois trechos do vetor.

Após o sequenciamento e análise no banco de dados do NCBI, o clone pCa21 com cerca de 300 pb foi selecionado por apresentar uma sequência similar ao fragmento de 311pb da transcriptase reversa, porém, de grupo indeterminado de retroelementos (Figura 4A-B). Este fragmento mostrou identidade com *Zingiber officinale*, *Cicer arietinum* e *Platanus x acerifolia* (Figura 4C). O clone pCa06, com cerca de 800 pb, foi selecionado por apresentar um fragmento de 775 pb similar aos retroelementos do grupo Ty3-gypsy-like (Figuras 4D-E) de *Oryza sativa* cultivar Japonica, segmento gag de *Cicer arietinum* e segmento dell-46 de *Lilium henryi* (Figura 4F).

A. Sequência do clone pCa21

1...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...70
 CTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCT
 GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGG
 GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCT
 GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCC
 GCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG
|...|...|...|...|...|...|311

B. Sequência da proteína

LAAVT.SGSEL.GTKLG.VIMVI.AVSCV.KLLSA.HNSTQ.HTSRK.HKV*S.LGCLM.SELTH.INCVA
 .LTARF.PVGKP.VVPAA.LMNRP.TRGER.RFAYW.ALFRF.LAH*L.AAL

C. Similaridades

Acessos	Espécies - Familias	Score	E-value	Ident.
ABK60177.1	<i>Zingiber officinale</i> - Zingiberaceae	85,1	1e-16	100%
CAD59768.1	<i>Cicer arietinum</i> - Leguminosae	74,7	3e-12	100%
CAD59767.1	<i>Cicer arietinum</i> - Leguminosae	68,9	2e-10	94%
CAL37000.1	<i>Platanus x acerifolia</i> - Platanaceae	63,9	6e-09	100%

D. Sequência do clone pCa06

1...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...70
 CCGACTCGAGTGTGTTTAGTGGCCACCAATTCAGAAGCAAACCTTGGATAGTTCGTAAATTTTGTTCATA
 TTCGGCCACACTTAGCGTTCCTGGCGTAGTCCAATAAACTCTTCCTCTCCTCTCTTGAAGTAAAGGA
 GGGAGGTATTTCTCGTTAAATTTCTTATGAAATTCGTCCATGTCCATACGGTCTGTTCTCTTTCCATT
 TTGCTTTAATAACGTTCCACCAGCTCGGGCCGATCCTTCAAATTTGGAACACCGCAAAGTTTACTTGTCT
 TTGCTCGGTGTAGTTCAGACGGTGAAAATATTAATCATGGCCTCTAACCATTGTTTCGGCTATATCCGGA
 TCAGATCCTCCAAGGAATTTGGGAGGAGTAAACTTCTGAAACCTCTCAAGAGCCTTATCTTCTCCGATT
 CAGGGTTCCGGGGTIGATTACGGCCATTTGGCCTTGTTGATCCACCAGTCTTGCCAAGATATCTGTGAT
 TTGTTGCATTACCGTTGCCATTTGGTCTTCGGCTTCAATCCTCGTTCCTTGTCTTTCGCGAGATGTTGTT
 TCTCTTTCTCTCTTGGCTCTTGAGCTCGTTTCAATCCACGGCCACGTCCACGTCCACGGCTACGTCTCC
 CGTCCATATATATGTTTTCCCTCTCTTTTCTTTTCCCCCAAAGGTAATTTAGTAAATAAACACGATAA
 GGTGACTAAAGTAACTAAAATTGAGGGCACCAATACTCAAATAAACATATACCCACATATCACACTCGA
 GTCGG
775

E. Sequência da proteína

PTRVC.LVATN.SEANL.DSS*I.LFHIR.PHLAF.PGVVQ.*TLPL.SSLEL.KEGGI.SR*IS.L*NSS
 .MSIRS.VLFPI.LL*R.STILG.PILQI.GTPQS.LLVFA.RCSSR.R*KY*.SWPLT.IVRLY.PDQI
 L.QGISE.E*TSE.TSQEP.YLLRF.QGSGV.DSRPF.GLVDP.PVLPR.YLSFV.ALPLP.FGLRL.QSS
 FL.ALAQM.LFLFP.LLAE.LVHSH.GHVHV.HGYVS.RPYIC.FPSLF.FSPQK.VI*I.NTIR*.LK
 *LK.LRAPN.TQINI.YPHIT.LES

F. Similaridades

Acessos	Espécies - Famílias	Score	E-value	Ident.
AAL79340.1				
AAM48279.1	<i>Oryza sativa</i> - Poaceae	92,4	4e-17	35%
AAP53268.1				
ABF97872.1	<i>Oryza sativa</i> - Poaceae	92,0	6e-17	30%
1510387A	<i>Lilium henryi</i> - Liliaceae	91,3	1e-16	32%
CAC44110.1	<i>Cicer arietinum</i> - Leguminosae	88,2	8e-16	30%
ABA92240.1	<i>Oryza sativa</i> - Poaceae	86,7	2e-15	34%

Figura 4 – Descrição das sequências dos clones pCa21 e pCa06 e sua comparação com outras sequência. A) Sequência nucleotídica do clone pCa21 de *C. arabica* var. *typica* com 311 pb. B) Sequência de proteína obtida a partir da sequência nucleotídica de 311 pb. C) Espécies com sequências similares ao clone pCa21. D) Sequência nucleotídica do clone pCa06 de *Coffea arabica* variedade *typica* com 775 pb. E) Sequência de proteína obtida a partir da sequência nucleotídica de 775 pb. F) Espécies com sequências similares ao clone pCa06.

Hibridação *in situ*

A FISH com a sonda de DNAr 45S mostrou dois sítios de hibridação em *C. canephora* e *C. liberica* var. *dewevrei* (Figuras 6A e 7A), quatro sítios em *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. racemosa* e *C. stenophylla* (Figuras 6D, 7D, 7G e 7J) e seis sítios em *C. arabica*, todos terminais (Figura 5C). Além disso, os sítios de 45S foram coincidentes com as bandas CMA⁺.

As hibridações *in situ* com as sondas pCa21 (300 pb) e pCa06 (800 pb) mostraram sinais em blocos e dispersos na maioria dos cromossomos de *C. arabica* var. *typica*, *C. canephora*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. racemosa* e *C. stenophylla*. *Coffea liberica* var. *dewevrei* mostrou sinais fortes de hibridação com as duas sondas em quatro cromossomos. Variações foram detectadas no número e localização dos sítios dentro e entre as espécies (Figuras 5, 6 e 7). Em *C. arabica*, a FISH com pCa21 mostrou um número maior de sinais em blocos proximais do que dispersos, em cerca da metade dos cromossomos, enquanto que a sonda pCa06 evidenciou mais sinais dispersos (Figuras 5B e E). Em *C. canephora*, pCa21 e pCa06 localizaram blocos proximais e sinais dispersos nos mesmos cromossomos e regiões, em cerca de metade dos cromossomos, mas a sonda pCa06 apresentou maior número de sítios em alguns cromossomos em relação à pCa21 (Figuras 6B-C). *Coffea eugenioides* exibiu sinais dispersos em todos os cromossomos com a sonda pCa21, com alguns blocos na região proximal e terminal. Alguns cromossomos não apresentaram sinais com pCa21 e muitos sinais com as duas sondas foram co-localizados (Figuras 6E-F).

Em *C. liberica* var. *dewevrei*, essas duas sondas mostraram sinais co-localizados em dois pares cromossômicos, com bloco proximal em um par e sinais dispersos em outro (Figuras 7B-C). Em *C. kapakata* foram observados poucos blocos, com sinais em blocos e dispersos de pCa21 em cerca de metade dos cromossomos e pCa06 na maioria dos cromossomos, sendo alguns co-localizados (Figuras 7E-F). Em *C. racemosa* as mesmas sondas mostraram blocos e sinais dispersos na maioria dos cromossomos principalmente nas regiões proximais (Figuras H-I). *Coffea stenophylla* exibiu sítios de hibridação em metade dos cromossomos, com regiões exclusivas de hibridação com a sonda pCa21 e pCa06 (Figuras 7K-L).

A FISH mostrou que não houve co-localização das sondas de pCa21 e pCa06 com a sonda DNAr 45S. É interessante que *C. arabica* e *C. canephora* apresentaram bandas CMA⁺ e DAPI⁺ intersticiais próximos ao centrômero na maioria dos cromossomos, e a sonda pCa21 mostraram blocos proximais em cerca de metade dos cromossomos e a sonda pCa06 revelou blocos em alguns cromossomos. As outras espécies exibiram bandas heterocromáticas terminais e bandas intersticiais em poucos cromossomos, e a FISH com pCa21 e pCa06 mostrou preferencialmente sinais dispersos, sugerindo uma co-localização entre retroelementos e regiões heterocromáticas proximais, o qual detectado também em intérfase de *C. arabica*.

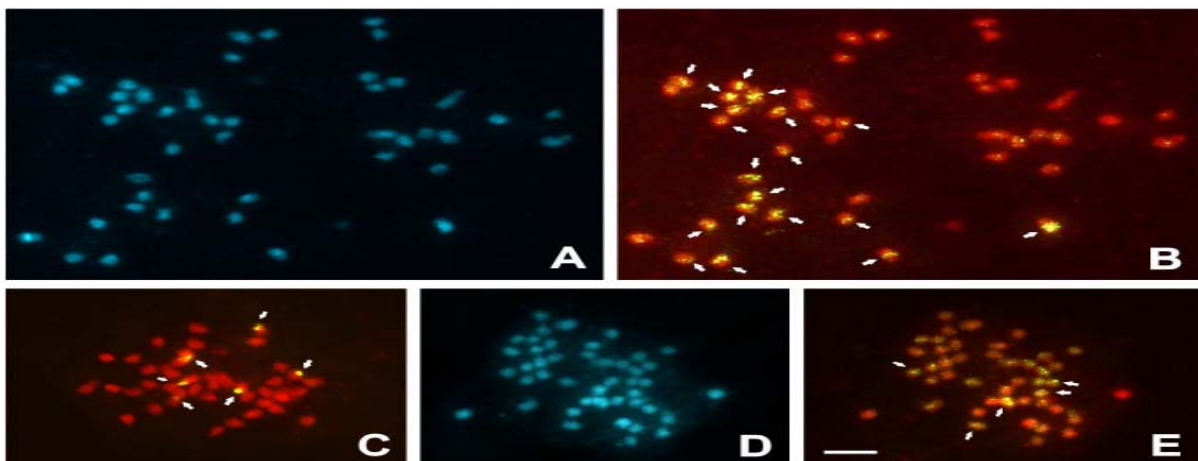


Figura 5 – Distribuição dos clones pCa21 e pCa06 nos cromossomos de *C. arabica* variedade *typica*. A) Cromossomos corados com DAPI. Note as bandas próximas ao centrômero na maioria dos cromossomos. B-C) FISH com a sonda pCa21 contendo um segmento conservado da transcriptase reversa em *C. arabica*. B) Note que a sonda pCa21 localizou segmentos organizados em blocos em vinte cromossomos (setas), com sinais dispersos e tênues nos demais cromossomos. C) FISH com DNAr 45S mostrando seis sítios terminais. D) Cromossomos corados com DAPI. E) FISH com a sonda pCa06 contendo um segmento Ty3-gypsy-like em *C. arabica* var. *typica*. Note que a sonda pCa06 mostrou sinais dispersos na maioria dos cromossomos, com alguns blocos (ver setas). Barra = 5 μ m.

Discussão

Análise convencional e bandamento

Os resultados de número, tamanho e morfologia cromossômica obtidos aqui para as sete espécies de *Coffea* concordam com os estudos prévios de vários autores (Krug 1934; Pierozzi et al. 1999; Pinto-Maglio 2006), os quais apontaram a grande dificuldade em reconhecer os pares cromossômicos. O bandamento cromossômico mostrou blocos ricos em GC terminais e intersticiais, como descrito previamente na literatura (Lombello e Pinto-Maglio 2004a, 2004b, Hamon et al. 2009), mas foram encontradas diferenças quanto ao número de bandas. Em nosso estudo, *C. arabica* e *C. canephora* apresentaram bandas intersticiais próximos ao centrômero em quase todos os cromossomos e não apenas em duas bandas intersticiais, como descrito por Hamon et al. (2009). *Coffea eugenioides* revelou duas bandas CMA⁺ intersticiais, além das quatro terminais descritas (Hamon et al. 2009), enquanto *C. kapakata* revelou duas bandas terminais, além das duas terminais e duas intersticiais descritas (Lombello e Pinto-Maglio 2004a). *Coffea stenophylla* mostrou quatro bandas terminais, diferente do que havia sido reportado por Lombello e Pinto Maglio (2004a) (duas bandas terminais e duas intersticiais) e Hamon et al. (2009) (duas bandas terminais, quatro proximais e duas intersticiais). Além disso, não foram observadas bandas intersticiais em *C. liberica var. dewevrei* como descrito por Hamon et al. (2009). É possível que tais variações sejam decorrentes das diferentes amostras estocadas em diferentes coleções, ou ainda devido a diferenças nos procedimentos técnicos adotadas em cada laboratório.

Bandas C-DAPI⁺ não foram observadas em *C. liberica var. dewevrei* e *C. racemosa*. Nas demais espécies, essas bandas foram localizadas nas regiões intersticiais. *Coffea arabica* apresentou bandas na maioria dos cromossomos e não apenas em quatro cromossomos, como reportado por Hamon et al. (2009). *Coffea kapakata* apresentou quatro bandas ricas em AT e *C. stenophylla* duas bandas, as quais não foram mencionadas por Lombello e Pinto Maglio (2004a) e Hamon et al. (2009).

Coffea canephora provavelmente contribuiu com as bandas ricas em GC encontradas em *C. arabica*. Porém, tanto *C. canephora* quanto *C. eugenioides* apresentaram poucas bandas DAPI⁺, enquanto que *C. arabica* revelou bandas ricas em AT intersticiais próximos ao centrômero na maioria dos cromossomos. Há várias evidências indicando que *C.*

arabica foi originada por hibridação entre *C. canephora* e *C. eugenioides* a cerca de um milhão de anos (Lashermes et al. 1999). Neste sentido, o número maior de bandas ricas em AT encontrados em *C. arabica* pode ser devido a mecanismos de amplificação e dispersão equilocal (Schweizer e Loidl 1987) que aconteceram após a formação do híbrido. De um modo geral, *Coffea* poderia ser formado por pelo menos três famílias de DNA repetitivo: i) bandas CMA⁺ terminais, intersticiais e proximais, ii) bandas CMA⁺ terminais associadas à RON e iii) bandas DAPI⁺ somente nas regiões intersticiais. Cariótipos compostos por mais de uma família heterocromática foram descritos em vários grupos de plantas, como em *Cestrum* L. (Fregonezi et al. 2006, Fernandes et al. 2009). Dessa forma, as diferenças nos padrões de bandas entre as espécies podem ter acontecido devido ao acúmulo ou deleção de segmentos ao longo da história evolutiva de cada espécie, mas sem grandes alterações na estrutura cariotípica entre as espécies, que preservaram a morfologia semelhante e o tamanho pequeno dos cromossomos, como *Serjania subdentata* Juss. (Hemmer e Morawetz 1990) e *Fortunella crassifolia* Swingle (Guerra et al. 2000).

Localização de DNAr 45S e retroelementos

O número de sítios de DNAr 45S, terminais e associados aos blocos ricos em GC foram confirmados para as setes espécies de *Coffea*, concordando com os estudos prévios de Lombello e Pinto Maglio (2004a, 2004b) e Hamon et al. (2009). Apesar da localização terminal ter sido constante, seguindo um padrão comum em plantas, como em *Aloe* L. (Adams et al. 2000) e *Maxillaria* L. (Cabral et al. 2006), diferenças foram encontradas no tamanho dos blocos entre homólogos, heterólogos e espécies. As diferenças mais marcantes foram detectadas em *C. eugenioides*, *C. kapakata* e *C. stenophylla*, que podem ter sido geradas por crossing-over desigual e amplificação/dispersão nas pontas dos cromossomos, como sugerido para *Glycine max* L. e para as próprias espécies de *Coffea* (Krishman et al. 2001; Hamon et al. 2009).

A presença de núcleos ricos em cromocentros e vários blocos de heterocromatina em *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* var. *dewevrei* e *C. stenophylla* em comparação com as demais espécies, sugerem que famílias de DNA repetitivo se acumularam de modo independente ao longo da diferenciação cariotípica em diferentes espécies de *Coffea*. Esse mesmo comportamento independente dos DNAs repetitivos foi observado após a FISH

com as sondas de retroelementos, já que essas mesmas espécies exibiram variações no número de sinais dispersos e em blocos com as sondas pCa21 e pCa06. A independência de transposição e na taxa de homogenização dos retroelementos foi observada em *C. racemosa*, a qual exibiu apenas quatro blocos ricos em GC, co-localizados com os sítios de DNAr 45S, porém, inúmeros sinais de hibridação com as sondas pCa21 e pCa06, em blocos e dispersos. Do mesmo modo, o elemento Ty1-*copia*-like foi encontrado nas regiões heterocromáticas paracentroméricas em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., sendo que algumas regiões foram observadas somente sinais de Ty1-*copia*-like, enquanto que as bandas DAPI⁺ em *Beta vulgaris* L. e *Vicia faba* L. mostraram pouca associação com esses elementos (Brandes et al. 1997).

Os sítios de DNAr 45S não mostraram associação com os sinais das sondas pCa21 e pCa06 nos cromossomos das espécies de *Coffea* analisadas, do mesmo modo que os sítios de DNAr 45S não apresentaram associação com sinais de Ty1-*copia*-like em *Beta vulgaris*, (Schmidt et al. 1995). Elementos do grupo Ty3-*gypsy*-like, semelhantes a pCa06, foram localizados em diferentes regiões cromossômicas, como nas regiões proximais de *Zea mays* L. (Purugganan e Wessler 1994), co-localizados com a RON e dispersos nos cromossomos em *Sorghum* L. (Sang e Liang 2000) e *Cestrum strigilatum* Ruiz & Pav. (Fregonezi et al. 2006). Essa distribuição não preferencial dos retroelementos parece não respeitar a relação taxonômica entre as espécies, mas sim fatores como a existência de sítios de inserção-alvo em determinadas regiões, taxa de homogenização e amplificação e a frequência de recombinação. De qualquer modo, os retroelementos cada vez mais vem se mostrando importantes na evolução dos genomas e cariótipos (Heslop-Harrison et al. 1997).

Neste trabalho, os dois fragmentos obtidos não puderam ser identificados como pertencentes ao mesmo subgrupo de retroelementos, já que o clone pCa21 foi muito similar a um pedaço da transcriptase reversa, porém de elemento não identificado, enquanto que o clone pCa06 teve elevada identidade com fragmentos dell e gag, relacionados ao subgrupo Ty3-*gypsy*. No entanto, diversos cromossomos das sete espécies apresentaram sinais diferentes após a dupla hibridação, como por exemplo em *C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugenioides* e *C. stenophylla* (veja as setas nas Figuras 5, 6 e 7). Há casos similares na literatura para espécies de outros grupos, como por exemplo, em *Helianthus* L., onde sondas de Ty3-*gypsy*-like foram localizadas preferencialmente nas regiões proximais, enquanto Ty1-*copia*-like mostrou sinais menos frequentes nessas regiões e sinais mais fortes nas regiões

terminais. Além disso, na tribo Triticeae, Belyayev et al. (2001) encontraram conteúdo alto de retroelementos com diferenças na distribuição e na quantidade do Ty1-*copia*-like/LINE em *Aegilopes speltoides* Tausch e *Hordeum spontaneum* K. Koch, que podem ter contribuído na divergência interespecífica. As diferenças encontradas na distribuição dos retroelementos podem ser em função da atividade variável durante a evolução dos genomas das espécies e podem ter adquirido papéis diferentes nos genomas hospedeiros (Belyayev et al. 2001; Santini et al. 2002).

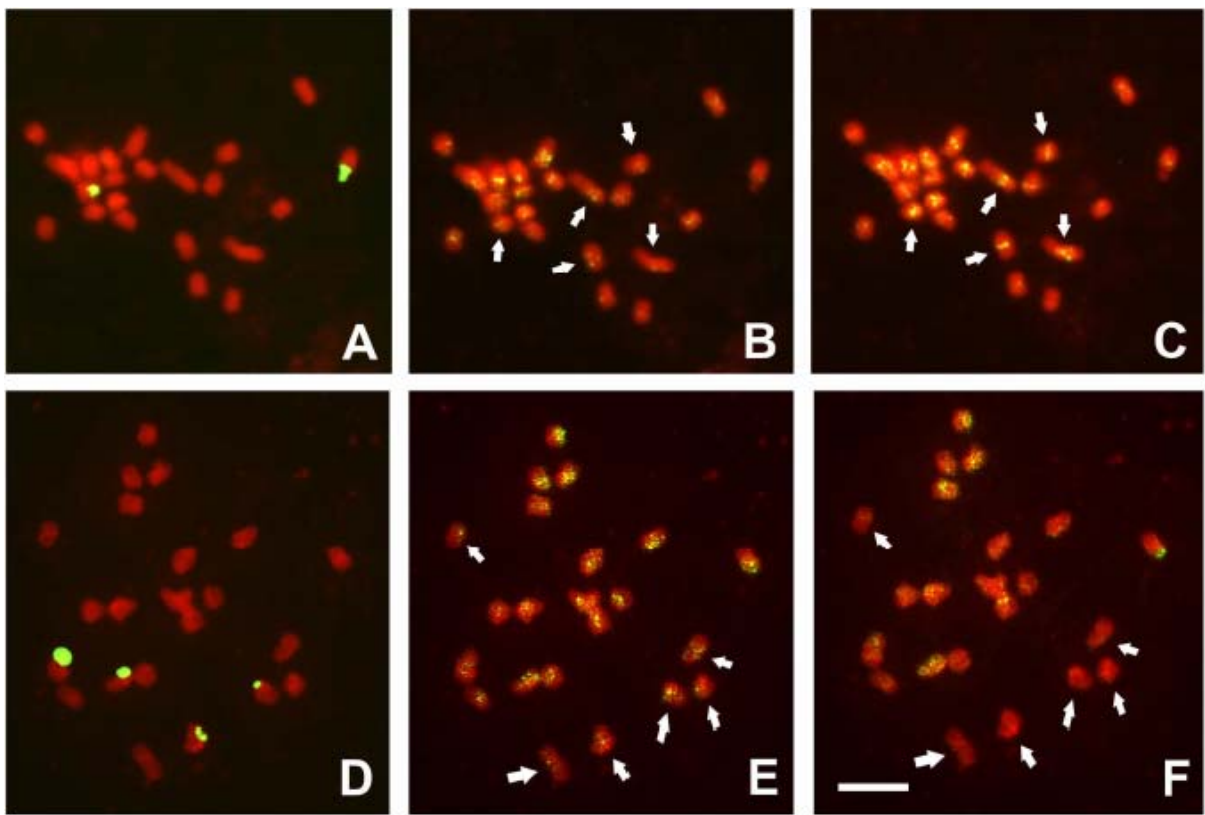


Figura 6 – Distribuição do DNAr 45S e dos clones pCa21 e pCa06 nos cromossomos de *C. canephora* e *C. eugenioides*. A) FISH com DNAr 45S mostrando dois sítios terminais em *C. canephora*. B) FISH com a sonda pCa21 contendo um segmento conservado da transcriptase reversa em *C. canephora*. C) FISH com a sonda pCa06 contendo um segmento Ty3-*gypsy*-like em *C. canephora*. Note que a sonda pCa06 localizou blocos e sinais dispersos nas mesmas regiões hibridadas com a sonda pCa21, porém pCa06 mostrou maior número de sítios em alguns cromossomos (ver setas). D) FISH com DNAr 45S mostrando quatro sítios terminais em *C. eugenioides*. Note as diferenças no tamanho dos sinais de DNAr 45S. E) FISH com a sonda pCa21 em *C. eugenioides*. Note que a sonda pCa21 revelou sinais dispersos em todos os cromossomos, com alguns blocos. F) FISH com a sonda pCa06 em *C. eugenioides*. Note que a sonda pCa06 localizou blocos e sinais dispersos co-localizados com a sonda pCa21, porém pCa06 mostrou ausência de sinais em alguns cromossomos (ver setas). Barra = 5 μ m.

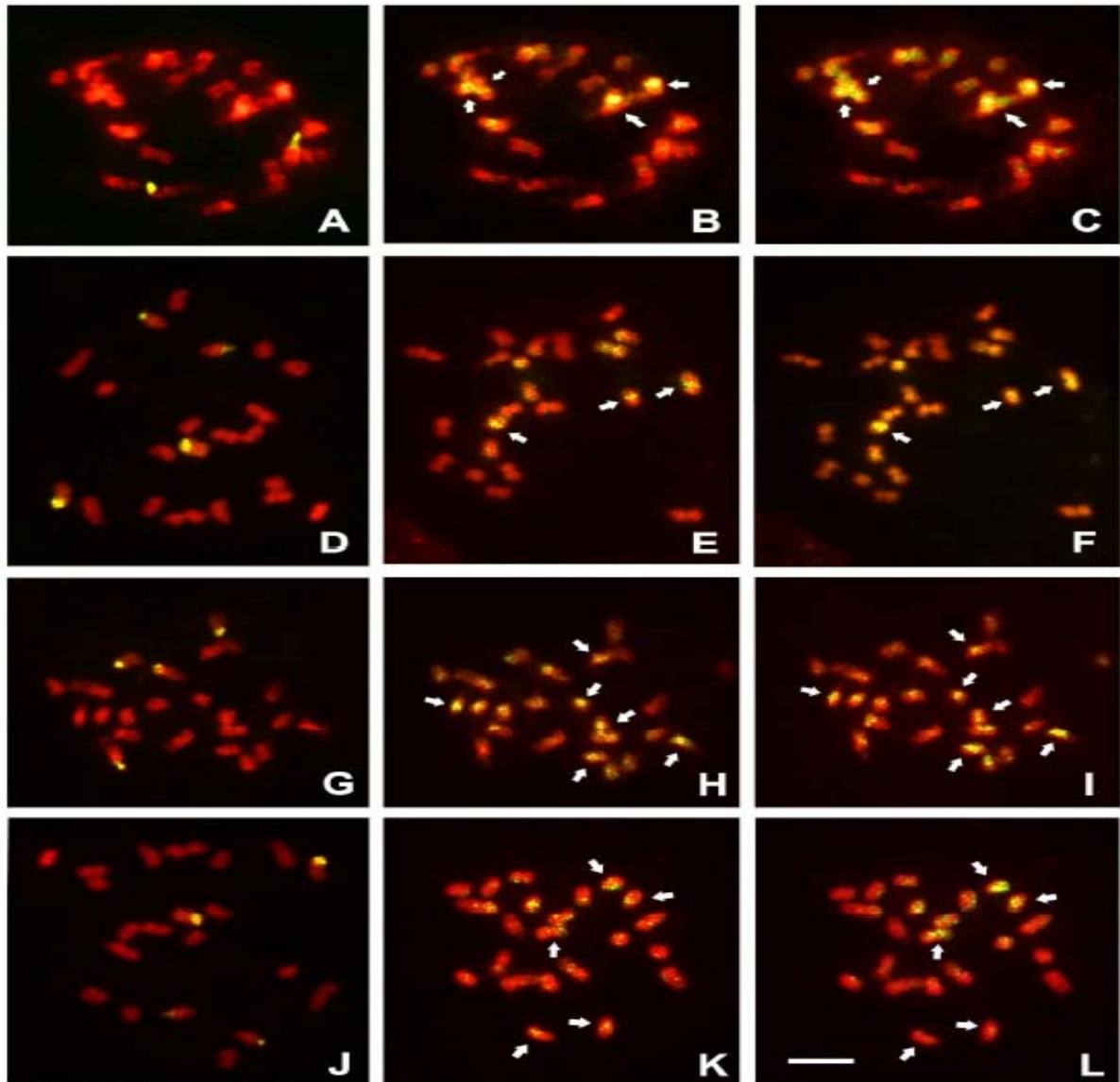


Figura 7 – Distribuição do DNAr 45S e dos clones pCa21 e pCa06 nos cromossomos de *C. liberica* var. *dewevrei*, *C. kapakata*, *C. racemosa* e *C. stenophylla*. A) FISH com DNAr 45S mostrando dois sítios terminais em *C. liberica* var. *dewevrei*. B-C) FISH com as sondas pCa21 e pCa06 em *C. liberica* var. *dewevrei*, respectivamente. Note os blocos proximais e co-localizados das duas sondas em somente quatro cromossomos (ver setas). D) FISH com DNAr 45S mostrando quatro sítios terminais em *C. kapakata*. Note as diferenças no tamanho dos sinais de DNAr 45S. E-F) FISH com as sondas pCa21 e pCa06 em *C. kapakata*, respectivamente. Note que as sondas mostraram blocos em poucos cromossomos, com sinais de pCa21 hibridizados em cerca de metade dos cromossomos e sinais de pCa06 na maioria dos cromossomos, sendo alguns co-localizados (ver setas). G) FISH com DNAr 45S mostrando quatro sítios terminais em *C. racemosa*. H-I) FISH com as sondas pCa21 e pCa06 em *C. racemosa*, respectivamente. Note que as sondas mostraram blocos e sinais dispersos, além de co-localizados na maioria dos cromossomos (ver setas). J) FISH com DNAr 45S mostrando quatro sítios terminais em *C. stenophylla*. Note as diferenças no tamanho dos sinais de DNAr 45S. K-L) FISH com as sondas pCa21 e pCa06 em *C. stenophylla*, respectivamente. Note que as sondas mostraram sinais dispersos em cerca de metade dos cromossomos, alguns co-localizados, porém a sonda pCa21 mostrou maior número de sítios de hibridação (ver setas). Barra = 5 m.

Este estudo mostrou que as espécies de *Coffea* apresentam genoma rico em heterocromatina e DNA repetitivo. Esse artigo revela a importância dos retroelementos na constituição genômica e cariotípica de *Coffea*, uma vez que o perfil de hibridação *in situ* apontou para a forte e comum ocorrência das sequências presentes nos clones pCa21 e pCa06 nos cromossomos dessas sete espécies *Coffea*, exceto para *C. liberica var. dewevrei*. Os estudos de GISH revelaram a dificuldade na determinação dos progenitores de *C. arabica* (Raina et al. 1998; Lashermes et al. 1999), provavelmente porque o grupo apresenta genomas semelhantes e, assim, partilham de famílias repetitivas em comum. A FISH com elementos repetitivos obtidos por DOP-PCR mostraram um padrão disperso e coexistência ou não com regiões ricas em heterocromatina, indicando se tratar de famílias distintas de DNA repetitivo. Além disso, as espécies de *Coffea* mostraram variações no número de sinais dispersos e blocos com as sondas pCa21 e pCa06, podendo se tratar de famílias de DNA repetitivo diferentes. Esses retroelementos estariam presentes desde origem da especiação do gênero, considerada recente (5-25 milhões de anos) (Lashermes et al. 1996), não sendo responsáveis por grandes modificações na estrutura cariotípica das espécies. Provavelmente esses retroelementos seriam responsáveis pela elevada similaridade genômica neste grupo de plantas. Estes poderiam auxiliar nos estudos de GISH, sendo utilizados como DNA de bloqueio, como sondas para monitorar bibliotecas BACs e para estudos futuros de reconhecimento, caracterização e funcionalidade dos retroelementos nos genomas de *Coffea*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq; IAPAR; ProPPG-UEL.

REFERÊNCIAS

- Adams SP; Leitch IJ, Bennett M D, Chase MW, Leitch AR (2000) Ribosomal DNA evolution and phylogeny in Aloe (Asphodelaceae). *Am J Bot* 87: 1578–1583.
- Belyayev A, Raskina O, Nevo E (2001) Chromosomal distribution of reverse transcriptase-containing retroelements in two Triticeae species. *Chromosome Res* 9: 129-136.
- Berthaud J, Charrier A (1988) Genetic resources of *Coffea*. In: Clarke RJ, Macrae R, eds. *Coffee*. London: Elsevier Applied Science, pp 1-42.
- Brandes A., Heslop-Harrison JS, Kamm A, Kubis S, Doudrick RL, Schmidt T (1997) Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of Ty1-*copia*-like *retrotransposons* in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Mol Biol* 33: 197-244.
- Cabral JS, Felix LP, Guerra M (2006). Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four Maxillaria species (Orchidaceae). *Genet Mol Biol* 29: 659-664.
- Clarindo WR, Carvalho CR (2008) First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant Syst Evol* 1:1-5.
- Clarindo WR, Carvalho CR (2009) Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. *Plant Syst Evol* 28: 73-81.
- Davis AP, Govaerts R, Bridson DM, Stoffelen P (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). *Bot J Linn Soc* 152: 465-512.
- Diniz LEC, Sakiyama NS, Lashermes P, Caixeta ET, Oliveira ACB, Zambolim EM, Loureiro ME, Pereira AA, Zambolim L (2005) Analysis of marker associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breed Appl Biotechnol* 5: 387-393.
- Fernandes T, Rego LNAA, Nardy M, Yuyama PM, Vanzela ALL (2009) Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. *Genet Mol Biol* 32: 320-327.
- Fregonezi JN, Fernandes T, Torezan JM, Vieira AOS, Vanzela ALL (2006) Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genet Mol Biol* 29: 97-104.

- Guerra M, Santos KGB, Ehrendorfer F (2000) Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae—a case of parallel chromosomal evolution. *Am J Bot* 87: 735–747.
- Hamon P, Siljak-Yakovlev S, Srisuwan S O, Robin O, Poncet V, Hamon S, Kochko A (2009) Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. *Chromosome Res* 17: 291-394.
- Hemmer W, Morawetz W (1990) Karyological differentiation in Sapindaceae with special reference to *Serjania* and *Cardiospermum*. *Bot. Acta* 103: 372-383.
- Herrera JC, Combes MC, Anthony F, Charrier A, Lashermes P (2002) Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): segregation and recombination of the *C. canephora* genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C. arabica*×*C. canephora*). *Theor Appl Genet* 104: 661-668.
- Heslop-Harrison, JS, Brandes A, Takeda S, Schmidt T, Vershinin A, Alkhimova EG, Kamm A, Doudrick RL, Schwarzacher T, Katsiotis SK, Kumar A, Pearce SR, Flavell AJ, Harrison GE (1997) The chromosomal distribution of Ty1-copia group *retrotransposons* elements in higher plants and their implication for genome evolution. *Genetica* 100:197-204.
- Krishnan P, Sapra VT, Soliman KM, Zipf A (2001) FISH mapping of the 5S and 18S-28S rDNA loci in different species of *Glycine*. *J Hered* 92:295-300.
- Krug CA (1934) Contribuição para o estudo da citologia do gênero *Coffea*. Campinas: Instituto Agronômico, Boletim Técnico.
- Kubis S, Schimdt T, Heslop-Harrison JS (1998) Repetitive DNA elements as a major component of plants genomes. *Ann Bot* 82: 45-55.
- Kumar A, Bennetzen JL (1999) Plant *retrotransposons*. *Annu Rev Genet* 33: 479-532.
- Larsen J, Ottesen AM, Lundsteen C, Leffers H, Larsen JK (2001) Optimization of DOP-PCR amplification of DNA for high-resolution comparative genomic hybridization analysis. *Cytometry* 44: 317–325.
- Lashermes P, Trouslot P, Anthony F, Combes MC, Charrier A (1996) Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accesions of *Coffea arabica*. *Euphytica* 87: 59-64.

- Lashermes P, Combes MC, Trouslot P, Charrier A (1997) Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea L.*) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theor Appl Genet* 94: 947–955.
- Lashermes P, Combes MC, Robert J, Trouslot P, D'Hont A, Anthony F, Charrier A (1999) Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica L.* genome. *Mol Gen Genet* 261: 259–266.
- Lombello RA, Pinto-Maglio CAF (2004a) Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea L.* chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. I. *C. humilis*, *C. kapakata*, *C. sp. Moloundou* and *C. stenophylla*. *Caryologia* 57: 11-17.
- Lombello RA, Pinto-Maglio CAF (2004b) Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea L.* chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. II. *C. canephora* cv. *Apoatã*, *C. salvatrix*, *C. sessiliflora*. *Caryologia* 57: 138-143.
- Lopes FR, Carazzolle MF, Pereira G. AG, Colombo CA, Carareto CMA (2008) Transposable elements in *Coffea* (Gentianales: *Rubiaceae*) transcript and their role in the origin of protein diversity in flowering plants. *Mol Genet Genomics*, 279: 385-401.
- Prakash NS, Combes MC, Somanna N, Lashermes P (2002) AFLP analysis of introgression in coffee cultivars (*Coffea arabica L.*) derived from a natural interspecific hybrid. *Euphytica* 124: 265-271.
- Pierozzi NI, Pinto-Maglio CAF, Cruz ND (1999) Characterization of somatic chromosomes of two diploid species of *Coffea L.* with acetic orcein and C-band techniques. *Caryologia* 52: 1-8.
- Pinto-Maglio CAF (2006) Cytogenetics of coffee. *Braz J Plant Physiol* 18: 37-44.
- Purugganan MD, Wessler SR (1994) Molecular evolution of magellan, a maize Ty3/gypsy-like retrotransposon. *Proc Natl Acad Sci* 91: 11674-11678.
- Raina SN, Mukai Y, Yamamoto M (1998) *In situ* hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (*Rubiaceae*). *Theor Appl Genet* 9: 1024-1029.
- Ruas PM, Ruas CF, Rampim L, Carvalho VP, Ruas EA, Sera T (2003) Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (inter-simple sequence repeat) markers. *Genet Mol Biol* 26: 319–327.

- Sang Y, Liang GH (2000) Comparative physical mapping of the 18S-5.8S-26S rDNA in three sorghum species. *Genome* 43: 918-922.
- Santini S, Cavallini A, Natali L, Minelli S, Maggini F, Cionini PG (2002) Ty1/copia- and Ty3/gypsy-like DNA sequences in *Helianthus* species. *Chromosoma* 111: 192–200.
- Schmidt T., Kubis S, Heslop-Harrison JS (1995) Analysis and chromosomal localization of *retrotransposons* in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): LINEs and Ty1-*copia*-like elements as major components of the genome. *Chromosome Res* 3: 335-345.
- Schwarzacher T, Ambros P, Schweizer D (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 134: 293-297.
- Schweizer D, Loidl J (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom Today* 9: 61–74.
- Vanzela ALL, Ruas CF, Oliveira MF, Ruas PM (2002) Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica* 114: 105-111.