

# HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE DE GENE ANÁLOGO DE RESISTÊNCIA EM CROMOSSOMOS DE *COFFEA RACEMOSA*

SARAH A. LIMA<sup>1</sup>; MIRIAN P. MALUF<sup>2</sup>; CECÍLIA A.F. PINTO-MAGLIO<sup>3</sup>

Nº 0700026

## Resumo

Apenas duas variedades de café são cultivadas comercialmente: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. Sendo assim, espécies silvestres como *Coffea racemosa* constituem importantes fontes de recursos genéticos e são utilizadas no melhoramento das variedades comerciais. A resistência a pragas e doenças é controlada por genes da planta que codificam proteínas de resistência que interagem especificamente com proteínas de virulência do patógeno, acionando respostas de defesa. Analisando seus domínios conservados, genes análogos de resistência (RGAs) são identificados por similaridade de seqüências. Em várias espécies de plantas os RGAs possuem repetições in tandem e estão organizados em clusters pelos cromossomos. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) possibilita a localização de RGAs nos cromossomos. Em *C. racemosa*, foi identificado o RGA BS2, originalmente descrito em *Capsicum chacoense*. Observam-se sinais desse gene nos cromossomos mitóticos metafásicos e nos meióticos paquítenicos, entretanto esses últimos ainda necessitam maior apuração. FISH em paquíteno é inédito em café e o protocolo em desenvolvimento permitirá o mapeamento de outros genes. Um estudo comparativo dos RGAs nas variedades de café está em progresso, visando a determinação da quantidade e distribuição desses genes em variedades diferencialmente resistentes a patógenos.

## Abstract

Worldwide only two varieties of coffee are commercially cultivated: *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. Therefore, wild species such as *Coffea racemosa* are essential for the maintenance of genetic resources and are used on coffee genetic improvement. Resistance to plagues and diseases in plants is controlled by R-genes, which produce proteins that interact with specific virulence proteins of the pathogen thus starting the plant's defense strategies. Resistance genes analogues (RGAs) can be identified by searching sequences for their conserved domains. Also, in several plant species, RGAs are organized in clusters

---

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, IB/UNICAMP, Campinas-SP, ✉ [sarah.azoubel@gmail.com](mailto:sarah.azoubel@gmail.com)

2. Colaboradora: Pesquisadora EMBRAPA, Campinas-SP.

3. Orientadora: Pesquisadora IAC, Campinas-SP



all over chromosomes. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) makes possible the location of those genes in plant chromosomes. The BS2 resistance gene, first described in *Capsicum chacoense* (Chile pepper), has been cloned from *C. Arabica* and identified by FISH in *Coffea racemosa*. Signals could be seen in mitotic metaphasic and meiotic pachytene chromosomes; however the meiotic signals are still unclear and need additional essays. This is the first report of meiotic FISH in coffee chromosomes and further development of this methodology will allow other genes to be hybridized. A comparative study to determine the quantity and distribution of RGAs loci in different species and varieties of coffee is still in progress. Since those species and varieties are differentially resistant to pathogens, hopefully it will help to relate the distribution of R-genes families in the genome to the plant's resistance to different pathogens.

## Introdução

Das cerca 100 espécies de café existentes, apenas duas são cultivadas com fins comerciais: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, sendo a primeira a mais amplamente utilizada nos cafezais e a única tetraploide ( $2n=44$ ). As espécies silvestres são diplóides ( $2n=22$ ). *C. arabica* apresenta baixa variação genética, sendo as espécies silvestres importantes fontes de recursos genéticos para programas de melhoramento do café, podendo adicionar às variedades comerciais atributos positivos. A espécie *C. racemosa* é utilizada no programa de melhoramento genético do cafeeiro, já que possui certa resistência ao bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*), enquanto que *C. arabica* e *C. canephora* são consideradas susceptíveis (GUERREIRO FILHO *et al.*, 1999).

A resistência a pragas e doenças é frequentemente controlada por genes que conferem altos níveis de resistência a genótipos específicos dos patógenos. Atualmente se aceita o modelo em que genes R (de resistência) específicos promovem a resistência interagindo com genes de virulência (Avr) também específicos do patógeno. Nos modelos mais simples, o gene R reconhece o Avr específico acionando respostas de defesa. Frequentemente essas respostas são caracterizadas pela morte das células infectadas e a acumulo de substâncias antimicrobianas no local. Os genes de resistência possuem frequentemente repetições *in tandem*, estando localizados em *clusters* no genoma por motivos evolutivos (HULBERT *et al*, 2001). Em café foram identificadas famílias de RGAs (genes análogos de resistência) em espécies resistentes ou suscetíveis a diferentes patógenos (ORSI, 2002).

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem possibilitado a localização de seqüências de ácidos nucléicos *in situ*, sendo utilizada principalmente na localização de seqüências repetitivas específicas de DNA ribossômico (rDNA) em cromossomos mitóticos



metafásicos(LOMBELLO & PINTO-MAGLIO, 2004). Como os cromossomos de café são muito pequenos nessa fase, uma solução para melhorar a resolução dos sinais de hibridização é a utilização do FISH em cromossomos meióticos paquitênicos. Esses são geralmente de 10 a 20 vezes mais longos e bivalentes, estando presentes quatro cópias do genoma, fazendo com que os sinais produzidos pelas sondas fiquem mais fortes. (WANG *et al*, 2006).

Desse modo, espera-se que uma análise comparativa em diversas espécies e variedades de café permita relacionar melhor a resistência e susceptibilidade a diferentes patógenos com a distribuição dos clusters de genes de resistência nos cromossomos. O objetivo neste estudo é o mapeamento cromossômico de RGA BS2 (primeiramente identificado no genoma de *Capsicum chacoense* e então clonado de *C. arabica*) através da técnica de hibridação *in situ* de ácidos nucléicos fluorescente (FISH) em cromossomos mitóticos e meióticos da espécie *C. racemosa*.

## **Material e Métodos**

O material utilizado provém de plantas silvestres da espécie diplóide ( $2n=2x=22$  cromossomos) *C. racemosa* Lour. do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo (IAC), com registro sob número 6593. Para as hibridizações de cromossomos paquitênicos são coletados ramos de botões florais em diversos estágios de maturação. Os ramos são colocados em câmara úmida para que se inicie o processo de meiose. O progresso do desenvolvimento dos botões é acompanhado através de microscopia e os mesmos são coletados quando atingem o paquíteno. Já para as hibridizações em cromossomos mitóticos, raízes recém-germinadas são tratadas com paradiclorobenzeno (PDB) em solução saturada por 2 a 4 horas a 16°C. Botões e raízes são fixados com uma solução de álcool: ácido acético glacial 3:1 e são armazenados à -20°C.

As raízes e os botões fixados são lavados em água e tampão citrato. Segue-se uma hidrólise enzimática (0,3% celulase, 0,3% citohelicase, 0,3% pectoliase) à 37°C por 15min (raízes) ou por 5h(botões). Em seguida, as anteras dos botões e os meristemas das raízes são dissecados e os espalhamentos cromossômicos são efetuados em lâminas com ácido acético 60%. As lamínulas são então retiradas após o congelamento com nitrogênio líquido e os espalhamentos armazenados à -20°C. As lâminas utilizadas são pré tratadas com HCl para melhor aderência do material.

As sondas utilizadas são amplificadas por PCR e marcadas com digoxigenina-11-dUTP com o kit de Nick Translation Amersham. Após a marcação das amostras é feito um teste de



detecção em membrana de nylon utilizando-se um anticorpo antidigoxigenina conjugado com fosfatase alcalina e também uma verificação de integridade em gel de agarose, assegurando assim a qualidade das sondas. Os cromossomos e a sonda são desnaturados com formamida a altas temperaturas e a hibridação ocorre overnight à 37°C. O protocolo para hibridização *in situ* é o de (PINTO-MAGLIO *et al*, 2000).

Para a detecção dos sinais é usado um anticorpo conjugado com o fluorocromo fluoresceína (antidigoxigenina-FITC). A visualização dos sítios de hibridização decorre da excitação do fluorocromo e emissão de luz de comprimento de onda próprio. Os sinais são obtidos através do uso de filtros de luz específicos para cada comprimento de onda, e a observação se dá em microscópio de fluorescência.

## **Resultados e Discussão**

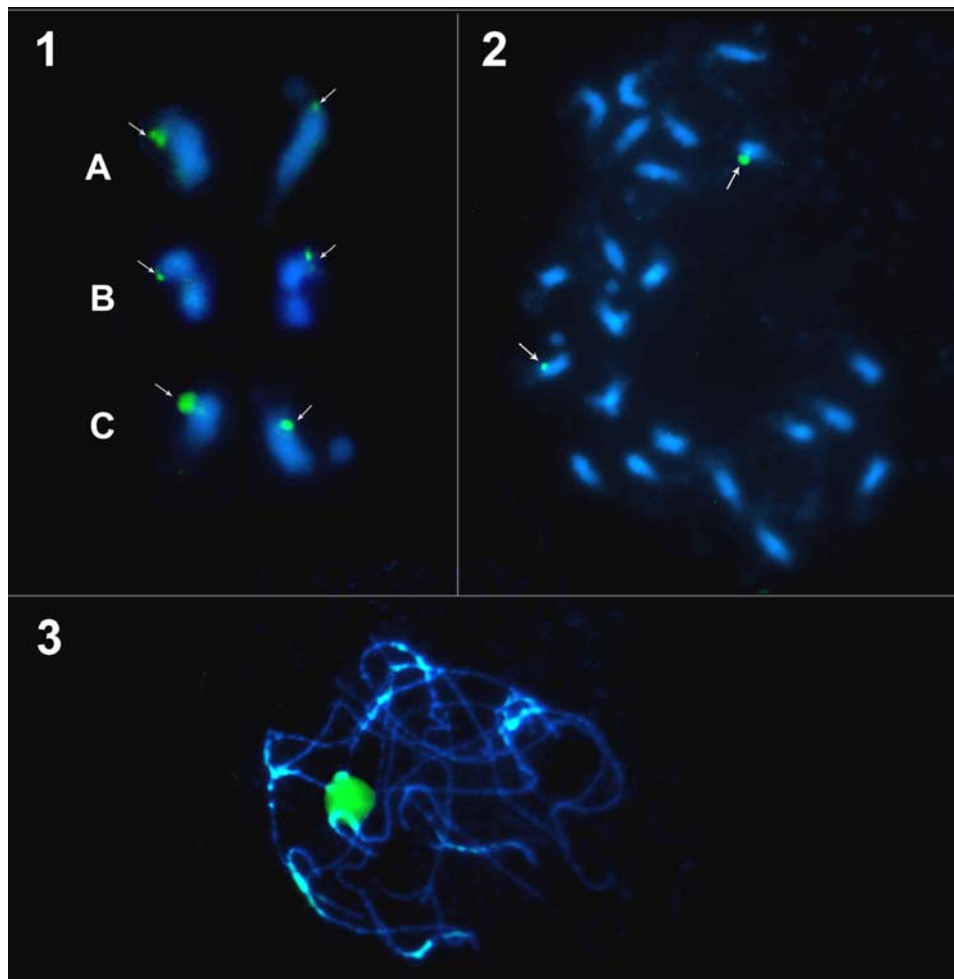
Como pode-se observar na Figura 1.1, claros sinais de agrupamentos de genes de resistência BS2 são observados no complemento cromossômico de *Coffea racemosa*. Como a sonda para esse gene foi feita considerando uma região específica da seqüência, não sendo um domínio conservado, os sinais devem corresponder a clusters específicos contendo repetições *in tandem* de seqüências bem similares àquela da sonda.

Os sinais nos cromossomos mitóticos apresentaram padrões muito similares e consistentes de marcações entre si. Parece haver dois clusters bem próximos em cada um dos cromossomos marcados. Ainda não é possível afirmar se esse par de cromossomos representado nas figuras 1.1 e 1.2 consiste em um par de homólogos ou em dois cromossomos diferentes. Entretanto, como o padrão em ambos os cromossomos do par é similar e também é pouco provável que os clusters de genes de resistência sejam tão diferentes entre os parentais a ponto de estarem em cromossomos diferentes, acredita-se que se tratem de homólogos.

Nas células meióticas paquitênicas (Figura 1.3), cada par de cromossomos homólogos é representado por um fio. Dessa forma, comparando o sinal mitótico com o sinal meiótico é possível determinar com certeza se os clusters pertencem à cromossomos homólogos ou não. Contudo, as marcações no paquíteno ainda não estão claras, aparecendo em vários pontos de cromatina mais condensada e no nucléolo, variando entre células. Esses sinais podem ser devidos a hibridação inespecífica da sonda ou a ligação inespecífica do anticorpo. Como o protocolo para paquíteno é novo, tendo sido desenvolvido durante o estudo, algumas providências como o aumento da temperatura de hibridização e



experimentos controle com outras sondas e apenas com os anticorpos estão sendo tomadas para aperfeiçoar o mapeamento do gene.



**FIGURA 1.** Sinais do gene BS2 nos cromossomos de *Coffea racemosa*. 1) A, B e C são células mitóticas diferentes cujos cromossomos com sinais (setas) foram selecionados. 2) Célula mitótica em metáfase contendo cromossomos marcados, setas indicam os sinais. 3) FISH em cromossomo meiótico em paquíteno. Nucléolo e regiões de cromatina mais condensada são mostradas marcadas

Os estudos em mitose se mostraram eficientes na localização de clusters de RGAs nos cromossomos. Já o protocolo para hibridização *in situ* em paquíteno ainda precisa ser aperfeiçoado, mas tem grande potencial para se tornar uma importante ferramenta no mapeamento gênico de café devido à sua alta resolução.

Foi determinado que seqüências similares ao gene de resistência BS2 existem em *Coffea racemosa*. Os fortes sinais nos cromossomos mitóticos indicam que há repetições agrupadas dessas seqüências, formando clusters. É provável que a clusterização dos genes de resistências se devam à seleção natural. É interessante que genes que conferem



resistência a determinados patógenos segreguem juntos nos processos de recombinação que ocorrem na meiose.

Outros estudos futuros em diferentes espécies e variedades, abrangendo também mais genes, permitirão que a relação entre a distribuição dos grupos de RGAs e a resistência das plantas a diferentes patógenos seja melhor esclarecida, bem como os mecanismos evolutivos que regem essas diferenças

### **Referências Bibliográficas**

GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M.B.; ESKES, A.B. **Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella***. Euphytica. 105:7-15. 1999.

HULBERT, S. H.; WEBB, C. A.; SMITH, S. M.; SUN, Q. **RESISTANCE GENE COMPLEXES: Evolution and Utilization**. Annu. Rev. Phytopathol. 39:285–312. 2001.

LOMBELLO, R.C.; 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, 57(1):11-17. 2004a.

ORSI, C.H. **Identificação e análise da expressão de seqüências de genes tipo RGA em espécies de *Coffea* resistentes e susceptíveis ao nematóide *Meloidogyne exigua***. 2002. Dissertação (Mestrado em Genética Vegetal) – IB, UNICAMP, Campinas-SP.

PINTO-MAGLIO, C.A.F.; CUÉLLAR, T.; BARBOSA, R.L. **Aplicação de técnicas de citogenética molecular na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L..** I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 444-446. 2000.

WANG, C. R.; HARPER, L.; CANDE, W. Z. **High-Resolution Single-Copy Gene Fluorescence in Situ Hybridization and Its Use in the Construction of a Cytogenetic Map of Maize Chromosome 9**. The Plant Cell. (18)529–544. 2006.