

## AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE MARCADORES MOLECULARES SSR ENTRE *Coffea canephora* E *Coffea arabica*

**Yumi Sheu<sup>1</sup>, Ludymila Brandão Motta<sup>1</sup>, Diogo Souza Alvez<sup>1</sup>, Taís Cristina Bastos Soares<sup>1</sup>, Andréia Barcelos Passos Lima<sup>1</sup>, Maria Amélia Gava Ferrão<sup>2</sup>, Romario Gava Ferrão<sup>3</sup>, Aymbire Francisco Almeida da Fonseca<sup>2</sup>, Fábio Demolinari de Miranda<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, Campus Universitário, s/n, Alegre- ES, Brasil, CEP 29500-000 yumisheu@hotmail.com, ludybrm@yahoo.com.br, diogosouzalves@hotmail.com, tcbsoares@yahoo.com.br, albarcelos@hotmail.com, fademolinari@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Embrapa Café/Incaper, Rua Afonso Sarlo, 160- Bento Ferreira, Vitória-ES, Brasil, 29050-790 mferrao@incaper.es.gov.br, aymbire@incaper.es.gov.br

<sup>3</sup> Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), Rua Afonso Sarlo, 160- Bento Ferreira, Vitória-ES, Brasil, 29050-790 romario@incaper.es.gov.br

**Resumo-** O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de amplificação cruzada de 21 marcadores microssatélites entre espécies do gênero *Coffea*. Marcadores SSR originalmente desenvolvidos para *Coffea arabica* foram utilizados em reações de PCR para avaliação de amostra de DNA de nove genótipos de cafeeiro da espécie *Coffea canephora*. Os genótipos avaliados pertencem ao banco de germoplasma do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). Na avaliação da transferibilidade dos loci, foi verificado que, dos primers SSR analisados, 13 (61,9%) geraram produtos de amplificação satisfatórios para as análises moleculares, dos quais sete apresentaram-se polimórficos. Apenas dois microssatélites (SSRCa018 e SSRCa087) revelaram PIC consideráveis. Com relação às análises de variabilidade genética, os genótipos ES-Robusta Precoce e o ES-Robusta tardio foram os mais similares e o ES-Robusta IAC2286-3 e ES-Robusta tardio os mais divergentes. Não foram identificados grupos por meio do agrupamento UPGMA, sendo necessário a avaliação de um maior número de loci para adequada estimativa da variabilidade genética entre os genótipos de café aqui estudados.

**Palavras-chave:** Diversidade Genética, Café robusta, marcadores moleculares.

**Área do Conhecimento:** Ciências Agrárias

### Introdução

O gênero *Coffea* abriga mais de 100 espécies (DAVIS e STOFFELEN, 2006) dentre as quais, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (café robusta) respondem por quase todo o café produzido e comercializado no mundo. O café arábica representa mais de 60% desta produção sendo cultivado em regiões mais frias, geralmente em altitudes acima de 500 metros. Desta espécie pode ser obtida uma produção de cafés mais

finos, com melhor aroma e sabor. O café robusta, responde por aproximadamente 40% da produção mundial e é adaptado á regiões mais quentes e de altitudes abaixo de 500 metros. Seus frutos originam um café de bebida neutra, utilizado na produção de café solúvel e em “blends” com arábica (SEAG, 2008).

Com relação aos aspectos genéticos e morfoagronômicos, plantas da espécie *C. canephora* são diplóides ( $2n=2x=22$  cromossomos), com auto-incompatibilidade genética do tipo gametofítica e reproduzem-se por fecundação cruzada (CHARRIER e BERTHAUD, 1985). Em razão de sua forma

natural de reprodução, as lavouras de café robusta são de grande heterogeneidade, com plantas muito distintas quanto à arquitetura da parte aérea, ao formato e tamanho dos grãos, à época e uniformidade de maturação dos frutos, suscetibilidade a pragas e doenças, tolerância à seca, ao vigor vegetativo, à capacidade produtiva, entre outros, sendo difícil a caracterização de variedades dentro da espécie (CHARRIER e BERTHAUD, 1985; BERTHAUD, 2001).

Considerando a situação acima descrita, estudos a respeito da diversidade genética entre genótipos em um banco de germoplasma ou em um programa de melhoramento tornam-se indispensáveis. Tal informação está relacionada ao fornecimento de um amplo suprimento de variação alélica que pode ser usada para criar novas combinações de genes favoráveis. Sob o ponto de vista agrônomo, a importância dessa variabilidade dentro de uma população é que sem ela a seleção não é possível (CRUZ e REGAZZI, 1997). A utilização de marcadores moleculares de DNA na caracterização do germoplasma do cafeeiro é tida como referência na determinação da variabilidade genética (CUBRY et al., 2008; FERRÃO et al., 2009). A análise da diversidade e a seleção de características agrônomicas monitoradas por marcadores moleculares baseiam-se no princípio de que se um gene, ou um bloco de genes, encontra-se ligado a um marcador genético de fácil identificação, então, esse marcador pode ser usado para selecionar a característica de interesse em um programa de melhoramento.

Devido à sua maior praticidade, atualmente os marcadores moleculares mais usados no melhoramento são os microssatélites (*Simple Sequence Repeats* – SSR) (LITT e LUTY, 1989), sendo de natureza codominante e baseados na

técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Em resumo, a caracterização de indivíduos utilizando marcadores moleculares de DNA pode otimizar e facilitar a distinção entre genótipos relacionados, aumentando a eficiência na orientação de cruzamentos entre materiais genético em um programa de melhoramento. Desta forma esse estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de amplificação cruzada de 21 marcadores microssatélites entre as espécies de *Coffea*. Marcadores SSR originalmente desenvolvidos para *Coffea arabica* foram utilizados em reações de PCR para avaliação de amostra de DNA de nove genótipos de cafeeiro da espécie *C. canephora*.

#### Materiais e Métodos

O material genético utilizado neste estudo faz parte do banco de germoplasma do *Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural* (Incaper). Foram avaliados neste estudo nove diferentes genótipos de *C. canephora*: ES 83, ES 02, ES 153, ES 03, ES Bucobensi 04, ES Robusta IAC2286-3, ES Robusta precoce, ES Robusta tardio e ES Conilon JP.

Amostras de folhas de cada genótipo foram coletadas no Incaper e armazenadas a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  no laboratório do CCAUFES até serem utilizadas para extração do DNA. A extração foi feita de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995).

Foram utilizados 21 *primers* de SSR desenvolvidos partir de sequências genômicas da espécie *C. arabica* (MISSIO et al. 2009). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 20 $\mu\text{L}$ , contendo Tampão Taq 10x

2 µL; Água ultrapura 10,18 µL; MgCl<sub>2</sub> 0,4 µL; 0,3 µL de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP); 1µL+1µL de *primer*, 0,12 µL enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 5 µL de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador, constituído da seguinte seqüência: touchdown programado para 10 ciclos 94 °C a 30 s, 66 °C a 30 s, 72 °C a 30 s e outro de 30 ciclos de 94 °C a 30 s, 57 °C a 30 s e 72°C a 30 s. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 8 minutos a 72 °C e, finalmente, a temperatura reduzida a 4 °C. Após a amplificação foram adicionados, a cada amostra, 3 µl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Estas amostras foram aplicadas em gel de acrilamida 0,6%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética ocorreu em um período de cerca de 3 h, a 110 volts. Ao término da corrida, os géis foram visualizados em Transiluminador UV.

O registro de dados moleculares foi feito a partir das bandas polimórficas detectadas entre os genótipos. Foi gerada uma matriz, onde a

**Tabela 1** - Avaliação das amplificações obtidas com os 7 loci microssatélites que revelaram polimorfismos entre os indivíduos de *Coffea canephora* utilizados no presente estudo.

Loci	SSRCa018	SSCa021	SSRCa040	SSRCa045	SSRCa054	SSRCa084	SSRCa087	Média
T <sub>A</sub>	57	57	57	57	57	57	57	
N	6	2	2	2	2	3	3	
H <sub>O</sub>	0,6667*	0,2222	0,0**	0,625	0,875	0,6667	0,8571**	0,559
H <sub>E</sub>	0,7778	0,1975	0,4688	0,4297	0,4922	0,4938	0,6122	0,496
PIC	0,7456	0,178	0,3589	0,3374	0,3711	0,4377	0,5298	

TA – Temperatura de anelamento; N – Número de alelos detectados; H<sub>O</sub> – heterozigozidade observada; H<sub>E</sub> – heterozigozidade esperada; PIC – conteúdo de informação de polimorfismo; Desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg – (\* P < 0,005; \*\*P < 0,001)

codificação (1, 2, 3, ..., n) é de acordo com o número de alelos para cada loco. Os homozigotos são representados por 11, 22, 33, ... nn, e os heterozigotos por 12, 13, 23, ... n, sendo o valor 0 destinado a falta de informação (dado perdido) sobre o individuo. Os valores de similaridade genética foram estimados através do quadrado da distância Euclidiana média a partir de variáveis padronizadas. As estimativas de dissimilaridade genética (dii') foram feitas de acordo com o complemento aritmético do coeficiente de coincidência simples e posteriormente organizado em matrizes, para serem empregadas na análise de agrupamento pela ligação média entre grupos (UPGMA). As análises de divergência genética e de agrupamento foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2001).

### Resultados

Dos 21 pares de *primers* SSR analisados, 13 (61,9%) geraram produtos de amplificação satisfatórios para as análises moleculares, dos quais 7 apresentaram-se polimórficos (Tabela 1).

Utilizando quadrado da distância Euclidiana média, foram obtidos os valores de divergência genética entre os genótipos de Café aqui

avaliados. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2** - Valores de divergência genética entre os nove genótipos de *Coffea canephora* estimados através do quadrado da distância Euclidiana média

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0								
2	0,449	0							
3	0,621	0,225	0						
4	0,656	0,562	0,518	0					
5	0,587	0,604	0,552	0,173	0				
6	0,565	0,707	0,690	0,656	0,483	0			
7	0,656	0,552	0,449	0,363	0,535	0,725	0		
8	0,759	0,604	0,552	0,414	0,587	0,776	0,156	0	
9	0,742	0,742	0,569	0,604	0,569	0,759	0,242	0,242	0

1 - ES 83; 2 - ES 02; 3 - ES 153; 4 - ES 03; 5 - ES 04; 6 - ES 2286-3; 7 - ES Robusta Precoce; 8 - ES Robusta Tardio; 9 - ES Conilon JP

### Discussão

Os experimentos aqui conduzidos caracterizam *a priori* um teste de transferabilidade dos marcadores entre espécies do gênero *Coffea*. Os resultados apresentados na tabela 1, revelaram uma elevada eficiência de amplificação (13 - 61,9% - dos 21 marcadores SSR utilizados), com um percentual satisfatório de locos polimorfismos detectados (sete - 53,84% - dos 13 marcadores). Entretanto ao comparar os loci polimórficos, foi observado uma grande variação no nível de polimorfismo detectado, o marcador SSRCa018 revelou seis alelos e um valor de PIC (Polymorphism Information Content) 0,7456 enquanto apenas dois alelos foram detectados com o marcador SSCa021 e um PIC de 0,178.

Em um estudo similar ao aqui exposto, Baruah et al. (2003) encontraram cerca de 33% de eficiência nos ensaios de transferabilidade dos marcadores SSR. Por fim, PEAKALL et al. (1998), em trabalhos de amplificação cruzadas com microssatélites entre espécies do gênero *Glycine*, discutem que há uma elevada taxa de amplificação cruzada destes marcadores entre taxons filogeneticamente relacionados, o que possibilita uma alternativa menos custosa para o desenvolvimento de microssatélites em espécie.

De acordo com os resultados (Tabela 2), pode-se observar o grau divergência genética entre os acessos considerando os loci utilizados. As estimativas obtidas são um indicativo dos valores de variabilidade genética existente entre

os clones de *C. canephora* aqui avaliados. Os genótipos que se mostraram menos divergentes foram ES Robusta Precoce e ES Robusta Tardio. Ao contrário, entre ES Robusta IAC 2286-3 e ES Robusta Tardio foram estimados os menores valores de dissimilaridade. Estes dados são contrastantes em relação às informações genealógicas e de caracteres fenotípicos dos genótipos de cafeeiro aqui avaliados, o que pode ser atribuído ao reduzido número de loci utilizados nas análises. Os procedimentos de agrupamento propostos na metodologia não possibilitaram a identificação de grupos, sugerindo uma base genética estreita entre os genótipos de *C. canephora* e que deverão se avaliados um maior número de loci para adequada estimativa da variabilidade genética, bem como da melhor discriminação dos genótipos quanto a sua similaridade genética, no sentido de relacionar a caracterização molecular e fenotípica. Concluindo, Baruah et al. (2003) e Cubry et al. (2008) afirmam que estudos de transferabilidade de marcadores SSR e aplicação destes em trabalhos de diversidade entre espécies do gênero *Coffea* contribuem para tornar mais eficientes o processo de seleção e a orientação de cruzamentos no melhoramento genético do cafeeiro.

### Conclusão

Foi verificada a elevada eficiência de amplificação cruzada de *primers* SSR entre as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, o que sugere sua utilização em trabalhos futuros como ferramentas auxiliares em programas de melhoramento genético do cafeeiro robusta.

### Referências

- ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G. de; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p.265-273, 1995.
- BARUAH, A; NAIK. V; HENDRE. P. S; RAJKUMAR. R; RAJENDRAKUMAR. P; AGGARWAL. R. K. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. **Mol Ecol Notes**, v.3, p. 647–650, 2003.
- CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: Clifford MN, WILSON, K.C (Eds), **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**, 1985, Croom Helm, London, Sydney, p.13- 47
- CUBRY, et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome**, v. 51. p. 50-63, 2008.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648p.
- CRUZ, C. D. et al. **Biometria aplicada ao estudo de diversidade genética**. 1. ed. Viçosa: Suprema, 2011.
- DAVIS, A.; STOFFELEN, P.. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **The Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p. 465–512, 2006.

- DOYLE, j. j.; DOYLE, j. I. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; MAROTA, W. B.; RIVA SOUZA, E. M. . Genetic divergence in Conilon coffee revealed by RAPD. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 67-74, 2009.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetics**, v.44, p.397-401, 1989.
- MISSIO, et al. Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 361- 371, 2009.
- PEAKALL. R; GILMORE. S; KEYS. W; MORGANTE. M; RAFALSKI. A. Cross species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Mol Biol Evol**, v. 15, p. 1275–128, 1998.
- SEAG, 2008. **Plano Estratégico de Desenvolvimento da Agricultura: novo PEDEAG 2007-2025**. Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca. – Vitória, 284 p.