

## VALIDAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM GENÓTIPOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*)

**Ludymila Brandão Motta<sup>1</sup>, Diogo Souza Alves<sup>1</sup>, Yumi Sheu<sup>1</sup>, Fábio Demolinari de Miranda<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>, Taís Cristina Bastos Soares<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 ludybrm@yahoo.com.br, diogosouzalves@hotmail.com, yumisheu@hotmail.com, fademolinari@yahoo.com.br, albarcelos@hotmail.com, tcbsoares@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

Diversos marcadores microssatélite (SSR) foram desenvolvidos pelo PROJETO GENOMA DO CAFEIEIRO, no entanto, a maioria destes marcadores ainda não foram validados no germoplasma de café arabica e conilon. Portanto, o presente trabalho visou a validação de 21 marcadores microssatélites em 10 genótipos de café pertencentes ao programa de melhoramento do cafeeiro do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), sendo cinco da espécie *Coffea arabica* e cinco representantes da espécie *C. canephora*. O grau de polimorfismo foi distinto quando comparadas as espécie. Dos 21 SSR testados 66,66% apresentaram bandas bem definidas em *C. canephora* e 33,33% em *C. arabica*. Os primers Ca002, Ca018 e Ca021 foram polimórficos nos acessos de *C. canephora*, porém monomórficos nos genótipos de *C. arabica*.

**Palavras chave:** Marcadores moleculares, SSR, Validação, Café.

**Área do Conhecimento:** Ciências Agrárias

### Introdução

Para maior eficiência nos trabalhos de melhoramento é importante o conhecimento da estrutura genética da espécie, relacionada a sua biologia floral, a forma de reprodução e de propagação; o número de cromossomos, a disponibilidade de germoplasma, informações da variabilidade, base genética, herança dos caracteres, herdabilidade e correlações entre os caracteres (FERRÃO et al., 2008).

Os marcadores moleculares são instrumentos que permitem o mapeamento e caracterização de fenótipos expressos por marcadores genéticos. Esses marcadores genéticos podem ser classificados como uma característica, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem identificar geneticamente indivíduos distintos (BORÉM, 1997). Portanto, com essa técnica é possível isolar a variação genética das interferências ambientais (FERRÃO et al., 2007; FERRÃO et al.; 2009).

O processo de utilização dos marcadores moleculares microssatélites ocorre através da técnica de PCR, com a amplificação de regiões complementares e repetitivas do genoma. As

regiões flangeadoras das sequências microssatélites são conservadas. Isto permite a alta reprodutibilidade da técnica devido os primers serem desenvolvidos para anelarem nestas regiões (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites são multialélicos e apresentam numerosas vantagens quando comparados a outros tipos de marcadores, pois são bastante informativos. A técnica baseia-se na PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e, portanto, necessitam de pequenas quantidades de DNA, são altamente reproduzíveis, não requerem radioatividade, são bem dispersos no genoma em regiões codificadoras e não codificadoras e os locos são freqüentemente conservados entre espécies relacionadas. Uma grande vantagem do marcador SSR é a herança codominante, que permite diferenciar genótipos homocigotos e heterocigotos e apresentar grande polimorfismo. Dessa forma, é capaz de gerar muito mais informações do que um marcador dominante (BUSO et al., 2003).

O PROJETO GENOMA DO CAFEIEIRO permitiu ao Brasil a construção de muitos marcadores, que foram desenvolvidos diferentes

grupos de pesquisa. No entanto, a maioria destes marcadores ainda não foram validados no germoplasma de café arábica e conilon.

Este trabalho teve como objetivo a validação de 21 pares de SSR oriundos do programa Genoma do Cafeeiro em genótipos de *C. arabica* e *C. canephora*.

### Material e métodos

Os materiais genéticos utilizados nas análises moleculares foram provenientes do Programa de Melhoramento de Café do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper) e coletados nas Fazendas Experimentais de Bananal do Norte (FEBN) e de Venda Nova do Imigrante (FEVN), sendo cinco genótipos de cafeeiro arábica e cinco de conilon (Tabela 01). A parte experimental foi desenvolvida nos laboratórios de Biotecnologia e Bioquímica do CCA UFES.

As folhas dos 10 genótipos foram coletadas e armazenadas a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas para extração do DNA. A extração foi realizada de acordo com protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado por Abdelnoor et al. (1995). A concentração foi estimada em gel de agarose 0,8%.

**Tabela 01** – Relação de genótipos avaliados

Espécie	Materiais Genéticos
C. Arabica	Bourbon Amarelo
	Caturra
	Mundo Novo
	Catuai Vermelho IAC 81
	IAPAR 59 (IAPAR)
C. Canephora	ES 02
	ES 83
	ES 153
	ES Bucobensi 04
	ES Robusta IAC 2286-3

Avaliaram-se 21 *primers* microssatélites (Tabela 2) identificados na segunda fase do Projeto Genoma do Cafeeiro, pelo grupo de trabalho do laboratório de Biologia Molecular de Café (Biocafé) da Universidade Federal de Viçosa. Tais *primers* são oriundos de duas bibliotecas genômicas de *C. arabica* enriquecidas

com repetições (GT)<sub>15</sub> e (AGG)<sub>10</sub> (Missio et al., 2009a).

**Tabela 2** - Descrição dos 21 pares de *primers* SSR utilizados nas análises moleculares

Primer	Sequência
SSRCa 002	F CTGTCCACCAACCAAAA R CTTCAACCCCAACACAC
SSRCa 006	F CTTGCTCAGTGAACCATCC R TGCCTCTTATGCCACTACTA
SSRCa 016	F AGCAGATTCCATCCTTATCC R CCACTAATCCATTCCATTCC
SSRCa 018	F GTCTCGTTTCACGCTCTCTC R ATTTTTGGCACGGTATGTTT
SSRCa 021	F GCTGAGAGTTTTGAGGGAA R CCGACGTAGTTGATGATTGA
SSRCa 033	F GTTTTTACGCGCACGATTA R TTCAAAGTCAACTCATTCT
SSRCa 040	F AGGGATGTAGAACCAGCAA R CCAATAGCTCACAACAAAGG
SSRCa 045	F GACTTGTTGCATTCCCCTA R GCGCATGTGAAGAGAAAGT
SSRCa 052	F GATGGAAACCCAGAAAGTT R TAGAAGGGCTTTGACTGGA
SSRCa 054	F CCGAACCCAACCTAACATCTC R GCAGGTCTTCCATTGTCTGT
SSRCa 055	F AAGGAAAACAACACCCAAGA R CGAGACAAGAGAGGGGAAA
SSRCa 061	F GCAGGTGCAAGTGATAAAA R CGTCTTGTGATGTGTTAGGG
SSRCa 065	F ATCTAACAAAATCCCCGTCA R ATCGGTGCGCCCTTCTAAT
SSRCa 080	F GTTCTTTCCGCCGTCAAT R GAGAAGAGAGAGGAAGGGA
SSRCa 084	F ATCGGAAAGATGTCAACCAT R CAAATTGAAGCCAGTGGTG
SSRCa 085	F ATGTGAAAATGGGAAGGAT R CACAGGAAAGTGACACGAA
SSRCa 087	F TCACTCTCGCAGACACACTA R GCAGAGATGATCACAAGTC
SSRCa 088	F TACCTCTCCTCCTCCTTCT R ATTTCTATGGACCGGCAAC
SSRCa 091	F CGTCTCGTATCACGCTCTC R TGTTCTCGTTCCTCTCTCT
SSRCa 095	F GAGAGAGCCGAGTGAAGAG R GAGAGAGAAGCCATGATTT
SSRCa 096	F GAAATGGTGAACCTCTCTCT R ATTTGCATGGCTTTGGTG

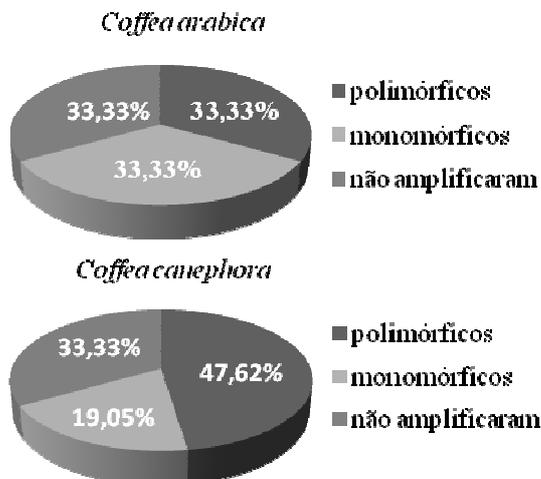
As reações de amplificação foram realizadas conforme proposto por Missio et al. (2009). As PCR foram efetuadas em termociclador Veriti 96 Applied Biosystems, utilizando a programação que consta na Tabela 3.

**Tabela.3** Programação utilizada no termociclador para as reações de SSR.

Desnaturação	94°C, 2 min.
Ciclo de touchdown	10x
	a) 94°C, 30 seg. b) 66 °C, 30 seg. c) 72°C, 30 seg.
Ciclo	30x
	a) 94°C, 30 seg. b) 57 °C, 30 seg. c) 72°C, 30 seg.
Extensão	72°C, 8 min
	4°C forever

**Resultados e Discussão**

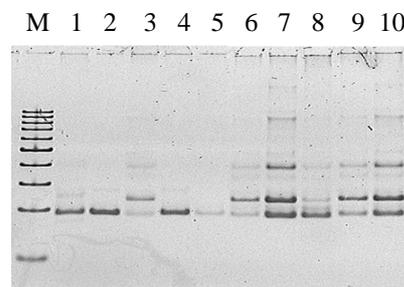
Os dados obtidos dos genótipos de *C. canephora* mostraram que dos 21 marcadores utilizados 14 apresentaram bandas bem definidas, destes 10 foram polimórficos, quatro monomórficos e sete não apresentaram produto de amplificação. Contudo, os dados avaliados em *C. arabica* foram distintos, apenas sete *primers* apresentaram polimorfismo, sete monomórficos e sete não apresentaram produto de amplificação (Figura 1).



**Figura. 1** Representação da porcentagem de *primers* polimórficos, monomórficos e não amplificados

Os *primers* SSRCa 002, 018 e 021 foram polimórficos nos acessos de *C. canephora* porém apresentaram-se monomórficos para *C. arabica*. Este padrão de fragmentos amplificados pode ser observado na Figura 2. Os *primers* SSRCa 016, 061, 065 e 096 apresentaram-se monomórficos a todos os genótipos avaliados.

Os mesmos marcadores utilizados neste trabalho foram analisados em 24 acessos de cafeeiro para se avaliar o conteúdo de informação polimórfica (Missio et. al., 2010), e concluíram que estes marcadores também foram mais polimórficos em acessos de *C.canephora* (valor médio de PIC:0,46) do que em *C. arábica* (valor médio de PIC: 0,22).



**Figura. 2** *Primer* SSRCA 021 em gel de poliácridamida 6%. Legenda: M- marcador de massa molecular, números de 1 a 5- acessos de *C. canephora* e de 6-10- acessos de *C. arabica*.

Missio et al. (2009b), investigaram o polimorfismo de 17 *primers* EST-SSR em 23 genótipos de café, e todos os EST-SSR mostraram polimorfismo entre os genótipos analisados. O mais alto nível de polimorfismo também foi observado em genótipos de *C. canephora* (88,2%), e o menor em *C. arabica* (11,8%). Este baixo polimorfismo encontrado nessa espécie pode ser explicado pelo efeito da domesticação das espécies, que culminou na sucessiva redução da diversidade genética. Tal situação é constatada principalmente em *C. arabica* devido à característica de autofecundação propiciar a homogeneidade genética (ETIENNE et al., 2002). Além disso, EST-SSR marcadores são oriundos regiões genômicas altamente conservadas, o que pode ocasionar um menor grau de polimorfismo em comparação com microssatélites originário a partir de bibliotecas genômicas (VARSHNEY et al., 2005).

**Conclusão**

O trabalho permitiu a validação de 7 *primers* SSR para *C. arabica* e 14 para *C. canephora*, os quais podem ser utilizados em estudos moleculares para os genótipos avaliados. Em *C. canephora* 66,66% dos *primers* apresentaram bandas bem definidas e 33,33% em *C. arabica*. Os *primers* Ca002, Ca018

e Ca021 foram polimórficos nos acessos de *C. canephora*, porém monomórficos nos genótipos de *C. arabica*. Os *primers* que não apresentaram produto de amplificação para o genoma dos cafeeiros em estudo podem ser reavaliados na tentativa de otimizar a PCR. Testes com diferentes gradientes de temperaturas de anelamento podem ser eficazes para diminuir a estringência dos mesmos e, conseqüentemente, possibilitar a amplificação em estudos futuros.

### Referências Bibliográficas

- 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.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV. 574p., 1997.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL Z. P.de S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular técnica 20**, Brasília, DF., setembro. 2003.
- CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. A. C. Mapas Genéticos em Plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, p.89-100, 2002.
- CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Principles and Methods in Coffee Plant Breeding: *Coffea canephora* Pierre. In: Clarke, R.J. and Macrae, R.(eds). **Coffe: Agronomy**. London, v. 4, p. 167-197, 1988.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Café, Safra 2011 segunda estimativa maio/2011**. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb>. Acesso em: julho de 2011.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. A importância do café nosso de todos os dias. 2005. Disponível em: <http://www.embrapa.br> Acesso em: maio de 2010.
- ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; DUSSERT, S.; FERNANDEZ, D.; LASHERMES, P.; BERTRAND, B. biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). In **Vitro Cell. Dev. Biol.** Plant 38:129–138, 2002.
- 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.
- FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da.; VENDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S. Avanços no melhoramento genético do café conilon. **Seminário para a Sustentabilidade da Cafeicultura**. Alegre: UFES,v1, p. 99-109. 2008.
- FERRÃO, R. G.; FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A., PACOVA, B. E. V. Melhoramento Genético de *Coffea canephora*. In: Ferrão, Romário Gava et al., (ed.) **Café Conilon**. Vitória, ES: INCAPER, 702p, 2007.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: Embrapa/Cenargen. 220p., 1998.
- MISSIO R. F.; CAIXEIRA E. T.; ZAMBOLIM E. M.; CRUZ C.D.; SAKIYAMA N. S.; Polymorphic information content of SSR markers of *Coffea* spp.. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v10 p 89-94, 2010.
- MISSIO ,R. F; CAIXETA, E.T., ZAMBOLIM, E.M. ZAMBOLIM, L.,PEREIRA, A. F, SAKIYAMA, N. S. Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, p.361-371, 2009a.
- MISSIO ,R. F; CAIXETA, E.T., ZAMBOLIM, E.M. PENA, G.P., RIBEIRO, A.P., ZAMBOLIM, L., PEREIRA, A. F, SAKIYAMA, N. S. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. **Bragantia**, v.68, n.3, p.573-581, 2009b.
- VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.48-55, 2005.