

## ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE CAFÉ CONILON VIA MARCADORES MOLECULARES DE ISSR

Thárssyla Simão de Carvalho Souza<sup>1</sup>, Naythre Ananias Nunes<sup>2</sup>, Danielle Inacio Alves<sup>3</sup>; José Dias de Souza Neto<sup>4</sup>, Ana Paula Candido Gabriel Berilli<sup>5</sup>

Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre, km 47, Rodovia BR-482 – Cachoeiro de Itapemirim, distrito de Rive – ES, tharssyllac@gmail.com; naythreanianasnunes@gmail.com; danielle.inacio@hotmail.com; jose.neto@ifes.edu.br; ana.berilli@ifes.edu.br,

### Resumo

Há décadas, o café Conilon desempenha um papel crucial no desenvolvimento socioeconômico do estado do Espírito Santo. Pertencente à família botânica Rubiaceae, a planta do café possui uma vasta diversidade de espécies e sementes. Originário da África, o Conilon é cultivado principalmente no Brasil, adaptando-se bem às condições climáticas brasileiras. Estudar a diversidade genética dessas plantas cafeeiras é de suma importância, para melhorar a qualidade, produtividade dessas plantas e também trazendo benefícios para o produtor rural. Para tanto, 32 acessos de café conilon foram utilizados e tiveram suas folhas coletadas para as análises moleculares com marcadores do tipo ISSR. A princípio foram avaliados sete primers específicos para café, que geraram 193 marcas polimórficas. Com base na análise, observou-se com base no dendrograma que os acessos a maior distância genética estão entre os clones 31, 32, 22, 25, 1, 13, 3, 14, 2, e os marcadores moleculares podem ser considerados eficientes para estudar a diversidade genética em cafeeiros.

**Palavras-chave:** Coffea canephora; Alta produtividade; Diversidade genética.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas .

### Introdução

O Café conilon, (*Coffea Canephora*), é a segunda espécie de café mais cultivada no mundo e o Espírito Santo se destaca como um dos principais produtores desse grão (Ferrão, et al, 2007), sendo responsável por cerca de 70% da produção nacional, além de ser uma das bebidas mais consumidas no mundo, sua importância econômica explica o interesse em estudar esses grãos (De Lima, et al, 2011). Pertencente à família Botânica *Rubiaceae*, grande parte dessas plantas são árvores ou arbustos tropicais, de cultivo em locais de mata baixa. Esta planta possui uma vasta variedade de plantas e sementes e todas as suas espécies são lenhosas (Monteiro, 2020). O Brasil é um grande país produtor de café, porém grande parte dos grãos produzidos são da espécie *Coffea arabica*.

Além de ser uma planta de alta produtividade, *O Café canephora* por outro lado é uma espécie que precisa constantemente de podas para garantir a produtividade (Barcelos; Castanheira, 2019). Implantado no território brasileiro, o cafeeiro de conilon passou por processo de melhoramento que permitiam o desenvolvimento de diversos cultivares com características diversas (Martins et al, 2013).

Sendo o cafeeiro uma planta perene, ou seja, plantas que possuem uma durabilidade de vida alto, grande destaque em produção desses grãos está relacionado aos pequenos produtores rurais, então programas de estudos e melhoramento genético em plantas de café vem proporcionando grandes contribuições principalmente ao produtor rural (Ferrão, et al, 2007).

Estudar a diversidade genética no café conilon é de grande importância (Mendonça et al, 2014), ele não apenas promove a melhoria da qualidade e da produtividade, mas também contribui para a sustentabilidade da cafeicultura global. O investimento em pesquisa e desenvolvimento nessa área é essencial para garantir que a produção de café possa continuar a atender às demandas do mercado e enfrentar os desafios futuros.

Marcadores moleculares de ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), possui um padrão de dominância e é uma técnica rápida e simples permitindo a ampliação de qualquer espécie se tornando ferramenta para estudo e análise (Silva, et al, 2013), além de serem de fácil entendimento em comparação a outros marcadores (Lorenzoni, 2019). Também é utilizado a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), para fazer a amplificação de microssatélites nas amostras.

## Metodologia

O seguinte procedimento foi realizado no laboratório de genética e biologia molecular do IFES Campus de Alegre através do protocolo “mini-prep” de Doyle e Doyle (1990) com modificações propostas por Berilli *et al* 2013, 200 mg de tecido vegetal das folhas de gengibre foram macerados com nitrogênio líquido, posteriormente foram transferidos para tubos de eppendorf, tal processo foi realizado com todas as 15 amostras utilizadas na pesquisa sendo 14 delas obtidas do rizoma de cultivares de gengibre na cidade de Santa Leopoldina e uma delas obtida em mercado local. Após a maceração foi adicionado 800µl do tampão de extração pré-aquecido contendo 1% CTAB, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA, 100mM Tris-HCl (Ph 8,0), 1% PVP e 0,1% 2-mercaptoethanol, invertendo-os manualmente por 5 minutos a fim de homogeneizá-los e incubando-se a 65°C por 30 a 40 minutos em banho maria, com agitação manual suave em um de intervalo de 10 minutos. Em seguida foi centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. Após tal processo o sobrenadante de aproximadamente 600µl foi transferido para novos tubos de eppendorf e a mesma quantidade de volume, 600uL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. Foi realizada uma nova centrifugação de 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e então isopropanol gelado a 70% foi adicionado, com suave inversão e submetido a “overnight” em geladeira (4°C). Realizou-se centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos, obtendo-se um “pellet”, que foi lavado duas vezes, primeiramente com 300µl de etanol 70%, logo após, lavou-se também com 300µl de etanol 95%, o “pellet” foi ressuspenso em 200µl de solução Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) e incubado em banho maria com RNase na concentração final de 40 µg/ml a 37°C por 30 minutos. As concentrações de DNA nas amostras foram estimadas por meio de gel de poliacrilamida a 10% e padronizadas na concentração de 10ng.µl<sup>-1</sup>.

As reações de amplificação via PCR foram feitas conforme Zietkiewicz *et al*, (1994) através de modificações propostas por Berilli et al (2013), num volume final de 15 µl contendo os reagentes nas seguintes concentrações para uma reação de PCR via marcadores moleculares ISSR: 1,5 µL de Tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,4, 1% de Triton X-100), 0,6 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 4,8 µL de 0,2 mM dNTPs, 0,3 µL de 0,5 mM de primer 0,2µL de Taq DNA polimerase a 5U/µL e 3µL de DNA genômico a 10 ng/UL, completando o volume final com água ultrapura, que neste caso foi 4,6µL. Um controle negativo com omissão de DNA foi incluído em cada corrida para verificar a ausência de contaminação, sendo o volume do DNA substituído por igual volume de água ultrapura.

O número de polimorfismo pode ser classificado de acordo com os primers que amplificam fragmentos a fim de que seja possível analisar sua diversidade e semelhança, neste estudo foram utilizados os primers microssatélites ISSR sendo eles selecionados através de uma triagem com 32 primers, duas amostras de DNA e um controle negativo a fim de detectar quais primers iriam detectar mais marcas polimórficas. Após tal processo seis primers foram escolhidos para o presente estudo, sendo eles os primers ISSR 5, ISSR 3, LOL 1, UBC 818, UBC 842, ISSR 17, ISSR 19, ISSR 20.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador gradiente Eppendorf com as

configurações para o programa ISSR: Ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação de 94° por 30 segundos (desnaturação), 52 °C por 40 segundos (anelamento), 72 °C por 1 minuto (extensão), e após tais repetições, 72 °C por 5 minutos e posteriormente se mantém a 25°C.

O material genético foi corado com 3uL de corante 'blue juice' 6X (0,4 ml TAE 10X, 0,5 M; 0,2 ml SDS 10%; 0,2 ml de azul de bromofenol; 7,0 ml de glicerol; 1,7 ml de água estéril) e aproximadamente 6 uL de amostra foram aplicadas juntamente com o marcador Ladder de 100 pares de bases, na etapa de eletroforese a qual foi realizada através do gel de poliacrilamida a 7% e tampão TAE 10X, a 220 volts por 2 horas e 30 minutos. Posteriormente submetido ao brometo de etídio durante 30 minutos a fim de submeter a amostra ao aparelho de foto imagem (Bio Rad) que permitiu a análise e visualização de suas bandas de DNA.

A análise genética foi realizada através do índice Aritmético de Jaccard.

O índice é definido pela fórmula:  $C_{ij} = 1 - \frac{a}{a + b + c}$

No qual a = 1 - 1: número de coincidência do tipo 1 e 1; b = 1 - 0: número de discordância do tipo 1 e 0; c = 0 - 1: número de discordância do tipo 0 e "1". Sendo; 1 presença de banda e 0 a ausência de banda.

Após a tabulação dos dados os procedimentos foram analisados no programa Genes com a complementação do Método de Otimização de Tocher o qual avalia a média de dissimilaridade entre os indivíduos e também com a utilização dos Métodos Hierárquicos que agrupam os genótipos em grupos a fim de gerar um dendograma com ramificações que associam suas similaridades genéticas com ajuda do método de agrupamento UPGMA. (Cruz; 2016)

## Resultados

Foram testados 7 primers (Tabela 1) em 32 acessos de Café conilon, que apresentaram amplificações para esses acessos. Dentre os primers utilizados destacaram-se 7 (Sete), apresentando amplificações para esses acessos, totalizando 193 bandas polimórficas nos 7 primers usados na testagem de primers. Dos 7 primers utilizados, observou-se que UBC 819, UBC 859, UBC 889, UBC 834, Echt 5 e UBC 825 apresentaram um desempenho superior, com um maior número de bandas amplificadas. A partir das 193 bandas polimórficas geradas pelos sete marcadores, conseguimos acessar a matriz de dissimilaridade das distâncias genéticas estimadas para os acessos, bem como o número de grupos formando o dendograma (figura 1).

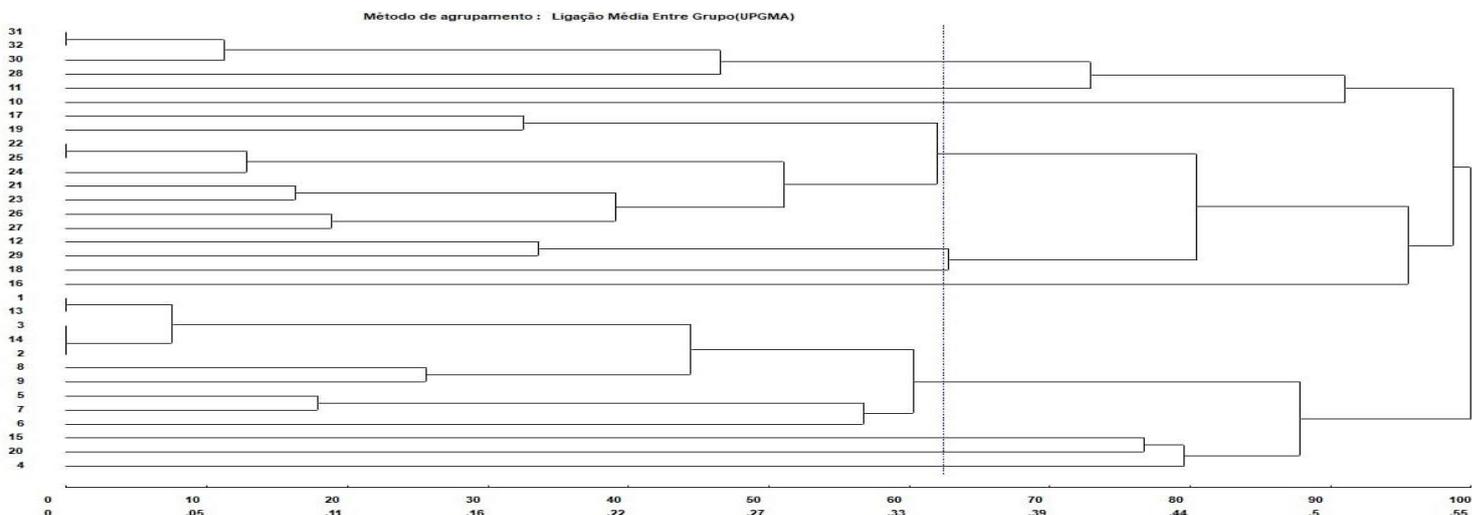
Tabela 1. Sequência dos primers e bandas polimórficas usadas na caracterização da diversidade de Café.

Primers	Sequência	Bandas Polimórficas
Primer 40 - UBC 895	AGGTCGCGGCCGCNNNNNNAT	8
Primer 20 - UBC 819	GTGTGTGTGTGTGTGTA	18
Primer 32 - UBC 859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	38
Primer 39 - UBC 889	DBDACACACACACACAC	43
Primer 42 - Echt 5	AGACAGACGC	36
Primer 21 - UBC 834	GAGAGAGAGAGA GYT	31
Primer 30 - - UBC 825	ACACACACACACACT	19

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024)

A partir das marcas geradas por esses marcadores foi possível acessar a matriz de dissimilaridade genética estimada para esses acessos (Figura 2).

Figura 1. Dendrograma formado a partir do índice de Jaccard entre os diferentes clones de café conilon



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O método de Tocher é um método de agrupamento que realiza a separação dos genótipos em grupos, ele possui a particularidade de mostrar dentro dos grupos o quão próximo um acesso são. Através deste método (Vasconcelos, *et al*, 2007), foram formados 11 grupos (Tabela 2)

Tabela 2. Grupos formados através do método de tocher.

Grupos	Indivíduos
1	30; 31; 32
2	11; 28
3	10
4	17; 19; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27
5	12; 29
6	18
7	1; 2; 3; 8; 13; 14; 16
8	5; 6; 7; 9
9	15
10	20
11	4

Fonte: Próprio autor

Pode-se observar que dentre os indivíduos, as amostras 31, 32, 22, 25, 1, 13, 3, 14, 2, foram as que possuiu maior dissimilaridade entre os 32 acessos. Os genótipos mais próximos geneticamente, foram os acessos 21 e 23; 5 e 7; 26 e 27, que estão representados pelos grupos 4 (quatro) e 8 (oito), que se encontram nas bifurcações mais curtas definidas pelo método de Tocher. Porém, destacando os indivíduos 21 e 23, 26 e 27, que não são iguais, sendo assim próximos, possuindo pouca diferença entre si geneticamente.

## Discussão

Parvathineni *et al* (2011) utilizaram o primer UBC 825 em análises de pepino e melão, obtendo um nível de polimorfismo de 87,20%, o que indicou que esse primer é altamente informativo para essas culturas. O primer UBC 819 foi empregado na avaliação da diversidade de germoplasma de gergelim (*Sesamum indicum L.*) em análises moleculares. SILVA *et al.* (2015) utilizaram o primer UBC 859 para estudar a diversidade em Tucumã do Pará, demonstrando que esse primer foi eficiente, proporcionando uma boa amplificação e visualização das bandas de DNA relacionadas à diversidade dessa espécie.

O primer UBC 889 foi utilizado por Bishoyi *et al.* (2014) para investigar a diversidade genética em *Clitoria ternatea* da Índia. Os resultados mostraram um alto grau de polimorfismo, evidenciando a eficácia do primer para esta cultura. O primer UBC 834 foi empregado em análises de *Plathymenia reticulata* Benth e demonstrou eficiência, com cerca de 82,35% de marcas polimórficas Souza *et al.*, 2018, o que representa um valor significativo de diversidade genética.

Meher *et al.* 2007 utilizaram o primer Echt 5 para estudar a diversidade genética entre e dentro das espécies de *Pinus strobus* e *Pinus monticola* no Canadá. Este primer também foi utilizado por Theriault *et al.* (2014), que o empregaram para avaliar a sustentabilidade genética de amostras de *Betula papyrifera* em áreas de mineração recuperada. O este primer foi considerado eficiente em ambas as análises.

## Conclusão

Entre os acessos estudados pode-se constatar maior distância genética entre os clones 31, 32, 22, 25, 1, 13, 3, 14, 2. Esses clones podem apresentar, em média, aproximadamente 62% a 70% de diferença entre eles, um valor bem significativo mostrando a grande diversidade entre essas plantas. Os marcadores moleculares de ISSR testados podem ser considerados eficientes para estudar a diversidade genética em cafeeiros.

## Referências

BARCELOS, T. R.; CASTANHEIRA, D. T. **Podas Programadas Do *Coffea Canephora***. Revista Campo & Negócios, Ufla, 2019.

BERILLI, A. P. C. G.; Et Al. **Response To The Selection In The 11th Cycle Of Reciprocal Recurrent Selection Among Full-Sib Families Of Maize**. Acta Scientiarum. Agronomy, V. 35, P. 435-441, 2013. Disponível Em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i4.17489>. Acesso Em: 10 Ago. 2024

BISHOYI, A. K.; PILLAI, V. V.; GEETHA, K. A. **Avaliação Da Diversidade Genética Em Populações De *Clitoria Ternatea* De Diferentes Partes Da Índia Por Marcadores Rapd E Issr**. \*Genetic Resources And Crop Evolution, V. 61, P. 1597-1609, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1007/S10722-014-0145-Y>.

CRUZ, C. D. **Genes Software-Extended And Integrated With The R, Matlab And Selegen**. \*Acta Scientiarum. Agronomy\*, V. 38, P. 547-552, 2016.

De Lima, F. A.; Sant'ana, A. E. G.; Ataíde, T. Da R.; De Omena, C. M. B.; Menezes, M. E. Da S.; Vasconcelos, S. M. L. 2011. "Café E Saúde Humana: Uma Abordagem Nas Substâncias Presentes Na Bebida Relacionada Às Doenças Cardiovasculares".

De Souza, L. C. Et Al. **Validação Do Marcador Molecular Issr Para Detecção De Diversidade Genética Em \*Plathymenia Reticulata\* Benth.** \*Revista Brasileira De Ciências Agrárias\*, V. 13, N. 1, P. 5491, 2018.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. **Isolation Of Plant Dna From Fresh Tissue.** \*Focus\*, V. 12, P. 13–15, 1990.

Ferrão, M. A. G.; Ferrão, R. G.; Da Fonseca, A. F. A.; Filho, A. C. V.; Volpi, P. S. **Origem, Dispersão, Geografia, Taxonomia E Diversidade Genética De \*Coffea Canephora\*.**

Ferrão, R. G.; Da Fonseca, A. F. A.; Bragança, S.; Ferrão, M. A. G.; De Muner, L. H. (Ed.). \*Café Conilon\*. Vitória: Incaper, 2007. P. 64-91.

Lorenzoni, R. M. **Os Marcadores Moleculares: Tipos E Aplicações.** \*Labogene Agrogenética\*. Disponível Em: <<https://www.laborgene.com.br/marcadores-moleculares/>>. Acesso Em: 26 Jun. 2023.

Martins, L. D.; Tomaz, M. A.; Amaral, J. F. T. Do; Christo, L. F.; Rodrigues, W. N.; Colodetti, T. V.; Brinati, S. V. B. **Alterações Morfológicas Em Clones De Cafeeiro Conilon Submetidos A Níveis De Fósforo.** \*Scientia Plena\*, V. 9, N. 4, 2013. Disponível Em: <<https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/1229>>.

Mehes, M.; Nkongolo, K.; Michael, P. **Análise Genética De Populações De \*Pinus Strobus\* E \*Pinus Monticola\* Do Canadá Usando Marcadores Issr E Rapd: Desenvolvimento De Marcadores Scar Específicos Do Genoma.** \*Plant Systematics And Evolution\*, V. 267, P. 47–63, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1007/S00606-007-0534-1>.

Mendonça, R. F. De; Ferrão, R. G.; Ferrão, M. A. G.; Tófano, J. L.; Da Fonseca, A. F. A.; Volpi, S. P.; Filho, A. C. V.; Guarçoni, R. C. **Estimativa De Parâmetros Genéticos De Clones De Café Conilon Originados De População De Maturação De Grão Precoce No Estado Do Espírito Santo.** Vitória: Incaper, 2014.

Parvathaneni, R. K. Et Al. **Fingerprinting In Cucumber And Melon (\*Cucumis Spp.\*) Genotypes Using Morphological And Issr Markers.** *Journal Of Crop Science And Biotechnology*\*, V. 14, P. 39-43, 2011.

Silva, I. C.; Oliveira, M. **Divergência Genética Entre Matrizes De Tucumã Do Pará Seleccionadas Para A Produção De Óleo Por Marcadores ISSR.** 2015.

Silva, M. R. Da; Oliveira, M. Do S. P. De; Moura, E. F.; Rodrigues, S. De M. **Seleção De Primers ISSR Para Uso Em Genomas De Camuzeiro.** 2013.

Therriault, G.; Nkongolo, K. K.; Michael, P. **Análises Genéticas E De Metais De Populações Fragmentadas De \*Betula Papyrifera\* (Marsh) Em Uma Região Recuperada Por Mineração: Identificação De Marcador Molecular De Diagnóstico Populacional.** \*Ecology And Evolution\*, V. 4, N. 17, P. 3435-3443, 2014.

Ziętkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. **Genome Fingerprinting By Simple Sequence Repeat (Ssr)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification.** \*Genomics\*, V. 20, N. 2, P. 176-183, 1994. Doi: <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>.