

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ACESSOS DE *COFFEA ARABICA* INTRODUZIDOS NA COLEÇÃO DA ETIÓPIA DO IAPAR¹

Rafaelle Vecchia Ferreira²; Giselly Aparecida Andrade³; Pierre Charmetant⁴; Thierry Leroy⁵; Douglas Silva Domingues⁶; Luiz Filipe Protasio Pereira⁷

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

²Bolsista Capes, MS, rafaelle.ferreira@gmail.com

³Profissional de Ciência e Tecnologia do Instituto Agrônomo do Paraná, PhD, IAPAR, Londrina – PR, giselly@iapar.br

⁴Pesquisador, PhD, Cirad, Montpellier – França, pierre.charmetant@cirad.fr

⁵Pesquisador, PhD, Cirad, Montpellier – França, thierry.leroy@cirad.fr

⁶Pesquisador, DSc, UNESP, Rio Claro – SP, dougsd3@gmail.com

⁷Pesquisador, PhD, Embrapa Café/IAPAR, Londrina – PR, filipe.pereira@embrapa.br

RESUMO: Marcadores microssatélites foram utilizados na discriminação de novos acessos de *Coffea arabica* que foram introduzidos na coleção da Etiópia do IAPAR, provenientes de uma coleção similar na República de Camarões. Inicialmente 46 acessos de Camarões foram repassados para a Embrapa CPAC (Embrapa Cerrados – Planaltina-DF), onde ficaram em quarentena. Em seguida, estes acessos foram transferidos para o IAPAR, porém durante os processos de quarentena e transferência, alguns dos acessos foram misturados. Visando identificar corretamente os acessos e também validar os SSRs previamente identificados, todos os 46 acessos foram analisados em géis de poliacrilamida. Os 8 locos microssatélites utilizados geraram um total de 19 alelos, com uma média de 2,3 alelos por loco. A variação alélica foi de 2 a 3 alelos por loco. Para realizar as análises de divergência genética uma matriz de distância foi computada e utilizada para obter uma árvore (dendograma) de diversidade global. Observou-se 3 diferentes agrupamentos entre os acessos ET34, Java e ET19. A análise genotípica dos diferentes locos microssatélites indicou quais acessos corresponderiam corretamente a ET34, Java ou ET19, já que este último teve o papel de controle positivo. Os marcadores microssatélites foram eficientes para discriminar os acessos de *C. arabica* provenientes de Camarões e o número de locos utilizado (8) também foi suficiente para a separação entre os acessos com seus respectivos genótipos.

PALAVRAS-CHAVE: cafeeiro, marcadores microssatélites, genotipagem.

IDENTIFICATION OF NEW ACCESS OF *COFFEA ARABICA* INTRODUCED INTO THE ETHIOPIA COLLECTION FROM IAPAR

ABSTRACT: Microsatellite markers were used in discrimination of new access of *Coffea arabica* which were introduced in the collection of Ethiopia IAPAR, from a similar collection in Cameroon. Initially 46 Cameroon accesses were transferred to Embrapa CPAC (Embrapa Cerrados – Planaltina-DF), where they were quarantined. Then these accessions were transferred to the IAPAR, but during the quarantine and transfer processes, some of the accesses were mixed. To identify the accesses correctly and validating the previously identified SSRs, all 46 accesses were analyzed on polyacrylamide gels. The 8 microsatellite loci used generated a total of 19 alleles, with an average of 2.3 alleles per locus. Allelic variation was 2 to 3 alleles per locus. To perform the analysis of genetic divergence a distance matrix was computed and used for a diversity of overall tree (dendrogram). There were 3 different groups between ET34 access, Java and ET19. Genotypic analysis of different microsatellite loci indicated which accesses correctly correspond to ET34, ET19 or Java, since this latter has the role positive control. Microsatellite markers were efficient to discriminate the *C. arabica* accessions from Cameroon and the number of loci used (8) is also sufficient for the separation between accesses to their respective genotype.

KEYWORDS: coffee tree, microsatellite markers, genotyping.

INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética de plantas para a identificação de variedades e testes de identidade genética, para verificar a paternidade de híbridos, para estimar diversidade genética do germoplasma, avaliar a estrutura genética de populações ou para identificar regiões genômicas associadas às características de interesse econômico (LAMAS, 2010). A identificação de variedades com base em aspectos morfológicos muitas vezes é insuficiente e demorada para espécies perenes, como é o caso de *Coffea arabica*, que apresenta uma diversidade estreita, por se tratar de uma espécie de origem recente (LASHERMES et al., 1999). Deste modo, o uso de marcadores moleculares para distinção de variedades oferece vantagens em relação aos estudos morfológicos, por apresentar uma resposta mais rápida e também por não ser influenciado pelo ambiente (LAMAS, 2010). Os marcadores microssatélites

tem alta capacidade de resolver diferenças genéticas, quando comparados às outras classes de marcadores moleculares. O grande poder de discriminação dos microssatélites justifica seu uso quando se pretende distinguir variedades ou cultivares de uma mesma espécie. Um exemplo está no estudo de Schuck et al. (2010), onde houve a necessidade de uma identificação precisa de variedades de uva Goethe, importante para atender aos requisitos de denominação de origem e indicação de procedência. O sucesso da utilização dos marcadores microssatélites foi confirmado, apontando as duas variedades estudadas como idênticas, porém únicas e diferentes de outras variedades.

Assim, definiu-se a utilização dos marcadores microssatélites para um estudo de identificação de novos acessos de *Coffea arabica* que foram introduzidos na coleção da Etiópia do IAPAR, provenientes de outra coleção que estava presente na República de Camarões. Inicialmente 46 acessos daquela região foram repassados para a Embrapa CPAC (Embrapa Cerrados – Planaltina-DF) onde ficaram em quarentena. Em seguida estes acessos foram transferidos para o IAPAR. No viveiro do IAPAR plantas com etiquetas "ET34" (17 mudas), "Java" (27 mudas) e "ET19" foram recebidas. Porém durante a quarentena e no deslocamento, alguns dos acessos foram misturados, sendo proposta uma avaliação molecular para distinguir os respectivos acessos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi validar os marcadores microssatélites para estudos de identificação de variedades através da discriminação de novos acessos de *Coffea arabica*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Um conjunto de 44 acessos de *Coffea arabica* inicialmente identificados como "ET34" e "Java" foram recebidos da Embrapa CPAC, juntamente com 2 acessos de ET19 (**Tabela 1**). As mudas destes acessos ficaram acondicionadas em viveiros até a coleta de folhas para o isolamento do DNA genômico.

Tabela 1. Conjunto de 46 acessos de *C. arabica* e identificação original utilizada na análise com os marcadores microssatélites. ET19 1 e ET19 2 são os controles positivos.

Identificação	Acesso	Identificação	Acesso
1	ET34 1	24	JAVA 7
2	ET34 2	25	JAVA 8
3	ET34 3	26	JAVA 9
4	ET34 4	27	JAVA 10
5	ET34 5	28	JAVA 11
6	ET34 6	29	JAVA 12
7	ET34 7	30	JAVA 13
8	ET34 8	31	JAVA 14
9	ET34 9	32	JAVA 15
10	ET34 10	33	JAVA 16
11	ET34 11	34	JAVA 17
12	ET34 12	35	JAVA 18
13	ET34 13	36	JAVA 19
14	ET34 14	37	JAVA 20
15	ET34 15	38	JAVA 21
16	ET34 16	39	JAVA 22
17	ET34 17	40	JAVA 23
18	JAVA 1	41	JAVA 24
19	JAVA 2	42	JAVA 25
20	JAVA 3	43	JAVA 26
21	JAVA 4	44	JAVA 27
22	JAVA 5	45	ET19 1
23	JAVA 6	46	ET19 2

Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi isolado a partir de folhas de mudas pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990). Aproximadamente 5 g de folhas de cafeeiro foram maceradas em nitrogênio líquido e acondicionadas em tubos falcon de 50 ml. Após a maceração seguiu-se os passos descritos em Brasileiro e Carneiro (1998), com as modificações necessárias para evitar a oxidação do material e para purificar o DNA obtido, como a adição de 0,4 ml de metabissulfito de sódio 10% ao tampão de extração e purificação com fenol-clorofórmio, respectivamente.

Após a extração, a qualidade e a integridade do DNA extraído foi verificada por gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria.

Amplificação dos locos microssatélites via PCR

Foram utilizados 8 locos microssatélite (Tabela 2) para as análises de genotipagem, sendo que estes foram escolhidos por apresentarem resultados polimórficos em trabalho anterior (FERREIRA, 2010).

Tabela 2. Lista dos locos microssatélites utilizados nas análises dos 46 novos acessos de *C. arabica* introduzidos na coleção do IAPAR

Loco	Amplitude do Loco (pb)	Espécie	Tipo de repetição	Cod. Internacional	Lab. de Origem
260	120 - 180	<i>Coffea arabica</i> , clone Zapll.47	(CT)9(CA)8(CT)4(CA)5	AJ250260	IRD
270	215 - 255	<i>Coffea arabica</i> var HTD, clone 1-D8	(CA)10(TA)8	AY220270	CCMB
350	430 - 470	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(GT)8	AM231550	CIRAD-IRD
414	120 - 180	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(CA)9	AM408638	CIRAD-IRD
501	130 - 170	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(TG)8	AM231576	CIRAD-IRD
503	180 - 220	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(AC)9	AM408715	CIRAD-IRD
512	185 - 270	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(AC)11	AM408724	CIRAD-IRD
514	320 - 360	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(AC)8	AM408726	CIRAD-IRD

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 10 µl, contendo 25 ng de DNA genômico, 2 µl do tampão 5X (Green Go Taq® Flexi – Promega), 1,6 mM de dNTPs (dNTP–Solução Mix – Amresco), 0,5 mM de MgCl₂, 1 µM de cada primer (*forward e reverse*) e 1 U de Taq DNA polimerase (Go Taq® Flexi – Promega). As amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp® - PCR System 9700 (Applied Biosystems), com o seguinte programa: 95°C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos de 95°C por 50 segundos; 50°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Eletoforese dos fragmentos

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 10%, por aproximadamente 4 horas. Para estimar os tamanhos dos fragmentos, foi utilizado marcador com fragmento de DNA padrão com escala de 50 pb. Os fragmentos foram corados com brometo de etídio e a aquisição da imagem foi realizada através do sistema digital Kodak KS 120.

Análise dos dados

Os fragmentos separados nos géis de poliacrilamida correspondem aos diferentes alelos para cada loco. Os dados tabulados foram utilizados para acessar o número de alelos e a frequência alélica por loco. Para realizar as análises de divergência genética, uma matriz de distância foi computada utilizando o *software* DARwin 5 (PERRIER et al. 2003). Esta matriz foi utilizada para obter uma árvore (dendograma) de diversidade global, esperando-se assim identificar corretamente os diferentes acessos de *C. arabica*, segundo seus genótipos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os géis de acrilamida foram analisados e foi observado um total de 19 alelos, com uma média de 2,3 alelos por loco microssatélite. A variação alélica foi de 2 a 3 alelos por loco. A relação dos alelos encontrados e suas frequências absolutas e relativas constam na Tabela 3.

Tabela 3. Frequências alélicas encontradas nos 46 novos acessos de *C. arabica* introduzidos na coleção da Etiópia do IAPAR após análise com SSR.

Loco	Nº de Alelos	Frequência Absoluta				Frequência Relativa			
		a	b	c	Total	a	b	c	Total
270	2	46	46		92	0.5	0.5		1
350	2	23	46		69	0.3	0.7		1
414	2	30	46		79	0.4	0.6		1
503	2	46	46		92	0.5	0.5		1
514	2	46	46		92	0.5	0.5		1
260	3	9	38	45	92	0.09	0.41	0.5	1
501	3	46	46	46	130	0.3	0.3	0.3	1
512	3	2	29	46	77	0.03	0.37	0.6	1

De acordo com os dados encontrados anteriormente (Ferreira, 2010), apenas o loco 270 permaneceu apresentando 2 alelos distintos observados. Os demais locos (350, 414, 503, 514, 260 e 501) apresentaram, neste estudo, um número menor de alelos do que foi observado anteriormente. No entanto o alelo 512, que havia apresentado 2 alelos distintos no trabalho de seleção de marcadores polimórficos, apresentou neste estudo um alelo a mais, diferente dos anteriores. Os 17 genótipos de ET34 e os 27 genótipos de Java foram avaliados com os 8 locos microssatélites selecionados (Tabela 2) e apresentaram perfil eletroforético como o da Figura 1.

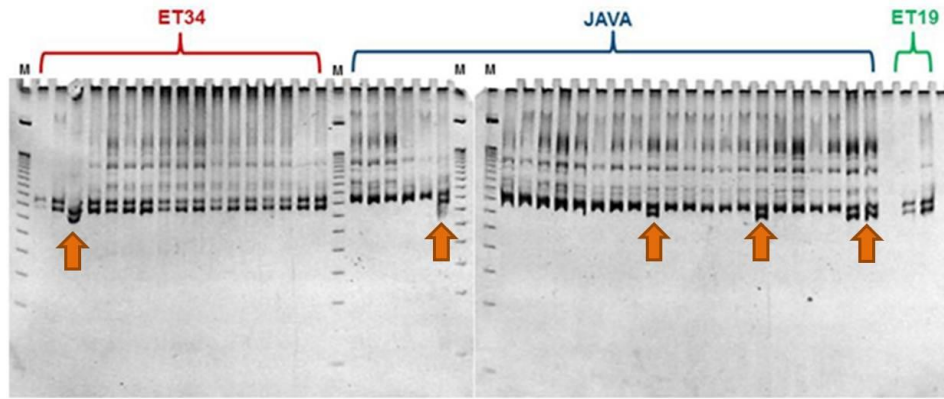


Figura 1. Perfil eletroforético dos acessos de *C. arabica* de Camarões para o loco 350. Em vermelho, os acessos etiquetados como ET34, em azul os etiquetados como Java e em verde os acessos identificados como ET19 (controle). M – Marcador de peso molecular. As setas indicam as contaminações de ET19 tanto em Et34 como em Java.

No perfil eletroforético para o loco microssatélite 350 observa-se que tanto nos acessos etiquetados como ET34 como nos etiquetados como Java há “contaminações” de ET19, ou seja, os alelos encontrados para o controle são os mesmos encontrados em ambos os genótipos etiquetados de maneira inadequada.

Com as informações obtidas de todos os alelos foi construído um dendograma para a verificação de diversidade entre os acessos analisados. Esperava-se 3 diferentes agrupamentos entre os acessos ET34, Java e ET19, o que foi observado (Figura 2). A análise genotípica dos diferentes locos microssatélite indicou quais acessos corresponderiam corretamente a ET34, Java ou ET19, já que este último teve o papel de controle, pois eram as únicas plantas onde não havia erro de identificação.

O dendograma gerado é apresentado na Figura 2. De acordo com as análises realizadas, em verde estão os acessos ET19, em vermelho os acessos ET34 e em azul os acessos Java. Observa-se que dos inicialmente 17 acessos ET34, 7 se agruparam com o controle ET19 e dos 27 acessos inicialmente Java, 3 estão no grupo com ET19. Portanto, dentre os acessos analisados, há somente 10 correspondentes ao genótipo ET34 e 24 correspondentes ao genótipo Java.

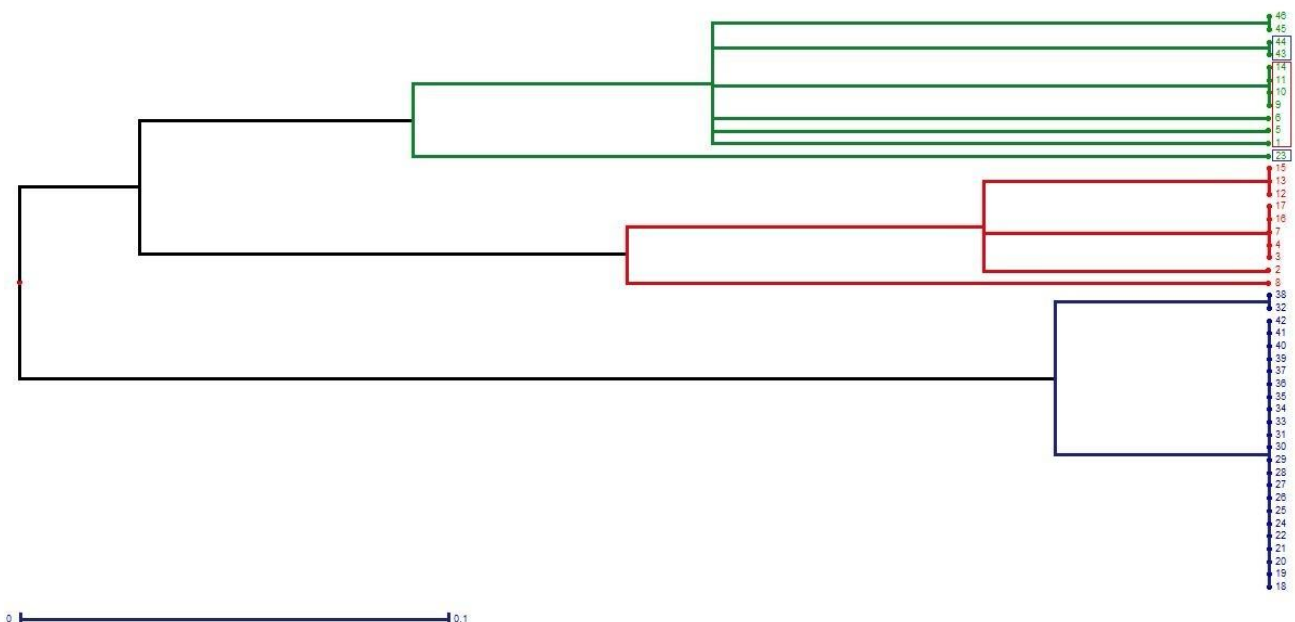


Figura 2. Estruturação da diversidade genética encontrada em 46 acessos de *C. arabica* proveniente de Camarões, obtida por marcadores microssatélites. No agrupamento verde, correspondente aos acessos ET19, os acessos destacados em azul tinham a classificação de Java; já os destacados em vermelho tinham a classificação de ET34.

O dendograma também revela que muitos acessos, tanto em ET19, ET34 e em Java, podem ser considerados clones de uma mesma planta. Observando a distribuição, tem-se 7 acessos de ET19, 4 acessos de ET34 e apenas 2 acessos de

Java. No total, portanto, houve a introdução de 13 novos acessos à coleção da Etiópia do IAPAR, provenientes da coleção da República de Camarões.

De acordo com Mittal e Dubey (2009), a diversidade genética pode ser avaliada com os marcadores microssatélites entre diferentes indivíduos da mesma espécie, como é o caso deste estudo. Assim, foi possível a discriminação dos grupos por este marcador. A discriminação, ou seja, a distinção de uma cultivar de outra é prática utilizada para proteger os direitos de propriedade intelectual de novas variedades por empresas comerciais (WANG et al., 2009). Isto foi demonstrado por Schuck et al. (2010) com a seleções de uva Goethe, visando atender aos requisitos de denominação de origem e indicação de procedência. No caso dos acessos estudados neste trabalho, não havia a necessidade destes requisitos, porém os marcadores microssatélites fizeram seu papel na distinção e correta discriminação de genótipos de cafeeiro.

CONCLUSÕES

Os 8 locos microssatélites utilizados foram suficientes e eficientes para discriminar os acessos de *C. arabica* provenientes de Camarões, entre os seus 3 genótipos.

Um total de 19 alelos foi observado, com uma média de 2,3 alelos por loco microssatélite.

Treze novos acessos, provenientes da coleção da República de Camarões, foram introduzidos na coleção de *C. arabica* da Etiópia alocada no IAPAR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus 12: 13-15,1990.

Ferreira, R.V. **Seleção de marcadores microssatélites polimórficos em *Coffea arabica*.** [Trabalho de Conclusão de Curso]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, 2010.

Lamas, N. S. **Desenvolvimento, caracterização e uso de marcadores microssatélites no mapeamento genético de características agronômicas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.).** [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília, 2010.

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. Mol. Gen. Genet 261: 259-266, 1999.

Mittal, N.; Dubey, A.K. **Microsatellite markers - A new practice of DNA based markers in molecular genetics.** Pharmacognosy Reviews 3, 6: 235-246, 2009.

Perrier, X., Flori, A., Bonnot, F. **Data analys methods. In Genetic diversity of cultivated tropical plants.** Science Publishers, Inc., Enfield, N. H. p. 43-76, 2003.

Schuck, M.R; Moreira, F.M.; Voltolini, J.A.; Guerra, M.P.; Grando, M.S.; Silva, A.L. **Identificação molecular da uva 'Goethe' de Urussanga-SC por marcadores microssatélites.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 32, n. 3, p. 825-831, 2010.

Wang, M.L.; Barkley, N.A. & Jenkins, T.M. **Microsatellite Markers in Plants and Insects. Part I: Applications of Biotechnology.** Genes, Genomes and Genomics, Vol.3, No.1, pp. 54-67, ISSN 1749-0383, 2009.