

OBTENÇÃO DE MAPA PARCIAL DE LIGAÇÃO GÊNICA EM *Coffea arabica* UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Guilherme Ferreira Pena¹; Alexandre Sandri Capucho²; Eveline Teixeira Caixeta³✉; Eunize Maciel Zambolim⁴; Ney Sussumu Sakiyama⁵ e Laércio Zambolim⁶.

Resumo

Um mapa parcial de ligação para *Coffea arabica* foi construído com marcadores SSR. Estes marcadores apresentam vantagens sobre outros por serem altamente polimórficos, co-dominantes e, por serem loco-específicos, permitem a integração futura de mapas parciais. Um total de 282 *primers* SSR foi analisado nos progenitores da população de mapeamento. Destes, 25 (8,87%) apresentaram polimorfismo e foram utilizados para amplificar o DNA das plantas da população F₂. Cinco marcas não se ligaram, enquanto os 20 se posicionaram em cinco grupos de ligação, cobrindo uma distância de 330,93cM. Apesar de todos os marcadores SSR disponíveis atualmente para o cafeeiro terem sido analisados, o mapa parcial obtido ainda se encontra pouco saturado. Para a construção de um mapa de ligação com ampla cobertura do genoma, marcadores AFLP serão incorporados ao mapa e este será integrado a outros. Os marcadores SSR mapeados são essenciais para a integração dos mapas.

Introdução

Os avanços na área de mapeamento genético molecular têm aumentado o entendimento da estrutura genômica, da genética e dos genes que controlam importantes características de interesse agrônomo de várias culturas. Apesar da reconhecida utilidade de mapas genéticos e da importância da cultura do café, especialmente para o Brasil, há pouca pesquisa desenvolvida para esta espécie. Em *Coffea arabica* L., a construção de mapas de ligação saturados tem sido dificultada pelo baixo nível de polimorfismos no germoplasma disponível e pela presença de poliploidia, que incluem o grande número de grupos de ligação, a detecção de locos múltiplos e a co-migração de fragmentos de diferentes locos. Uma estratégia para minimizar as dificuldades na construção de mapas de ligação com ampla cobertura do genoma para essa espécie é a construção de mapas parciais, utilizando-se diferentes *backgrounds* genéticos e posterior integração de tais mapas. Os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) são marcadores moleculares altamente polimórficos, co-dominantes, apresentam ampla cobertura do genoma e, por serem loco-específicos permitem a integração futura dos mapas parciais. Por essas características, os SSRs se mostram ferramentas úteis no processo de construção de mapas genéticos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi construir um mapa genético parcial para *C. arabica* utilizando marcadores microssatélites.

Material e Métodos

Foi realizada a extração do DNA genômico dos progenitores Híbrido de Timor UFV 443-3 e Catuaí Amarelo UFV 2148-57 e das 246 plantas da população F₂, originárias de autofecundação controlada. A extração seguiu o método de Diniz *et al.* (2005), com modificações.

Foram utilizados 282 *primers* SSR, sendo 158 disponibilizados na literatura (ROVELLI *et al.*, 2000; COMBES *et al.*, 2000), 109 desenvolvidos a partir das sequências do banco de dados do Projeto Brasileiro do Genoma Café e 15 de biblioteca genômica enriquecida, estes dois últimos desenvolvidos no Laboratório BioCafé/UFV. O processo de amplificação foi efetuado em termociclador modelo PTC-200, da *MJ Research*, utilizando o procedimento de *touchdown* PCR. As condições de

1. Estudante de mestrado, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28100-000. E-mail: penabio@yahoo.com.br

2. Estudante de doutorado, Departamento de Fitopatologia, UFV, sala 106, Viçosa, MG, CEP 36570-000. E-mail: alecapucho@yahoo.com.br

3. Pesquisadora da Embrapa Café, BIOAGRO, Lab. BioCafé, Viçosa, MG, CEP 36570-000. E-mail: eveline.caixeta@embrapa.br – autora para correspondência

4. Pesquisadora do Departamento de Fitopatologia, UFV, BIOAGRO, Lab. BioCafé, Viçosa, MG, CEP 36570-000. E-mail: eunize@ufv.br

5. Professor do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP 36570-000. E-mail: sakiyama@ufv.br

6. Professor do Departamento de Fitopatologia, UFV, lab. Proteção de Plantas Viçosa, MG, CEP 36570-000. E-mail: zambolim@ufv.br
Apoio financeiro: CNPq, FAPEMIG e CBP&D/Café.

amplificação foram as mesmas definidas por Rufino *et al.* (2005). Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata.

O mapa foi construído com o auxílio do programa GQMOL (CRUZ, 2007). O agrupamento dos marcadores foi feito adotando uma frequência de recombinação máxima de 0,40 e um LOD *score* mínimo de 3,0. Os valores obtidos pela frequência de recombinação foram apresentados em centimorgan (cM).

Resultados e Discussão

De 282 *primers* SSR avaliados, apenas 25 (8,87%) foram polimórficos entre os progenitores Híbrido de Timor UFV 443-3 e Catuaí Amarelo UFV 2148-57. O baixo polimorfismo obtido pode ser atribuído à base genética estreita de *C. arabica* (MALUF *et al.*, 2005). Prakash *et al.* (2004) encontraram polimorfismo em 18,75% dos *primers*, utilizando marcador AFLP. A população F₂ utilizada por estes autores é altamente contrastante, pois é proveniente de cruzamento interespecífico, *C. arabica* cultivar Matari e *C. liberica*, o que justifica o maior polimorfismo encontrado em seu trabalho. Oliveira *et al.* (2007), trabalhando com uma população de retrocruzamento derivada de Híbrido de Timor e Catuaí, utilizou marcadores RAPD para construir um mapa genético e observou polimorfismo em 10,58% dos *primers* analisados.

Os 25 *primers* SSR polimórficos foram utilizados para amplificar o genoma de toda a população F₂, constituída de 246 indivíduos. A segregação dos marcadores moleculares na população foi verificada utilizando o teste qui-quadrado (χ^2) a 5% de probabilidade, com uso da correção de Bonferroni (Tabela 1). Os marcadores denominados SSR100, SSRCa23 e AT21 apresentaram distorção na razão de segregação esperada, correspondendo a 12% de marcas distorcidas. Encontram-se na literatura trabalhos com café, em populações F₂, onde foi observada distorção em 24,85% das marcas, utilizando marcadores RAPD (LASHERMES *et al.*, 2001) e em 12% com marcadores AFLP (PAILLARD *et al.*, 1996). Em populações de retrocruzamento, foi encontrado 5,5% dos marcadores RAPD distorcidos (TEIXEIRA-CABRAL *et al.*, 2004) e, em outro trabalho, 24,72% dos marcadores RAPD (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Inicialmente foram construídos dois mapas, um contendo apenas as marcas que não apresentaram distorção de segregação e outro contendo todas as marcas, distorcidas e não distorcidas. Como não houve alteração na ordem e distância das marcas, foram utilizadas todas as marcas para a construção do mapa genético (Figura 1). Dessa forma, foi obtido um mapa parcial em que 20 marcas se posicionaram em cinco grupos de ligação, cobrindo uma distância de 330,93cM. Cinco marcas não se ligaram a nenhum grupo formado (SSR70, SSR16, SSR30, SSR95, AC02), o que corresponde a 20%. As marcas apresentaram-se bem distribuídas, considerando-se o pequeno número de marcadores utilizados.

A integração desse mapa parcial de *C. arabica* com outros pode torná-lo mais informativo e útil para análises genéticas de características de interesse agrônomo. Um mapa integrado pode trazer vantagens como aumento da densidade das marcas, melhor cobertura do genoma, redução do número de *gaps* e aumento do comprimento total do mapa. Por melhorar a cobertura do genoma, o mapa integrado aumenta a disponibilidade de marcadores para aplicações no melhoramento e na análise genética. Além disso, a integração de grande número de marcadores em um único mapa aumenta a oportunidade de encontrar marcas informativas em qualquer parte do genoma e em vários *backgrounds* genéticos.

Conclusões

O mapa parcial obtido ainda se encontra muito pouco saturado. No entanto, todos os marcadores microssatélites disponíveis atualmente para o cafeeiro foram analisados e apenas os 20 puderam ser mapeados. Para a construção de um mapa de ligação com ampla cobertura do genoma para *C. arabica*, marcadores AFLP serão incorporados ao mapa e este será integrado a outros mapas parciais. Os marcadores microssatélites mapeados são essenciais para a integração dos mapas.

Agradecimentos

Ao CNPq, FAPEMIG e CBP&D/Café pelo apoio financeiro.

Referências

COMBES, M.C.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; ROVELLI, P.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology*, v.9, p.1178-1180. 2000.

CRUZ, C.D. Programa QGMOL - Genética Quantitativa e Molecular. 2007. www.ufv.br/dbg/qgmol/qgmol.htm.

DINIZ, L.E.C.; SAKIYAMA, N.S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; ZAMBOLIM, E.M.; LOUREIRO, M.E.; PEREIRA, A.A.; ZAMBOLIM, L. Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.5, p.387-393. 2005.

MALUF, M.P.; SILVESTRINI, M.; RUGGIERO, L.M.D.C.; FILHO, O.G.; COLOMBO, C.A. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR markers systems. *Scientiae Agrícola*, v.62, p.366-373. 2005.

PRAKASH, N.S.; MARQUES, D.V.; VARZEA, V.M.P.; SILVA, M.C.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1311-1317. 2004.

ROVELLI, P.; METTULIO, R.; ANTHONY, F.; ANZUETO, F.; LASHERMES, P.; GRAZIOSI, G. Microsatellites in *Coffea arabica* L. pp. 123-133 In: *International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry*, Londrina (Resumos). 2000.

RUFINO, R.J.N., CAIXETA, E.T., PENA, G.F., ZAMBOLIM, E.M., ZAMBOLIM, L. & SAKIYAMA, N.S. A validação dos primers de Marcadores Microsatélites desenvolvidos e publicados na literatura para espécie *Coffea arabica*. pp. In: *Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil*, Londrina (Resumos). 2005.

Tabela 1. Valores de χ^2 e respectivas probabilidades obtidas da análise de segregação de 24 marcas moleculares na população F₂ originada da F₁ H 511-1, com utilização da correção de Bonferroni.

Marcador	Classes ^a						Hipótese	χ^2	Probabilidade (%) ^b
	0	1	2	3	4	9			
SSR45 ^c			77		168	1	3:1	5,40	2,014 ns
SSR70 ^c	53			188		5	3:1	1,16	28,080 ns
SSR100	99			146		1	3:1	31,02	0,000 *
AT12 ^c	60			184		2	3:1	0,02	88,247 ns
CCG3 ^c			60		186		3:1	0,05	82,520 ns
SSRCa23 ^c			173		70	3	3:1	276,54	0,000 *
SSR8	55	123	67			1	1:2:1	1,18	55,444 ns
SSR16	77	120	46			1	1:2:1	7,95	1,881 ns
SSR18	59	132	47			8	1:2:1	4,05	13,197 ns
SSR30	60	120	63			3	1:2:1	0,11	94,596 ns
SSR95	49	137	58			2	1:2:1	4,35	11,347 ns
AC01	79	104	63				1:2:1	7,95	1,877 ns
AC02	50	129	61			6	1:2:1	2,36	30,753 ns
AC09	36	127	71			12	1:2:1	12,18	0,227 ns
AT21	85	127	33			1	1:2:1	22,40	0,0014 *

AT25	65	121	60		1:2:1	0,27	87,446 ns
AAC03	52	120	63	11	1:2:1	1,14	56,661 ns
AAC12	66	130	50		1:2:1	2,88	23,716 ns
AAT9	68	124	54		1:2:1	1,61	44,714 ns
AAT10	49	148	48	1	1:2:1	10,62	0,493 ns
CCG5	52	127	66	1	1:2:1	1,93	38,087 ns
CCG15	54	129	60	3	1:2:1	1,22	54,275 ns
ACGG1	50	123	72	1	1:2:1	3,95	13,841 ns
ACTA13	83	110	52	1	1:2:1	10,39	0,553 ns
SSRCa52	64	134	48		1:2:1	4,05	13,207 ns

^a – Homozigoto para o Pai 1 (P1) recebeu código 0 (aa), ou seja, ausência da banda do P1 recebeu o código 0; não homozigoto para P1 (A_) ou presença de banda do P1, recebeu o código 3; homozigoto para o Pai 2 (P2) (bb) ou ausência da banda do P2 recebeu o código 2; não homozigoto para P2 (B_) ou presença de banda do P2, recebeu o código 4. As classes 0, 1 e 2 referem-se a marcas co-dominantes, 0 significa presença de fragmento do P1, 1 heterozigoto e 2 de fragmento do P2. A classe 9 significa dados perdidos; ^b ns - não significativo. * - significativo a 0,20%. ^c - Marcadores SSRs que segregaram como marcadores dominantes.

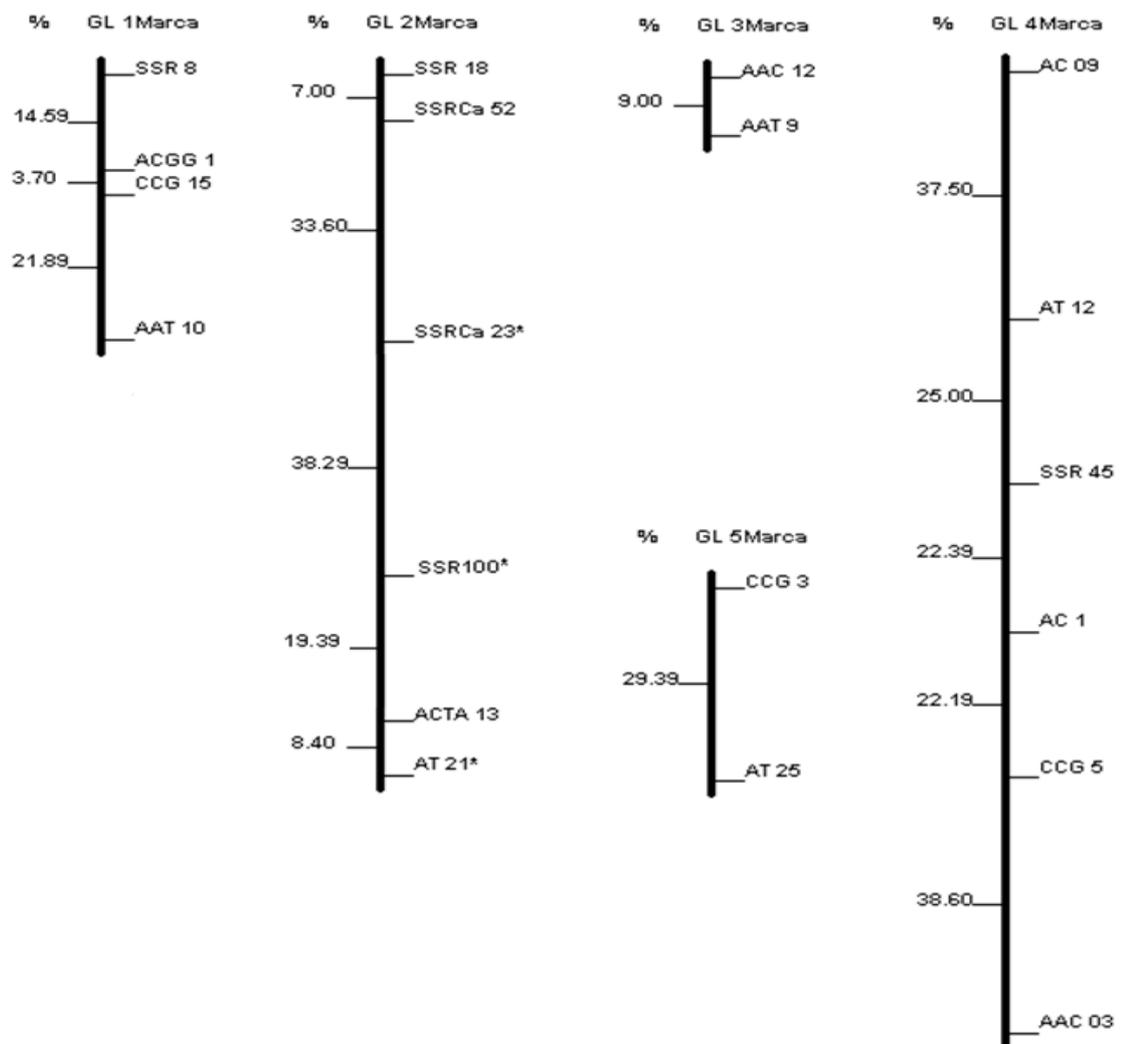


Figura 1. Mapa parcial de ligação genética do cafeeiro, construído com um LOD *score* mínimo de 3,0 e frequência de recombinação máxima de 0,40. *Marcas com distorção de segregação.