

## MICROSSATÉLITES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE *Coffea arabica*<sup>1</sup>

Gabriella Santos Pereira<sup>2</sup>, Rita de Kássia Siqueira Teixeira<sup>3</sup>, Édila Vilela de Resende Von Pinho<sup>4</sup>, Lilian Padilha<sup>5</sup>, Carlos Henrique Siqueira de Carvalho<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo Consórcio Pesquisa Café, CBP&D/Café. Apoio: Universidade Federal de Lavras/UFLA e Cnpq.

<sup>2</sup>Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas- UFLA, Lavras, MG, [gabipereira87@yahoo.com.br](mailto:gabipereira87@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Graduanda em Agronomia- UFLA, Bolsista CBP&D Café, Lavras, MG, [ritaadekassia@hotmail.com](mailto:ritaadekassia@hotmail.com)

<sup>4</sup>Professora, D.Sc., DAG/UFLA, Lavras, MG, [edila@dag.ufla.br](mailto:edila@dag.ufla.br)

<sup>5</sup>Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café, Brasília, DF, [lilian.padilha@embrapa.br](mailto:lilian.padilha@embrapa.br).

<sup>6</sup>Pesquisador, Ph.D., Embrapa Café, Brasília, DF, [carlos.carvalho@embrapa.br](mailto:carlos.carvalho@embrapa.br)

**RESUMO:** A caracterização de genótipos é importante tanto em bancos de germoplasma quanto para o registro de cultivares. Para a maioria das espécies, esta caracterização é realizada por meio de marcadores morfológicos que podem apresentar algumas limitações para distinção de cultivares de espécies como o cafeeiro que apresenta base genética estreita. Além disso, os marcadores morfológicos podem ser influenciados pelo ambiente, apresentar baixo grau de polimorfismo ou serem dependentes do estágio de desenvolvimento da planta. Os marcadores moleculares SSR podem ser uma alternativa para a identificação de cultivares de café por apresentarem ampla cobertura do genoma e, geralmente, elevado grau de polimorfismo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar 12 cultivares e três clones de café arábica utilizando marcadores SSR. Trinta e quatro locos SSR desenvolvidos a partir de etiquetas de sequências expressas (EST) disponíveis no Projeto do Genoma Café, e também outros três locos já publicados (Sat 225, Sat 229 e Sat259) foram utilizados neste estudo. Os locos LEG 11, LEG 13, LEG 29, LEG 26, LEG 32, P18 e SAT 225 foram polimórficos entre os genótipos e permitiram caracterizar as cultivares Acauã, IBC-Palma 2, Sabiá Tardio e Icatu Amarelo IAC 3282. No dendrograma gerado pelos marcadores SSR observou-se que a cultivar Acauã apresentou o menor índice de similaridade genética (0,88) em relação aos demais materiais envolvidos neste estudo, não sendo possível observar distância genética entre clone 3, Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Amarelo IAC 62, Catucaí Vermelho 2015 cv.476, Catucaí Amarelo 2015 cv.479, Mundo Novo IAC 376-4, Obatã e Paraíso. Pelas características de base genética estreita do cafeeiro se faz necessária a utilização de um maior número de locos SSR para a caracterização de todas as cultivares e clones deste estudo.

**Palavras-chaves:** Microssatélites. Registro de cultivares. Cafeeiro.

## *Coffea arabica* CHARACTERIZATION USING SSR MARKERS

**ABSTRACT:** Genotype characterization is important for both germplasm banks and commercial cultivars registration. For the majority of species this characterization process is performed by morphological markers that have some limitations to distinct cultivars in species such as coffee because of its narrow genetic base. Besides that, morphological markers may be affected by the environment, low polymorphism degree and plant development. SSR markers can be an alternative for coffee cultivar identification because they have a wide genome coverage and high polymorphism degree. The objective of this study was to characterize 12 cultivars and three clones of arabica coffee using SSR markers. Thirty four SSR loci that were developed by the EST-Brazilian Coffee Genome Project and other three published loci (Sat 225, Sat 229 and Sat 259) were evaluated. Loci LEG 11, LEG 13, LEG 29, LEG 26, LEG 32, P18 and SAT 225 showed polymorphism between genotypes and were able to distinguish Acauã, IBC-Palma 2, Sabiá Tardio and Icatu Amarelo IAC 3282 cultivars. In the dendrogram generated by SSR markers Acauã cultivar showed the lowest similarity index (0.88) when compared to the others. It was not possible to identify genetic distance among clone 3, Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Amarelo IAC 62, Catucaí Vermelho 2015 cv.476, Catucaí Amarelo 2015 cv.479, Mundo Novo IAC 376-4, Obatã e Paraíso. It was found that due to the narrow genetic base of coffee it is necessary a greater number of SSR loci to characterize all genotypes.

**Key words:** Microsatellites. Cultivars registration. Coffee.

## INTRODUÇÃO

Para a proteção e registro de cultivares tem sido utilizados principalmente os marcadores morfológicos como descritores mínimos (AGUIAR et al., 2004). Porém, esses marcadores apresentam algumas limitações, principalmente em espécies de base genética estreita, como *Coffea arabica* (ANTHONY et al., 2002), por apresentarem baixo grau de

polimorfismo, devido ao fato de serem influenciados pelo ambiente e muitos destes descritores serem expressos somente nas plantas adultas.

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites, ou SSR, sequências simples repetidas, são uma alternativa para a diferenciação de cultivares de café arábica, pois apresentam ampla cobertura do genoma (MORGANTE et al., 2002).

Os conjuntos de dados de ESTs (etiqueta de sequência expressa) associados a evolução de ferramentas de bioinformática permite a rápida identificação e o desenvolvimento de marcadores EST-SSR. Estas sequências apresentam uma alternativa para o desenvolvimento de *primers* SSR, para identificação de cultivares de café (PONCET et al., 2004).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de diferenciar genótipos de *C. arabica* por meio de marcadores moleculares do tipo EST- SSR e SSR.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Análise Sementes/Biotecnologia, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG.

**Genótipos:** Foram avaliados 15 genótipos de *C. arabica*, sendo 12 cultivares comerciais e três clones resistentes ao bicho-mineiro, obtidos junto à Fundação Procafé, Varginha, Mg. A genealogia dos materiais está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Genealogia de clones e cultivares de *C. arabica*. Varginha, MG.

Identificação	Cultivar	Genealogia
a	Clone 3	(Cruzamento inicial a partir de <i>C. arabica</i> x <i>C. racemosa</i> ) com 3 retrocruzamentos para <i>C. arabica</i> , estando em F <sub>4</sub>
b	Clone 12	(Cruzamento inicial a partir de <i>C. arabica</i> x <i>C. racemosa</i> ) com 3 retrocruzamentos para <i>C. arabica</i> , estando em F <sub>3</sub>
c	Clone 5	(Cruzamento inicial a partir de <i>C. arabica</i> x <i>C. racemosa</i> ) com 3 retrocruzamentos para <i>C. arabica</i> , estando em F <sub>3</sub>
d	Catuai Vermelho IAC 144	Caturra Amarelo (IAC 476-11) x Mundo Novo (IAC 374-19)
e	Mundo Novo IAC 376-4	Sumatra x Bourbon Vermelho
f	Sabiá Tardio	Catimor UFV 386 x Acaiaí
g	IBC-Palma 2	Catuai Vermelho IAC 81 x Catimor UFV 353
h	Catuai Vermelho 2015cv476	Icatu x Catuai
i	Catuai Amarelo 2015 cv479	Icatu x Catuai
j	Obatã Vermelho IAC 1669-20	(Vila Sarchi x Híbrido de Timor) x Catuai
k	Icatu Amarelo IAC 3282,	Icatu Vermelho x Bourbon amarelo ou Mundo Novo Amarelo
l	Bourbon Amarelo	Bourbon Vermelho x Amarelo de Botucatu
m	Acauã	Mundo Novo IAC 388-17 x Sarchimor (IAC 1668)
n	Catuai Amarelo IAC 62	Caturra Amarelo (IAC 476-11) x Mundo Novo (IAC 374-19)
o	Paraíso H 419-10-6-2-5-1	Catuai Amarelo IAC 30 x Híbrido do Timor UFV 445-46

**Extração do DNA:** O DNA foi extraído pelo método de CTAB 2 % proposto por Ferreira e Grattapaglia com algumas modificações (1996).

**Locos SSR:** Foram utilizados 34 *primers* desenvolvidos de sequências de cdna aleatórios do Banco de Dados do Genoma Café, além de três primers encontrados na literatura desenvolvidos de bibliotecas enriquecidas, Sat 225, Sat 229, Sat 259 (Herrera et al., 2009).

A avaliação dos produtos amplificados constou da observação da presença e da ausência de bandas, designadas, respectivamente, por 1 e 0. Foi construída uma matriz de 0 e 1 e a estimativa da similaridade genética (S<sub>gij</sub>) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 34 *primers* de EST-SSR avaliados, foi observada a amplificação de fragmentos em 22, sendo que em 17 destes não foi observado polimorfismo. Nos locos LEG 11, LEG 13, LEG 29, LEG 26, LEG 32 foi observado polimorfismo entre os materiais genéticos estudados. Também foi observado polimorfismo quando da utilização dos *primers* Sat 225 e P18. O número reduzido de locos SSR polimórficos para *C. arabica* também foi observado por Vieira et al. (2010). Os autores utilizaram 127 *primers* e apenas 22 foram polimórficos.

Pelo dendrograma obtido a partir dos marcadores SSR, foi observado menor valor de similaridade, 0,88, para a cultivar Acauã quando comparada aos demais genótipos. Um valor de 100% de similaridade foi observado para os genótipos clone 3, Catuai Vermelho IAC 144, Catuai Amarelo IAC 62, Catuai Vermelho 2015 cv.476, Catuai

Amarelo 2015 cv.479, Mundo Novo IAC 376-4, Obatã e Paraíso. Pelos dados de genealogia (Tabela 1), observa-se que cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 possui mesma genealogia que cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. Um dos parentais destas duas cultivares é uma seleção de Mundo Novo, o que explica a alta similaridade genética com a cultivar Mundo Novo IAC 376-4. As cultivares Catuaí Vermelho 2015 cv. 476 e Catuaí Amarelo 2015 cv. 479, por terem sido desenvolvidos a partir de um cruzamento entre Icatu e Catuaí, apresentaram alta similaridade genética entre si e também com as cultivares do grupo Catuaí. A cultivar Paraíso H419-10-6-2-5-1 foi desenvolvida de um genótipo do grupo Catuaí, o que explica a alta similaridade com as cultivares deste grupo nesta pesquisa e de um Híbrido do Timor, parental comum ao da cultivar Obatã Vermelho IAC 1669-20. Já Clone 3 foi retrocruzado com a cultivar do grupo Catuaí, explicando, assim, sua alta similaridade genética com estas cultivares.

Foi observada alta similaridade também entre Clone 3, Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho 2015 cv.476, Catuaí Amarelo 2015 cv.479, Mundo Novo IAC 376-4, Obatã e Paraíso e os genótipos Clone 5 e Clone 12 que, provavelmente, possuem, em suas genealogias, cultivares do grupo Catuaí e o Bourbon Amarelo, que é encontrado na genealogia de algumas cultivares do grupo Mundo Novo. A similaridade de 0,946 observada entre as cultivares Sabiá Tardio e IBC-Palma 2 pode indicar a presença dos materiais genéticos do Catimor UFV 386 e Catimor UFV 353 na composição destas cultivares, as quais são seleções de um mesmo cruzamento. As diferenças entre os clones resistentes ao bicho-mineiro observada no dendrograma pode ser explicada pelo fato de estes genótipos serem derivados de plantas de uma população que ainda segrega para várias características.

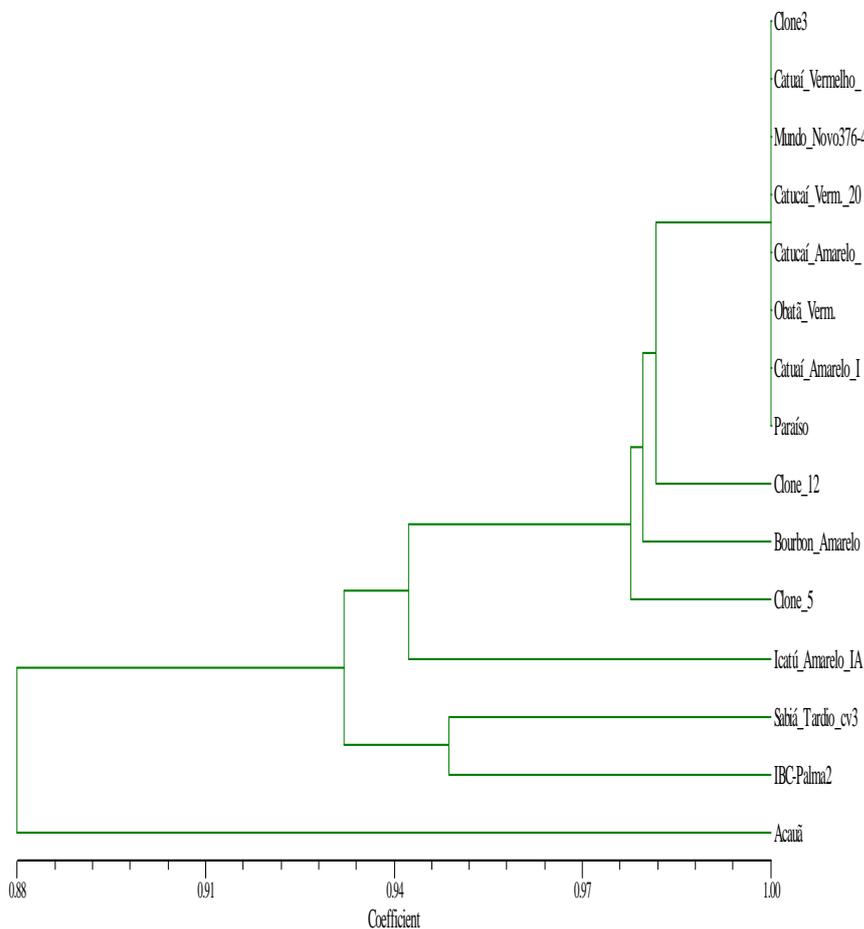


Figura 8 Dendrograma de 15 genótipos de *Coffea arabica* obtido pela análise de agrupamento UFGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores SSR. Lavras, MG, 2011.

Apesar da alta similaridade genética verificada entre os genótipos é importante ressaltar que muitos destes apresentam comportamento agrônomo diferenciado, sendo necessária a utilização de um maior número de *primers* para a caracterização de cultivares.

#### AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo apoio financeiro para participação no VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A. T. E. et al. Caracterização de cultivares de *Coffea arabica* mediante a utilização de descritores mínimos. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 179-192, abr. 2004.
- ANTHONY, F. et al. Detection by simple sequence repeat markers of introgression from *Coffea canephora* in *Coffea arabica* varieties. **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, n. 6, p. 542-544, Dec. 2002.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1996. 220 p.
- HERRERA J. C.P. et al. Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastrix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea Arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. **Euphytica**, Dordrecht, v. 167, n. 1, p. 57-67, May 2009.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellite are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, n. 2, p. 194-200, Feb. 2002.
- PONCET, V. et al. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea spp.*). **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 1071-1081, Dec. 2004.
- VIEIRA, E. S. N. et al. Development of microsatellite for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 507-514, June 2010.