

POLIMORFISMO DE LOCOS SSR E COEFICIENTE DE SIMILARIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES SEGREGANTES DE *C. arabica* X *C. canephora*

Regina H. G. PRIOLLI¹ e-mail: rpriolli@iac.sp.gov.br, Milene MÖLLER¹, Luís Carlos RAMOS¹, Maria I. ZUCCHI¹, Paulo MAZZAFERA², Carlos A. COLOMBO¹

¹Instituto Agrônomo-IAC, Campinas, SP, ²Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, SP.

Resumo:

O polimorfismo e segregação de locos microssatélites foram analisados em 148 indivíduos F₂ e 72 RC₁ de *C. arabica* X *C. canephora* no intuito de ser construído um mapa de ligação molecular. Quinze dos 17 locos analisados, totalizando 40 alelos foram validados para estudos de mapeamento. O coeficiente de similaridade genética (Jaccard) variou de 0,69 a 1,00 para o F₂ e 0,84 a 1,0 para o RC₁ com apenas dois perfis moleculares idênticos no F₂ e dois no RC₁. Estes resultados sugerem que há variabilidade genética suficiente dentro das populações segregantes para os estudos de mapeamento e conseqüente associação destes marcadores a caracteres de importância agrônômica.

Palavras-chave: Coffea, mapeamento, diversidade, híbridos interespecíficos, microssatélites

SSR POLIMORFISME AND COEFFICIENT OF GENETIC SIMILARITY IN COFFEA INTERSPECIFIC PROGENY (*C. arabica* X *C. canephora*)

Abstract:

Polymorphism and segregation of microsatellites loci have been analyzed in 148 F₂ and 72 RC₁ individuals of *C. arabica* X *C. canephora* in order to construct a molecular linkage map. Fifteen of 17 analyzed loci with 40 alleles had been validated for mapping studies. Coefficient of genetic similarity ranged of 0.69 to 1.00 in F₂ and 0.84 to 1.00 in RC₁ with only two situations of fingerprints in F₂ and two in the RC₁. These results suggest there is enough genetic variability in the segregant populations for mapping studies and consequent association of these markers to characters of agronomic importance.

Key-words: Coffea, linkage map, interespecific hybrids, diversity, microsatellites

Introdução

A produção dos cafeeiros brasileiros é bastante competitiva se comparada aos níveis dos demais países e este destaque em muito se deve ao trabalho de melhoramento genético que diversas instituições de pesquisa desenvolvem. Os métodos de melhoramento da cultura se baseiam principalmente na escolha de plantas matrizes em populações e conseqüentes análises de suas progênies, bem como na hibridação dentro ou entre espécies distintas. A espécie *C. arabica* é a que produz melhor bebida e hibridações interespecíficas são realizadas no intuito de transferir alguma característica encontrada em espécies diplóides para *C. arabica*, tetraplóide. Segundo Carvalho (1981) pode ser utilizado o híbrido triplóide no prosseguimento das hibridações de transferência das características desejadas; entretanto, resultados mais favoráveis foram obtidos com cafeeiros diplóides com número duplicado de cromossomos via colchicina. Assim, da hibridação de *C. canephora* 4n com *C. arabica*, obteve-se o híbrido Arabusta, que em retrocruzamentos sucessivos com *C. arabica* originaram as populações conhecidas como Icatu. Estas combinações apresentaram boa produtividade e resistência ao agente causador da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br). Também com o híbrido Arabusta, vêm sendo conduzidas desde 1999, autofecundações controladas para obtenção de população F₂, além do retrocruzamento deste F₁ com *C. arabica* cv Bourbon Vermelho, para obtenção de uma população RC₁. O objetivo neste caso é a construção de populações segregantes com suficiente nível de variabilidade para a realização de estudos de mapeamento genético em cafeeiros.

Dando continuidade a essa iniciativa, o Centro P&D de Recursos Genéticos do IAC iniciou em final de 2003 projeto de mapeamento genético a partir dessas populações, por meio de marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*). Os marcadores SSR são bastante úteis em estudos de mapeamento genético, pois são loco-específicos, geram grande número de alelos por loco e possuem caráter co-dominante. O polimorfismo de 11 locos SSRs desenvolvidos por Combes *et al.* (2000) foi estudado nas espécies *C. arabica* e *C. canephora*, sendo observados de 2 a 7 e de 2 a 10 alelos/loco nessas espécies, respectivamente. Rovelli *et al.* (2001) desenharam *primers* para 44 locos de microssatélites, mas detectaram polimorfismo em somente 13 em variedades pertencentes a *C. arabica*, observando de 2 a 5 alelos por loco. Alguns destes mesmos marcadores desenvolvidos já foram avaliados em quatro espécies do gênero *Coffea* pertencentes ao banco de germoplama do IAC, sendo observados de 1 a 4 alelos por loco (Colombo, comunicação pessoal). Poncet *et al.* (2004) avaliaram o polimorfismo de 110 locos SSRs em seis espécies diplóides de cafeeiro e observaram de 72,7% a 86,4% de sucesso de amplificação sugerindo uma boa taxa de transferência destes marcadores dentro do gênero *Coffea*.

Com o objetivo de validar locos SSR para estudos de mapeamento e avaliar a divergência genética das populações a serem mapeadas, foi determinado o nível de polimorfismo de 17 locos SSRs em populações F₂ e RC₁ entre *C. arabica* X *C. canephora*.

Material e Métodos

As populações utilizadas foram representadas por plantas F_2 e RC_1 obtidas a partir do cruzamento controlado entre *C. arabica* cv Bourbon Vermelho (P_1), *C. canephora* cv Robusta 4n (P_2) duplicado via colchicina e do híbrido tetraplóide (F_1) entre ambos, denominado H2460-10-1.

O DNA de cada planta foi isolado segundo o protocolo CTAB a partir de folhas jovens sendo sua qualidade e concentração estimada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

Dezessete pares de primers previamente desenvolvidos e publicados por Rondelli *et al* (2001) e Combes *et al* (2000) foram utilizados (Figura 1). As reações de amplificação foram realizadas em cada um dos genótipos, utilizando iniciadores específicos de cada loco. A reação foi realizada em um volume total de 15 μ L contendo cerca de 60ng do DNA, 0,5 μ M de cada iniciador 3' e 5', 200 μ M de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTP), solução tampão de PCR contendo 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9, 2,0 mM de $MgCl_2$ e uma unidade da enzima Taq DNA-polimerase. As concentrações de $MgCl_2$ assim como as temperaturas de pareamento foram modificadas em algumas reações de PCR a fim de se obter melhor amplificação, conforme pode ser observado na Figura 1. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC200 (MJ Research) programado para iniciar com 5 minutos a 95°C seguido por 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de pareamento variando de 52-60° C, 1 minuto de extensão a 72° C e 10 minutos a 72°C para extensão final.

Os produtos de amplificação foram separados sob condições desnaturantes em gel contendo 5% de poliacrilamida, 8 M de uréia e 1 X TBE em seqüenciador automático (ABI, modelo 377) por cerca de duas horas. De acordo com o funcionamento do equipamento, os sinais emitidos pela incidência do raio laser sobre os diferentes fluorocromos presentes nos iniciadores foram captados e convertidos em sinais na forma de eletroferograma. Por meio de programas computacionais específicos (GeneScan e Genotyper), os locos foram retidos para a realização de análises posteriores.

O coeficiente de similaridade de Jaccard estimado entre cada par de indivíduos F_2 e cada par de indivíduos RC_1 foi calculado pelo programa NTSYS versão 2.1 (Rohlf, 1993).

Resultados e Discussão

O polimorfismo dos parentais gerado pelos 17 locos SSR encontra-se resumido na Figura 1. O número de alelos por loco variou de 1 a 4. Apesar do nível tetraplóide dos parentais, 5 dos 17 locos apresentaram 2 alelos, 9 apresentaram três alelos e apenas um loco apresentou 4 alelos. Dois locos apresentaram-se monomórficos (4-1 CTG, E10-3CTG). Os 15 locos restantes apresentaram divergência nos parentais e os alelos esperados no F_1 , tendo sido retidos para estudos de mapeamento e conseqüente tipagem nas populações segregantes F_2 e RC_1 .

Marcadores microssatélites apresentam alto índice de polimorfismo sendo inclusive utilizados para identificação genotípica em muitas espécies de plantas, tais como soja (*Glycine max* L.) (Song *et al.*, 1999), uva (*Vitis vinifera* L.) (Thomas and Scott, 1993), canola (*Brassica napus* L.) (Kresovich *et al.*, 1995), maçã (*Brassica napus* L.) (Hokanson *et al.*, 1998), entre outras. Em *C. arabica*, o índice de polimorfismo encontrado tem sido relativamente baixo (2 a 5 alelos/loco), segundo Rovelli *et al.* (2001), embora este índice seja superior em espécies diplóides (2 a 10 alelos/loco), segundo Combes *et al.* (2001). Analisando 58 locos SSR nas espécies *C. canephora* e *C. pseudozanguebariae*. Poncet *et al* (2004) observaram um número máximo de 9 e 8 alelos nestas espécies, respectivamente. Os resultados ora apresentados no presente estudo com apenas 15 locos revelaram de 1 a 4 alelos/loco nas populações F_2 e RC_1 . Considerando que o parental *C. arabica* é autocompatível e que as populações são oriundas de hibridações interespecíficas com fortes barreiras de fertilidade, índices de polimorfismo inferiores aos de espécies originalmente diplóides seriam esperados.

Os coeficientes de similaridade entre os indivíduos da população F_2 apresentaram variação de 0,69 a 1,00 (Figura 2). Em apenas dois casos houve identidade de genótipos: indivíduos 24 = F_1 e 87=137 o que já poderia ser esperado, uma vez que os indivíduos F_2 são provenientes da autofecundação do F_1 . A divergência média encontrada entre os indivíduos da população F_2 foi de 0,15, resultado inferior ao valor de 0,25 esperado para o parentesco entre indivíduos de famílias de irmãos-germanos, revelando importante variabilidade para fins de mapeamento. Na população RC_1 (Figura 3), os coeficientes de similaridade foram superiores (0,84 a 1,00) aos da população F_2 , fato já aguardado, uma vez que todos os indivíduos tiveram um parental em comum. Entretanto, como observado em F_2 , em apenas duas situações foram observados indivíduos com o mesmo perfil molecular: $F_1 = 168 = 188 = 216$ e $209 = 234$.

Todos os alelos dos 15 locos avaliados nas populações F_2 e RC_1 apresentaram segregação condizente com a origem genética das plantas corroborando com as características morfológicas híbridas observadas em campo. Os resultados obtidos são promissores para a utilização destes locos em estudos de mapeamento para características divergentes de *C. arabica* e *C. canephora*.

Loco	Temp.de Pareamento	Concentração MgCl2	Número de Alelos	Tamanho (pb)	Indivíduos			
					BV2	BV3	CD	F1
41 CTG	58 °C	2,0 mM	1	100	1	1	1	1
17-2CTG	57 °C	2,5 mM	2	186	1	1	1	1
				198	1	1	0	1
E6-3CTG	58 °C	2,0 mM	2	325	1	1	0	1
				329	1	1	1	1
E12-3CTG	58 °C	2,0 mM	3	101	1	1	0	1
				131	1	1	1	1
				171	1	1	0	1
19-3CTG	52 °C	2,0 mM	2	184	1	1	0	1
				198	1	1	1	1
E10-3CTG	58 °C	2,0 mM	2	116	1	1	1	1
				118	1	1	1	1
M32	58 °C	2,0 mM	3	104	1	1	0	1
				108	0	0	1	1
				128	1	1	0	1
C2-2CATC	52 °C	2,0 mM	3	192	1	1	1	1
				198	0	0	1	1
				220	1	1	0	1
32-2CTG	58 °C	2,0 mM	3	104	1	1	0	1
				108	1	1	0	1
				110	0	0	1	1
E8-3CTG	52 °C	2,0 mM	3	177	1	1	0	1
				179	1	1	0	1
				181	0	0	1	1
M 3	56 °C	2,0 mM	2	269	1	1	0	1
				273	1	1	1	1
M 11	52 °C	2,0 mM	2	143	1	1	1	1
				145	1	1	0	1
M 20	52 °C	2,0 mM	3	283	0	0	1	1
				293	1	1	0	1
				312	1	1	0	1
M 25	56 °C	2,0 mM	2	178	1	1	1	1
				184	1	1	0	1
M 27	56 °C	2,0 mM	3	138	1	1	0	1
				142	1	1	0	1
				146	0	0	1	1
M 29	58 °C	2,0 mM	3	120	1	1	1	1
				126	1	1	0	1
				134	1	1	1	1
M 47	58 °C	2,0 mM	4	117	1	1	0	1
				129	0	0	1	1
				134	0	0	1	0
				151	1	1	0	1

Figura 1 – Padrões de ampliações de 17 locos SSR em *Coffea*

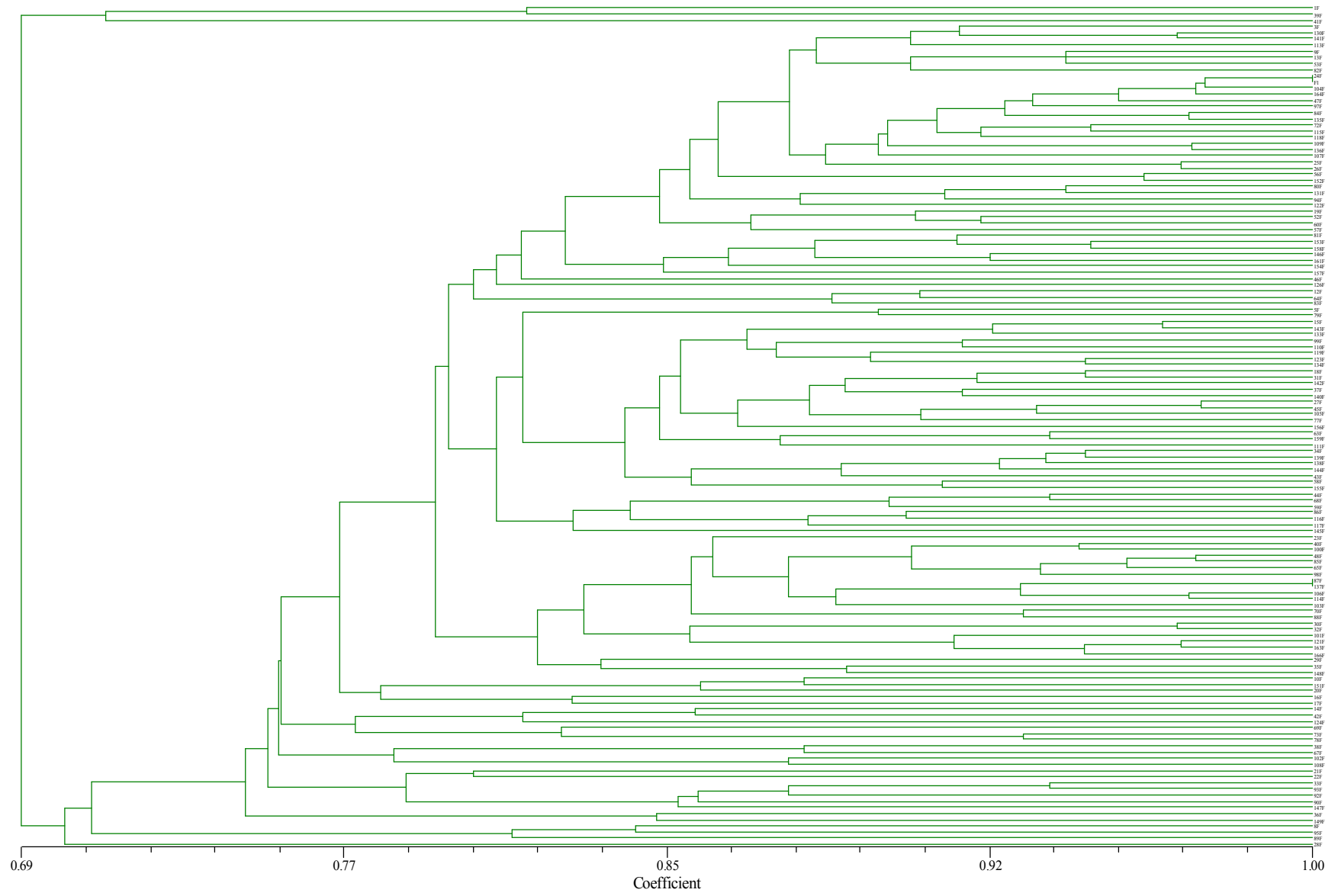


Figura 2 – Coeficientes de Similaridades entre individuos

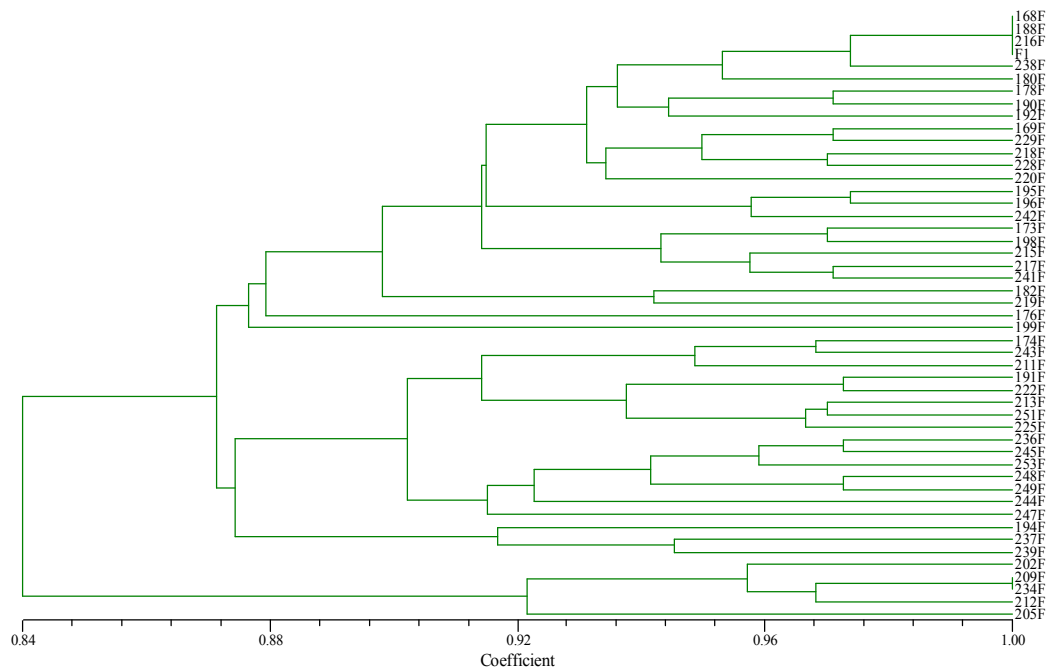


Figura 3 – Coeficientes de Similaridades entre indivíduos RC₁

Referências Bibliográficas

- Carvalho, A. (1981) Pesquisas sobre o melhoramento do cafeeiro In: Malavolta E, Yamada T, Guidolin (org) Nutrição e adubação do cafeeiro, POTAFOS, Piracicaba, pp11-20.
- Combes, M.C.; Andrzejewski, S.; Anthony, F.; Bertrand, B.; Rovelli, P.; Graziosi, G.; Lashermes, P.; (2000) Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related species. *Molecular Ecology*, 9: 1178-1180.
- Hokanson SC, Szewc-McFadden AK, Lamboy WF and McFerson JR (1998) Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity, and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. *Theor Appl Genet* 97:671-683
- Kresovich S, Szewc-McFadden AK and Bliet SM (1995) Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (Rapessed). *Theor Appl Genet* 91:206-211.
- Rovelli, P.; Mettullo, R.; Anthony, F.; Anzueto, F.; Lashermes, P.; Graziosi, G. (2001) Microsatellites in *Coffea arabica* L., In: Sera T, Soccol CR, Pandey A, Roussos S (eds) *Coffea* Biotechnology and Quality: Proceedings of the 3 rd International Seminar on Biotechnology in th Coffea Agroindustry, Londrina, Brazil. Kluser Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands., pp 123-133.
- Rohlf, J. F. (1993) Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York, Exeter Software. Version 2.10.
- Poncet, V.; Hamon, P.; Minier, J.; Carasco, C.; Hamon, S.; Noirot, M. (2004) SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.) *Genome* 47:1071-1081.
- Song QJ, Quigley CV, Nelson RL, Carter TE, Boerma HR, Strachan JR *et al.* (1999) A selected set of trinucleotide simple sequence repeat markers for soybean cultivar identification. *Plant Var Seeds* 12:207-220.
- Thomas MR and Scott NS (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STS). *Theor Appl Genet* 86:985-990.