

DIVERSIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.) AVALIADA POR MARCADORES MICROSSATÉLITES¹

Thamiris Bandoni Pereira²; Tesfahun Alemu Setotaw³; Dalíhnia Nazaré Santos⁴; Sônia Maria de Lima Salgado⁵; Ramiro Machado Rezende⁶; Antônio Nazareno Guimarães Mendes⁷; Gladyston Rodrigues Carvalho⁸

¹ Trabalho financiado pelo CNPq e INCT Café

² Doutora em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, thamirisbandoni@hotmail.com;

³ Pós-doutorando, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG, setotaw2006@gmail.com;

⁴ Pós-doutoranda, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG, dalilhnia@yahoo.com.br;

⁵ Pesquisadora EPAMIG, Unidade Regional Sul de Minas (URESMS), Lavras- MG, soniamaria@epamig.ufla.br;

⁶ Doutor em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG, ramiromr@globo.com;

⁷ Professor, D.Sc., Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG, nazareno.ufla@hotmail.com;

⁸ Pesquisador EPAMIG, Unidade Regional Sul de Minas (URESMS), Lavras- MG, carvalho@epamig.ufla.br

RESUMO: O programa de melhoramento genético do cafeeiro demanda alto custo e disponibilidade de tempo até o lançamento de cultivares, sendo a utilização de marcadores moleculares uma técnica auxiliar que pode permitir maiores ganhos em um menor intervalo de tempo. Objetivou-se com o presente estudo verificar a existência de diversidade genética em progênies de cafeeiro derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor e Catuaí utilizando marcadores microssatélites. Foram estudadas 82 progênies de cafeeiro em geração F₅, derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor 440-10 e Catuaí Amarelo IAC 86, juntamente com os parentais que foram utilizadas como testemunhas. Utilizou-se 44 pares de iniciadores microssatélites nas testemunhas, sendo que 11 apresentaram polimorfismo, com uma média de 4,5 alelos amplificados por marcador nas progênies estudadas. Pelo agrupamento UPGMA, verificou-se que as progênies foram agrupadas em três principais grupos, sendo os parentais inseridos em grupos distintos. Pela análise das coordenadas principais, verificou-se que as duas coordenadas explicaram 21,11% e 15,92% da diversidade genética das progênies.

PALAVRAS-CHAVE: Marcadores de DNA, SSR, Híbrido de Timor.

GENETIC DIVERSITY OF COFFEE PROGENIES (*Coffea arabica* L.) EVALUATED BY MICROSATELLITES MARKERS

ABSTRACT: The coffee breeding program demand high cost and time availability until the variety is released. But with the aid of molecular marker techniques it is possible to get more gain with the short period of time. This work was done with the objective of verifying the genetic diversity among the progenies of coffee Arabica derived from the crossing of Híbrido de Timor and Catuaí using microsatellite marker. In the study a total of 82 F₅ progenies derived from the crossing of Híbrido de Timor 440-10 and Catuaí Amarelo IAC 86 including the parental cultivars were evaluated. Forty-four primers of microsatellite marker were used on the parental cultivars to verify its polymorphism. Among 44 primers, 11 primers presented polymorphism with mean number of allele 4.5 per marker among the progenies studied. Using the UPGMA clustering analysis method the progenies were clustered into three groups and the parental cultivars were classified in distinct groups. The principal coordinate analysis showed similar trend as presented by UPGMA clustering, being the first two coordinates explained 21.11 and 15.92%, respectively.

KEYWORDS: DNA markers, SSR, Híbrido de Timor.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo. No ano de 2014, foram produzidos aproximadamente 32 milhões de sacas de *Coffea arabica* e 13 milhões de sacas de *Coffea canephora* (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

Um dos objetivos dos programas de melhoramento genético do cafeeiro é a obtenção de cultivares de *C. arabica* com boas características agrônomicas e resistentes às pragas e doenças. Com isso, o desenvolvimento de métodos alternativos que podem auxiliar nestes programas é de grande importância, visto que podem proporcionar maior eficiência, velocidade e direcionamento. Neste contexto, inserem-se os marcadores moleculares que oferecem uma série de vantagens, entre elas: estabilidade, redução no número de plantas testadas em comparação a seleções fenotípicas, detecção de variabilidade em todos os tecidos vegetais, independente da fase de desenvolvimento (AGARWAL et al., 2008) e ainda a não influência do ambiente, como os marcadores morfológicos. Estes marcadores podem se associar a características de interesse como produtividade, resistência a pragas e doenças, entre outros.

Entre os marcadores utilizados no cafeeiro estão os microssatélites, sequências de DNA constituídas de um a seis nucleotídeos que estão espalhados ao acaso no genoma com uma frequência relativamente alta (AKKAYA et al., 1992). Em relação a outras técnicas, os microssatélites ganharam considerável importância no melhoramento genético de plantas por apresentar alto polimorfismo no gênero *Coffea*.

Neste contexto, objetivou-se verificar a existência de diversidade genética em progênies de cafeeiro derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor e Catuaí, por meio de marcadores microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EPAMIG, localizado em Caldas-MG. Foram utilizadas 82 progênies de cafeeiro, em geração F₅, pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro conduzido em Minas Gerais, derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor 440-10 e Catuaí Amarelo IAC 86, juntamente com os parentais que foram utilizados como testemunha (CA- Catuaí Amarelo e HT- Híbrido de Timor). Para extração do DNA, utilizou-se a metodologia de Nunes et al. (2011).

Foram testados nas testemunhas, 44 pares de marcadores microssatélites indicados na literatura como polimórficos para *C. arabica*. As reações foram realizadas em termociclador em programa Touchdown- PCR e o produto da reação submetido a eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) 6%. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata, como descrito por Creste et al. (2001).

A fim de estudar a diversidade genética entre as progênies de cafeeiro foi estimado o coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando o programa estatístico GENES. Por meio do programa MEGA 6.06 e baseado na distância genética de Jaccard (1-coeficiente de similaridade de Jaccard), foi realizado o agrupamento das progênies pelo método de média aritmética não ponderada, UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic average*). A análise das coordenadas principais (PCoA) foi realizada pelo programa GenAlex 6.2, também baseado na distância genética de Jaccard.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De todos os pares de iniciadores utilizados nas testemunhas, apenas 11 apresentaram polimorfismo. Esse baixo polimorfismo em *C. arabica* é conhecido (BERTRAND et al., 2001), visto que a espécie possui base genética estreita, reprodução por autofecundação, tetraploidia (CRISTANCHO e ÁLVARO, 2008), baixa frequência de regiões de microssatélites no genoma (CRISTANCHO e ÁLVARO, 2008) e, nesse caso específico, todas as progênies são oriundas de apenas dois diferentes genitores. Baixo polimorfismo também foi relatado por Combes et al. (2000) os quais encontraram cinco marcadores microssatélites polimórficos em 11 testados em *C. arabica* e Cristancho e Álvaro (2008) que também observaram cinco marcadores microssatélites polimórficos em 12 testados em genótipos tetraploides de *Coffea*.

Observou-se entre 2 a 8 alelos polimórficos nas progênies F₅, sendo que cada marcador produziu, em média, 4,5 alelos polimórficos amplificados. Alguns desses marcadores apresentaram até 100% de polimorfismo, a exemplo do marcador SSR Café-14 (Tabela 1). Esses resultados demonstram que o número total de alelos polimórficos em uma população depende do seu tamanho, sua constituição genética e ainda dos diferentes marcadores microssatélites utilizados. Resultados com dimensões semelhantes são descritos por Missio et al. (2009) que verificaram média de 5,1 alelos polimórficos por marcador em cultivares de *Coffea*.

Tabela 1 Marcadores moleculares, número de alelos polimórficos obtidos e percentagem de polimorfismo nas progênies de *C. arabica*

Código	Marcador	Referência	Alelos	Polimorfismo (%)
SSRCafé 4	SSRCa087	Missio et al. (2009)	05	80,0
SSRCafé 13	CFGA792b	Cristancho e Álvaro (2008)	07	85,7
SSRCafé 14	CFCA281	Cristancho e Álvaro (2008)	04	100,0
SSRCafé 15	CFGA627	Cristancho e Álvaro (2008)	06	50,0
SSRCafé 19	CFCA360	Cristancho e Álvaro (2008)	03	66,0
SSRCafé 20	AJ250254	Combes et al. (2000)	04	100,0
SSRCafé 32	AJ308819	Rovelli et al. (2000)	04	100,0
SSRCafé 37	BQ448809	Rovelli et al. (2000)	04	75,0
SSRCafé 39	EU597602	López-Gartner et al. (2009)	02	100,0
SSRCafé 40	EU597603	López-Gartner et al. (2009)	07	100,0
SSRCafé 41	EU597604	López-Gartner et al. (2009)	08	100,0

O coeficiente de similaridade de Jaccard é um tipo de análise que visa comparar o número de presença de alelos comuns e o número total de alelos envolvidos, excluindo o número de ausências conjuntas. O método de agrupamento UPGMA, utilizando a distância genética de Jaccard, possibilitou estabelecer três principais grupos distintos, constatar que as

progênies apresentam alta dissimilaridade genética e ainda verificar que os marcadores microsatélites utilizados foram eficientes para separar as progênies.

As progênies que receberam os números 12 e 13 demonstraram a maior similaridade (Figura 1), ou seja, o maior número de alelos em comum. Ambas foram obtidas da seleção das mesmas plantas e devido à reprodução por autogamia, essas progênies possivelmente possuem alta homozigose, podendo até serem réplicas dentro da população, tendo em vista os alelos estudados.



Figura 1 Estimativa de dissimilaridade genética, por meio dos marcadores microsatélites, utilizando o método de agrupamento UPGMA

O grupo formado com o maior número de progênies foi o um, o qual se inseriu o Híbrido de Timor. Os germoplasmas utilizados como testemunha (Híbrido de Timor 440-10 e Catuaí IAC 86) foram agrupados em grupos distintos. Vale ressaltar que todas as progênies F₅ são derivadas do mesmo cruzamento, o que demonstra a grande divergência genética dos parentais, característica essa muito desejada em programas de melhoramento que objetivam aumento da base genética (MISSIO et al., 2009). Trabalhos de pesquisa relatam a eficiência dos marcadores moleculares microsatélites em diferenciar genótipos de *C. arabica* de Híbrido de Timor e seus cruzamentos (MISSIO et al., 2009; SETOTAW et al., 2010), fato também evidenciado neste estudo.

Em relação à análise das coordenadas principais (PCoA) as informações obtidas corroboram com os dados observados no dendrograma e exibem o relacionamento genético das populações e suas proximidades (Figura 2). Em geral, a maioria das progênies se aproximou do Híbrido de Timor, situando-se abaixo da coordenada dois. Enquanto a cultivar Catuaí Amarelo IAC 86 se posicionou de maneira isolada e dispersa das demais progênies.

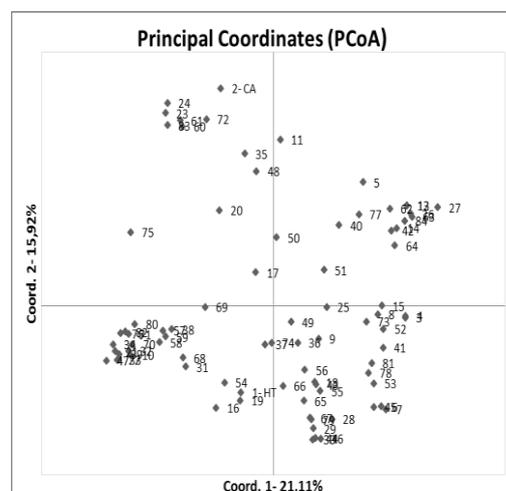


Figura 2 Análise das coordenadas principais por meio dos marcadores microsatélites, das 82 progênies de café juntamente com os parentais Catuaí Amarelo IAC 86 e Híbrido de Timor 440-10

A baixa percentagem de variabilidade explicada pelos eixos um e dois, respectivamente, de 21,11% e 15,92% indicou que as coordenadas principais foram capazes de explicar pequena parte da diversidade. Utilizando os marcadores microssatélites, AFLP e RAPD, Setotaw et al. (2010) por meio da análise das coordenadas principais explicaram 47,7% e 19,9% da variação total dos acessos de Híbrido de Timor, valor esse superior ao encontrado no presente estudo. Do mesmo modo, Souza et al. (2013) explicaram 19,1% e 5,8% do total da variabilidade do germoplasma *C. canephora* no Brasil utilizando marcadores microssatélites.

CONCLUSÕES

- ✓ Verificou-se por meio dos marcadores microssatélites que há diversidade genética nas progênes F₅ de cafeeiro.
- ✓ O agrupamento UPGMA permitiu a inserção das progênes em três principais grupos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa de doutorado à primeira autora, assim como ao Consórcio de Pesquisa Café, INCT e CNPq pelo apoio financeiro a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 617-631, 2008.
- AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, Austin, v. 132, p. 1131-1139, 1992.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Breeding for resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, p. 637-644, 2001.
- COMBES, M. S.; 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**, Oxford, v. 9, p. 1171-1193, 2000.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: safra 2014: quarta estimativa**. Brasília: CONAB, 2014.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, Atenas, v. 19, n. 4, p. 299-306, Aug. 2001.
- CRISTANCHO, M. A.; ÁLVARO, L. G. Isolation, characterization and amplification of simple sequence repeat loci in coffee. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 8, p. 321-329, 2008.
- LÓPEZ-GARTNER, G.; CORTINA, H.; MCCOUGH, S. R.; MONCADA, M. D. P. Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 5, p. 435-446, 2009.
- MISSIO, R. F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, S. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 573-581, 2009.
- NUNES, C. F.; FERREIRA, J. L.; FERNANDES, M. C. N.; BREVES, S. de S.; GENEROSO, A. L.; SOARES, B. D. F.; DIAS, M. S. C.; PASQUAL, M.; BOREM, A. CANÇADO, G. M. de A. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1383-1389, Aug. 2011.
- ROVELLI, P.; METTULIO, R.; ANTHONY, F.; ANZUETO, F.; LASHERMES, P.; GRAZIOSI, G. Microsatellites in *Coffea arabica* L. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 3., Londrina, 2000. **Proceedings...** Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 123-133.
- SETOTAW, T. A.; CAIXETA, E. T.; PENA, G. F.; ZAMBOLIM, E. M.; PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N.S. Breeding potential and genetic diversity of “Híbrido do Timor” coffee evaluated by molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 10, n. 4, p. 298-304, Dec. 2010.
- SOUZA, F. F.; CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; PENA, G. F.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ, C. D. Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 13, n. 4, p. 273-276, 2013.