

MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA O CAFEIEIRO

Raphael José Nascif RUFINO¹, Eveline Teixeira CAIXETA^{1,2}, Eunize Maciel ZAMBOLIM^{1,3}, Guilherme Ferreira PENA¹, Robson Ferreira de ALMEIDA¹; Samuel Mazinghy ALVARENGA¹; Laércio ZAMBOLIM³ e Ney Sussumu SAKIYAMA^{1,4}

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV)/BIOAGRO, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafê), Viçosa – MG. E – mail: biocafe@ufv.br; ²Embrapa Café; ³UFV/Depto de Fitopatologia; ⁴UFV/Depto de Fitotecnia.

RESUMO:

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de testar e adaptar marcadores microsatélites para serem rotineiramente utilizados nos trabalhos de genética e melhoramento do cafeeiro. Para isso, foram ajustadas as condições de amplificação de 24 *primers* microsatélites de café, disponibilizados na literatura. Estes *primers*, desenvolvidos para *Coffea arabica*, foram também testados em outras espécies de cafeeiro de importância para o melhoramento visando verificar sua utilidade como *primer* heterólogo. A adaptação das condições de reação e de amplificação permitiu o uso de 18 *primers*, sendo que a maioria deles amplificou as três espécies analisadas. O nível de polimorfismo desses microsatélites foi investigado pela amplificação de 60 genótipos, incluindo *C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugenioides* e Híbrido de Timor (HT). Observou-se um alto polimorfismo e uma variação de 2 a 9 alelos por marcador. Metade dos *primers* testados apresentou polimorfismo em *C. canephora* e 33,3% deles foram polimórficos entre os HT. Foi possível discriminar todos os acessos de *C. canephora* analisados. Os HT, em geral, apresentaram padrão de bandas semelhante ao dos *C. arabica*, sendo que seis *primers* apresentaram polimorfismo, possibilitando a discriminação de 13 acessos, não diferenciados em estudos anteriores com marcadores RAPD. Os resultados demonstraram o potencial dos microsatélites para diferenciar indivíduos geneticamente próximos. Em trabalhos futuros, pretende-se desenvolver novos microsatélites a partir das ESTs do Genoma/Cafê. Esses novos marcadores, juntamente com os *primers* adaptados neste trabalho, constituirão em uma importante ferramenta para os estudos genéticos do café no Brasil.

Palavras-chave: Microsatélites, SSR, marcadores moleculares, melhoramento do cafeeiro, *Coffea* sp.

MICROSATELLITE MARKERS FOR COFFEE TREE

The aim of this work was to test and adapt microsatellite markers for routine use in coffee genetic and breeding programs. For this, the amplification condition of twenty-four coffee microsatellites markers, previously described in the literature, was modified. These primers, developed for *Coffea arabica*, were tested here, as potential genetic markers to discriminate other coffee species and verify its applicability as cross-amplification primer. The optimization of the reaction and amplification conditions permitted the use of 18 primers, and the most of them amplified the three coffee species analyzed. The polymorphism level of these microsatellites was investigated by amplifying 60 genotypes, including *C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugenioides* and Híbrido de Timor (HT). It was observed a high polymorphism and the number of alleles per marker ranged from 2 to 9. Half of the tested primers showed polymorphism in *C. canephora* and 33.3% of them were polymorphic among the HT. It was possible to discriminate all the *C. canephora* accessions analyzed. The HTs, in general, presented patterns similar to the *C. arabica*. Six primers showed polymorphism, discriminating 13 accessions, which had not been differentiated in previous studies with RAPD markers. The results demonstrate the microsatellites potential to distinguish related coffee genotypes. In future works, we intend to develop new microsatellites using the Coffee Genome ESTs. These new markers associated with the primers adapted in this work will be an important tool for coffee genetic studies in Brazil.

Key words: Microsatellites, SSR, molecular markers, coffee breeding, *Coffea* sp.

INTRODUÇÃO:

No melhoramento genético, tem-se buscado, cada vez mais, a manipulação assistida por marcadores moleculares, visando obter maior eficiência na transferência de fatores genéticos. Dentre os marcadores moleculares atualmente disponíveis, os microsatélites ou SSRs (Simple Sequence Repeats) têm sido os mais utilizados devido a sua simplicidade técnica, rapidez, grande poder de resolução e altos níveis de polimorfismo. O alto polimorfismo possibilita uma discriminação precisa, mesmo entre indivíduos geneticamente relacionados. Os microsatélites também apresentam vantagens sobre os demais marcadores baseados em PCR, porque são co-dominantes e facilmente reprodutíveis, além de serem abundantes e uniformemente dispersos no genoma da planta. Essas características fazem desses marcadores moleculares ferramentas eficientes para mapeamento genético, estudos de ligação, identificação de genótipos, proteção de variedades, avaliação de pureza de sementes, utilização e conservação de germoplasma, estudos de diversidade, análise gênica e de locos

quantitativos, análise de pedigree, seleção assistida por marcadores e análise de bibliotecas para clonagem de genes. Apesar da comprovada eficiência desses marcadores, para o café, os SSRs não estão sendo largamente utilizados devido ao número limitado de *primers* desenvolvidos e disponibilizados para essa cultura. Portanto, no presente trabalho propõe-se testar e adaptar marcadores microssatélites para que possam ser rotineiramente incorporados nos trabalhos de genética e melhoramento do cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS:

Foram sintetizados 24 pares de *primers* microssatélites de café publicados na literatura (ROVELLI et al., 2000; COMBES et al., 2000). Para a adaptação desses *primers*, ajustaram-se, em duas etapas, diferentes condições de amplificação e diferentes concentrações dos componentes da reação de PCR.

1ª Etapa: testes preliminares

Os 24 pares de *primers* foram testados em seis genótipos, sendo dois cafeeiros da espécie *Coffea arabica*, dois de *C. canephora* e dois Híbridos de Timor (HT), que são híbridos naturais de *C. arabica* e *C. canephora*. Diferentes concentrações dos componentes da reação de PCR foram analisadas, incluindo concentrações e marcas comerciais de *taq* DNA polimerase, MgCl₂, dNTPs e *primers*. Para a amplificação no termociclador, foram avaliadas diferentes combinações de tempo e temperatura, incluindo *touchdown* PCR. Os produtos resultantes foram separados em gel de agarose 1,5%, corados com Brometo de Etídeo e visualização com UV. Nesta etapa, foram obtidas as condições para funcionamento da maioria dos *primers*.

2ª Etapa: testes complementares

As condições de reação e amplificação definidas na primeira etapa foram re-adaptadas, visando eliminar bandas fantasmas e amplificação ruim. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e corados com prata.

Definida as condições de PCR e selecionados os pares de *primers*, estes foram submetidos a teste de *primers* heterólogos e de nível de polimorfismo. A reação de PCR foi realizada em 20µl de solução contendo 50ng de DNA, 0,6 unidades de Taq DNA polimerase, tampão 1x, 1mM de MgCl₂, 150µM de cada dNTP e 0,1 µM de cada *primer*. A amplificação foi efetuada em termociclador utilizando-se o procedimento *touchdown* PCR. Este procedimento consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C, por 2 minutos, seguido de 13 ciclos com uma etapa de desnaturação a 94 °C, por 30 segundos, uma etapa de anelamento por 30 segundos, e extensão a 72 °C, por 30 segundos. A temperatura de anelamento foi de 67 °C a 55 °C, reduzindo 1 °C a cada ciclo. Após os 13 ciclos, procedeu-se mais 30 ciclos com desnaturação a 94 °C, anelamento de 55 °C e extensão de 72 °C, sendo 30 segundos cada etapa. Foi ainda incluída uma última etapa de extensão a 72 °C, por 8 minutos. Foram utilizados 60 genótipos de cafeeiros, incluindo seis acessos de *C. arabica*, cinco de *C. canephora*, um indivíduo da espécie *C. eugenoides* e 48 acessos de Híbridos de Timor. Folhas jovens dos cafeeiros foram coletadas, congeladas e liofilizadas. O DNA foi extraído utilizando método previamente adaptado no laboratório. Este método consiste em um protocolo de *miniprep* para extração de DNA do cafeeiro. A qualidade do DNA foi testada em gel de agarose e a quantificação foi realizada no espectrofotômetro Smart Spec da BioRad. O DNA purificado foi amplificado, segundo as condições previamente determinadas, separado em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizado por meio de coloração com prata.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A primeira condição testada para os 24 pares de *primers* foi exatamente a publicada por ROVELLI et al. (2000). Alguns desses *primers* não apresentaram bandas e vários outros bandas múltiplas (Fig. 1). A partir deste resultado, foram testadas diferentes concentrações dos componentes da reação de PCR e combinações de tempo e temperatura de amplificação. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados, inicialmente, em gel de agarose, para ajuste grosseiro da metodologia, e posteriormente, em gel de poliacrilamida. A otimização das condições de reação e de amplificação resultou na utilização de 18 *primers* que amplificaram bandas bem definidas (Fig. 2 e 3). Os outros seis *primers*, mesmo sob mudanças de condições de PCR, não apresentaram bandas ou amplificaram múltiplas bandas, sendo, portanto, descartados.

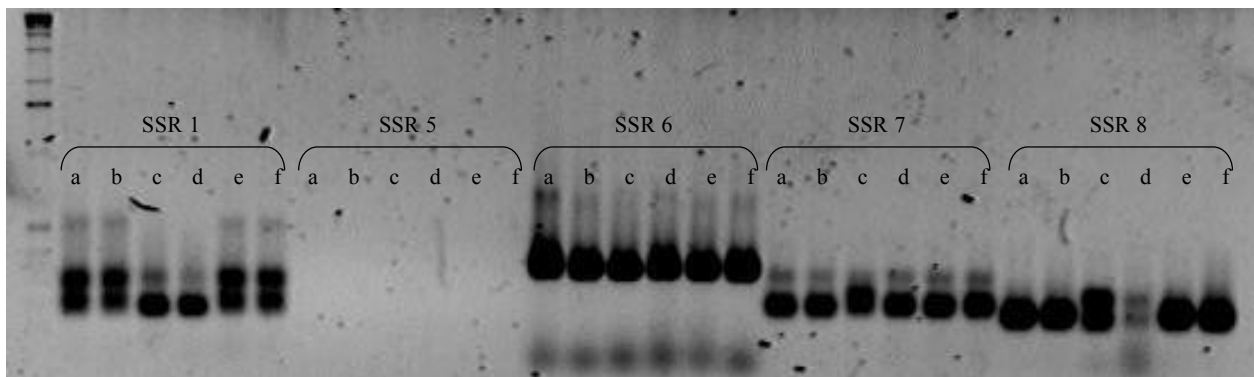


Figura 1. Análise eletroforética, em gel de agarose corado com solução de brometo de etídio, dos produtos amplificados com alguns *primers* de microssatélites. SSR 1, 5, 6, 7 e 8 correspondem aos diferentes *primers* testados. As letras a, b correspondem a dois genótipos de *Coffea arabica*; c, d, a dois genótipos de *C. canephora*; e, f, a dois genótipos de Híbrido de Timor.

Os 24 pares de *primers* microssatélite disponibilizados e desenvolvidos para amplificarem a espécie *C. arabica*, foram utilizados neste trabalho para testar genótipos de *C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugenoides* e Híbridos de Timor (híbridos naturais de *C. arabica* e *C. canephora*). Este teste foi realizado com o objetivo de verificar a utilidade desses marcadores como *primers* heterólogos para uso nas duas espécies cultivadas no Brasil e em espécies e híbridos interespecíficos de importância para o melhoramento. Dos 18 marcadores microssatélites validados, dois não amplificaram e um amplificou bandas múltiplas em cafeeiros *C. canephora*. Em *C. eugenoides*, não houve amplificação de apenas um *primer*. Este resultado demonstrou que a maioria dos *primers* heterólogos de microssatélites, 83,3% e 94,4% para *C. canephora* e *C. eugenoides*, respectivamente, foram eficientes para a análise de diferentes espécies cafeeiras. O uso de *primers* heterólogos associado à natureza de loco único desses marcadores de DNA garante a sua validação como conectores para uma futura consolidação de mapas genéticos e físicos e a associação desses mapas com fenótipos de interesse. Em particular, proporciona a oportunidade do uso de marcadores microssatélites para investigar a elevada gama de diversidade genética existente em espécies selvagens relacionadas, que são importantes para os programas de melhoramento do cafeeiro.

Os 18 *primers* foram submetidos a teste de eficiência e nível de polimorfismo. Estes marcadores apresentaram bandas monomórficas dentro dos seis genótipos de *C. arabica*, confirmando a base genética estreita desta espécie. No entanto, apresentaram alto polimorfismo entre os cinco acessos de *C. canephora*, sendo que nove pares de *primers* amplificaram bandas polimórficas, o que corresponde a 50,0% do total de *primers* testados. Exemplo de polimorfismo encontrado nos cafeeiros da espécie *C. canephora* está apresentados na Figura 2. Analisando os acessos de Híbrido de Timor (HT), observou-se que seis *primers* apresentaram bandas polimórficas, ou seja, 33,3% do total dos *primers*. A Figura 3 representa um gel de eletroforese contendo os produtos amplificados por um desses *primers*. O menor polimorfismo encontrado entre os HT, quando comparado aos genótipos de *C. canephora*, pode ser explicado pela sua provável origem. A designação de Híbrido de Timor é dada à descendência de um cafeeiro, com fenótipo semelhante ao de cafeeiros da espécie *C. arabica*, encontrado numa plantação do cultivar Típica na Ilha de Timor. A hipótese mais provável é que esta planta tenha se originado de uma hibridação natural entre *C. arabica* e *C. canephora*. Os descendentes desta planta, como os acessos de HT que foram usados no presente trabalho, são, provavelmente, provenientes de retrocruzamentos naturais para a espécie *C. arabica*. Dessa forma, estes genótipos apresentam maior proporção do genoma de *C. arabica* e, portanto, carregam a base genética estreita desta espécie. O nível de polimorfismo intermediário dos HT, encontrado com os microssatélites testados, apóia esta hipótese.

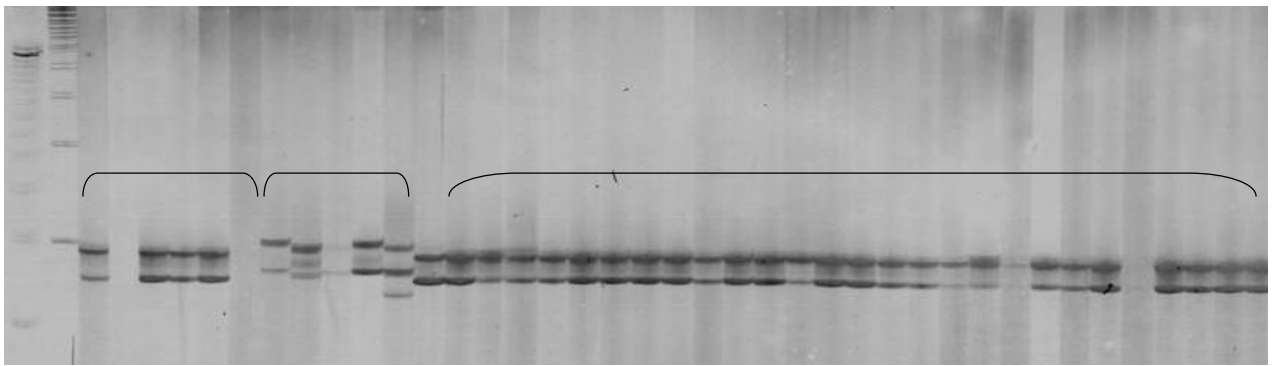


Figura 2. Perfil eletroforético, dos produtos amplificados com o *primer* SSR 8. Os seis primeiros genótipos são da espécie *C. arabica*, os cinco próximos são de *C. canephora*, e o seguinte a este é da espécie *C. eugenioides* (E) e os demais acessos de Híbridos de Timor. Exemplo de polimorfismo entre genótipos de *C. canephora*

Analisando conjuntamente os 60 genótipos, constituído de acesso das três espécies cafeeiras, observou-se um alto nível de polimorfismos dos marcadores microssatélites, sendo que todos os 18 pares de *primers* amplificaram bandas polimórficas. O número de alelos por par de *primer* variou de 2 a 9 (Tabela 1). A maioria dos marcadores apresentou um ou dois alelos por planta. O número de alelos por planta, provavelmente, está relacionado com a homozigose ou heterozigose, ou seja, as plantas que apresentaram um alelo são homozigotas, enquanto que as que apresentaram dois alelos são heterozigotas para o loco amplificado pelo marcador microssatélite. No entanto, os genótipos da espécie arábica e os HT são tetraplóides, sendo que o fato de terem dois alelos pode estar relacionado à ploidia e não a heterozigose. Alguns *primers* microssatélites amplificaram 3 e 4 alelos por planta em genótipos arábica e HT (Tabela 1), comprovando a natureza tetraplóide desses cafeeiros.

Usando o conjunto de marcadores microssatélites adaptados, foi possível discriminar todos os acessos de *C. canephora*. Os HT, de um modo geral, apresentam padrão de bandas semelhante ao dos *C. arabica* (Fig. 2), no entanto, seis *primers* apresentaram polimorfismo (Fig. 3), possibilitando a discriminação de 13 acessos. Os marcadores RAPD utilizados nesses mesmos genótipos, em estudos anteriores, não permitiram a discriminação de nenhum desses acessos. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram o potencial dos marcadores microssatélites em discriminar acessos de café geneticamente relacionados.

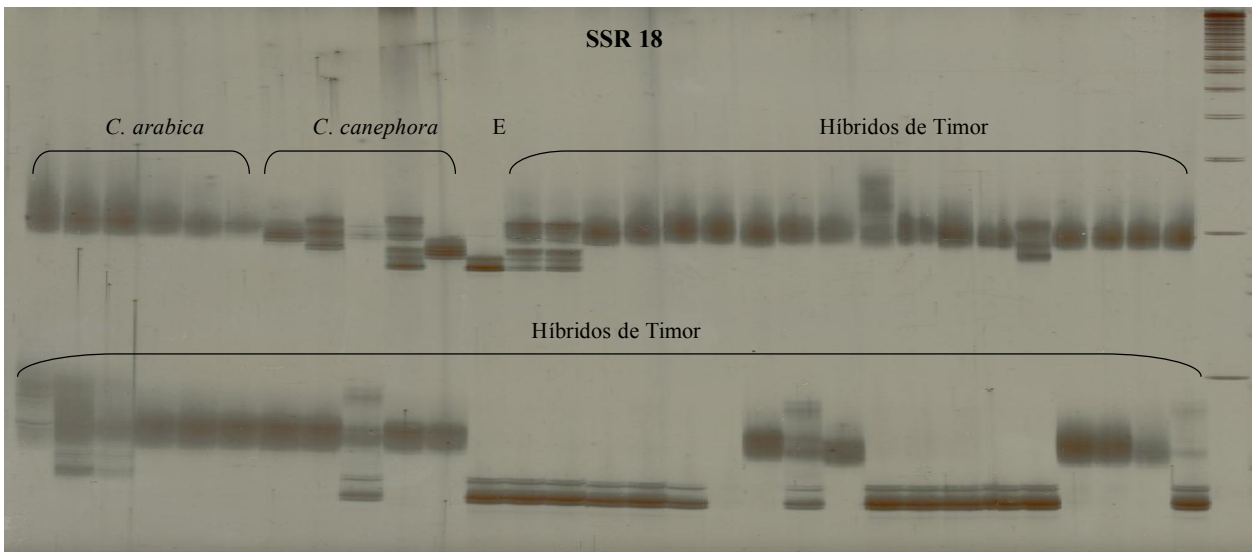


Figura 3. Perfil eletroforético, dos produtos amplificados com o *primer* SSR 18. Os seis primeiros genótipos são da espécie *C. arabica*, os próximos cinco são *C. canephora*, o genótipo seguinte é da espécie *C. eugenioides* (E) e os demais acessos de Híbridos de Timor. Exemplo de polimorfismo entre acessos de Híbrido de Timor

Tabela 1 – Marcadores microssatélites testados e número de alelos amplificados

Identificação	Referência	Número de alelos	Número de alelos/planta				Observação
			A ^a	C ^b	E ^c	HT ^d	
SSR 1	Rovelli et al., 2000	5	3	2	2	3	
SSR 2	Rovelli et al., 2000	2	1	-	1	1	
SSR 3	Rovelli et al., 2000	-	-	-	-	-	Descartado
SSR 4	Rovelli et al., 2000	-	-	-	-	-	Descartado
SSR 5	Rovelli et al., 2000	5	1	1 e 2	2	1	
SSR 6	Rovelli et al., 2000	2	2	-	2	2	
SSR 7	Rovelli et al., 2000	5	2	2	1	2	
SSR 8	Rovelli et al., 2000	6	2	2	1	2	
SSR 9	Rovelli et al., 2000	4	2	-	-	2	
SSR 10	Rovelli et al., 2000	-	-	-	-	-	Descartado
SSR 11	Rovelli et al., 2000	5	3	1	1	3	
SSR 12	Rovelli et al., 2000	-	-	-	-	-	Descartado
SSR 13	Rovelli et al., 2000	6	2	2	2	2	
SSR 14	Combes et al., 2000	-	-	-	-	-	Descartado
SSR 15	Combes et al., 2000	2	1	1	1	1	
SSR 16	Combes et al., 2000	3	1	1	1	1	
SSR 17	Combes et al., 2000	8	2	1 e 2	2	2 e 4	
SSR 18	Combes et al., 2000	8	1	1 e 2	1	1 e 2	
SSR 19	Combes et al., 2000	4	4	2	2	4	
SSR 20	Combes et al., 2000	4	2	1	2	2	
SSR 21	Combes et al., 2000	6	2	2	2	2	
SSR 22	Combes et al., 2000	-	-	-	-	-	Descartado
SSR 23	Combes et al., 2000	9	2	1 e 2	2	2	
SSR 24	Combes et al., 2000	8	2	1 e 2	1	2 e 3	

^a A corresponde aos genótipos de *C. arabica*;

^b C corresponde aos genótipos de *C. canephora*;

^c E corresponde ao genótipo de *C. eugenioides*;

^d HT corresponde aos genótipos de Híbrido de Timor.

CONCLUSÕES:

A adaptação das condições de reação e de amplificação dos 24 *primers* microssatélites permitiu a utilização de 18, que apresentaram bandas nítidas e bem definidas. A padronização desses marcadores é imprescindível para serem usados com eficiência em diferentes laboratórios. Uma vez adaptados e disponibilizados, esse marcadores poderão ser facilmente incorporados nos programas de melhoramento pela sua simplicidade e custo relativamente baixo. Apesar da sua grande importância, o número de *primers* microssatélites disponíveis para o café ainda é pequeno. Portanto, em trabalhos futuros, pretende-se desenvolver novos *primers* a partir das seqüências ESTs disponibilizadas pelo Projeto Genoma/Café. Esses novos marcadores, juntamente com os *primers* validados neste trabalho constituirão uma importante e eficiente ferramenta para os vários estudos genéticos do café no Brasil.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS:

- COMBES, M.C., ANDRZEJEWSKI, S., ANTHONY, F., BERTRAND, B., ROVELL, P., GRAZIOSI, G. SASSHERMES, P. Characterization of microsatellites loci in *Coffea arabica* and related coffee species. **Molecular Ecology**, v.9, p.1171-1193. 2000.
- ROVELL, P., METTULIO, R., ANTHONY, F., ANZUETO, F., LASSHERMES, P., GRAZIOSI, G. Microsatellites in *Coffea arabica* L. **Coffee Biotechnology and Quality**, Kluwer, Dordrecht, p. 123-133. 2000.