

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CAFEIEIRO POR MEIO DE MARCADORES EST-SSR

Robson F. MISSIO¹; Eveline T. CAIXETA^{1,2}; Ana P. RIBEIRO¹; Elisa F. MOURA¹; Eunize M. ZAMBOLIM^{1,3}; Laércio ZAMBOLIM⁴; Ney S. SAKIYAMA⁵

¹Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, Bioagro, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP 36570-000, E-mail: biocafe@ufv.br,;

²Pesquisadora da Embrapa Café, UFV, BIOAGRO, Lab. BioCafé, Viçosa, MG, CEP 36570-000; ³Pesquisadora do Departamento de Fitopatologia, UFV, BIOAGRO, Lab. BioCafé, Viçosa, MG, CEP 36570-000; ⁴Professor Titular do Departamento de Fitopatologia, UFV, Lab. Proteção de Plantas Viçosa, MG, CEP 36570-000; ⁵Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia, UFV, BIOAGRO, Lab. BioCafé, Viçosa, MG, CEP 36570-000; Apoio financeiro: CBP&D/Café e CNPq.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética entre diferentes genótipos de cafeeiro do programa de melhoramento genético da UFV/EPAMIG, por meio de marcadores EST-SSR. Foram avaliados 17 pares de *primers* SSR desenhados a partir das seqüências EST (*Expressed Sequence Tags*) do Projeto Brasileiro do Genoma Café. A diversidade genética foi avaliada por meio da análise de agrupamento UPGMA, gerado pela matriz de distância e similaridade genética de Jaccard. Os genótipos também foram agrupados, para avaliar a distância e diversidade entre e dentro das populações. Os 17 pares de *primers* EST-SSR apresentaram 100% de polimorfismo entre todos os genótipos avaliados, com um número médio de alelos por loco de 5,1. Embora grande parte das variedades cultivadas avaliadas neste trabalho descenderem de *C. arabica*, 35,29% dos *primers* testados apresentaram-se polimórficos entre as duas populações. Por meio da análise de agrupamento UPGMA foi possível separar os genótipos em grupos distintos. A maior fração da diversidade genética (64%) encontra-se entre as populações, enquanto 34% está entre os genótipos dentro das populações. Os marcadores EST-SSR apresentaram um elevado grau de polimorfismo entre os genótipos, tornando-os eficientes para o estudo da diversidade genética do cafeeiro. A utilização desta classe de marcadores possibilitou distinguir os diferentes genótipos estudados, inclusive, dentro das populações de *C. arabica*, a qual possui baixa variabilidade genética.

Palavras-chave: Marcadores de DNA, *Coffea*, Agrupamento UPGMA, Amova.

GENETIC DIVERSITY OF COFFEE BY EST-SSR MARKERS

Abstract:

This work was done with the objective of studying the genetic diversity of coffee genotypes of the genetic improvement program of UFV/EPAMIG with the aid of molecular marker EST-SSR. Seventeen pairs of primers SSR designed from the EST sequence (*Expressed Sequence Tags*) of the Genome Project of Coffee of Brazil were evaluated. The genetic diversity was evaluated with the aid of analysis of clustering UPGMA, formed by distance matrix and Jaccard genetic similarity index. The genotypes also grouped to evaluate the genetic distance and diversity between and within populations. Those 17 EST-SSR primers tested showed 100% polymorphism in all the genotypes evaluated, with the mean number of allele polymorphism of 5.1. Although the large number of varieties evaluated in this experiment was descendent do *C. arabica*, 35.29% of the primers tested showed polymorphism between the two populations. Using analysis of clustering UPGMA genotypes grouped into distinct groups. The major fraction of genetic diversity (64%) was found between populations, while 34% was among genotypes with in populations. Those markers EST-SSR revealed high degree of polymorphism between genotypes, showed the efficiency of the markers to study the genetic diversity in coffee. The utilization of these classes of markers made possible distinguish different genotypes studied, including with in the populations of *C. arabica*, which considered having low genetic variability.

Key words: DNA markers, *Coffea*, UPGMA grouping, Amova.

Introdução

O gênero *Coffea* é constituído por aproximadamente 100 espécies até então identificadas, sendo *Coffea arabica* L. a mais importante comercialmente. O programa de melhoramento genético desta espécie é limitado, devido a sua estreita base genética e sua susceptibilidade às principais doenças. Portanto, a utilização de marcadores moleculares para estudos da diversidade genética, orientações de cruzamentos e mapeamento genético, tornou-se uma ferramenta indispensável para os melhoristas. No melhoramento genético do cafeeiro, diferentes tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados, como RAPD, AFLP, RFLP e SSR (Lashermes et al., 2001, Combes et al., 2000, Teixeira-Cabral et al., 2004, Diniz et al., 2005, Maluf et al., 2005), os quais são aplicados para as mais diversas finalidades. Entretanto, com o grande avanço nos projetos de sequenciamento genético estão surgindo novas classes de marcadores moleculares, dentre eles destacam-se os EST-SSR, o qual pode ser de grande utilidade para espécies como o cafeeiro que ainda não possuem grande quantidade de marcadores disponíveis para estudos genéticos. Os marcadores EST-SSR são assim chamados por serem marcadores microsatélites (SSR) desenvolvidos a partir de seqüências EST (*Expressed Sequence Tags*) geradas pelos projetos de sequenciamento.

Dessa forma, a localização e o desenho dos *primers* SSR são realizados rapidamente e com baixo custo por meio de programas computacionais que identificam seqüências ESTs contendo SSR.

O banco de germoplasma da UFV/EPAMIG possui vários acessos do gênero *Coffea*. Caracterizar e estudar a diversidade genética deste material é de suma importância para o programa de melhoramento. Uma metodologia hoje disponível e que apresenta grande potencial para auxiliar este estudo são os marcadores moleculares. Estes marcadores possibilitam distinguir genótipos proximamente relacionados, permitindo assim uma maior eficiência e orientação em futuros cruzamentos e estudos genéticos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética entre genótipos de cafeeiro do programa de melhoramento genético da UFV/EPAMIG, por meio de marcadores EST-SSR.

Material e Métodos

Material genético

Foram analisados 24 genótipos de cafeeiro, incluindo 6 genótipos de *C. arabica*, 5 de *C. canephora*, 3 Híbridos de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*), 3 genótipos Triplóides (*C. arabica* x *C. racemosa*), 1 *C. racemosa* e 6 variedades cultivadas, pertencentes ao programa de melhoramento genético da UFV/EPAMIG (Tabela 1).

Análise de microssatélite (SSR)

O DNA foi extraído de folhas jovens, seguindo o protocolo descrito por Diniz et al. (2005). A qualidade do DNA foi testada em gel de agarose e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro Smart Spec da BioRad.

Os 17 pares de *primers* de microssatélites utilizados neste estudo foram desenhados das seqüências EST (Expressed Sequence Tags) do Projeto Brasileiro do Genoma Café. A reação de PCR foi realizada em um volume de 20µl contendo 50ng de DNA, 0,6 unidades de Taq DNA polimerase, tampão 1x, 1mM de MgCl₂, 150µM de cada dNTP e 0,1µM de cada *primer*. A amplificação foi efetuada em termociclador utilizando-se o procedimento *touchdown* PCR, o qual consistiu em uma etapa de desnaturação 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. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizado por meio de coloração com prata.

Análise estatística

Na avaliação dos géis, cada banda foi tratada como um caráter único, sendo a presença da banda designada por 1 e a ausência por 0 (zero). Apesar do marcador microssatélite ser codominante, as análises moleculares dos lócus foram realizadas baseada na presença/ausência de cada fragmento amplificado, devido a natureza alotetraplóide de *C. arabica*.

De posse desses dados, foi construída uma matriz de 0 e 1. A distância genética foi calculada aos pares, utilizando-se o índice de similaridade de Jaccard. A representação simplificada das distâncias genéticas foi efetuada por meio de dendrograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não-ponderados (UPGMA), com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2006). Além da análise da diversidade ao nível de genótipos, os mesmos foram também agrupados em cinco populações: (1) indivíduos da espécie *C. arabica*; (2) indivíduos da espécie *C. canephora*; (3) acessos de Híbrido de Timor; (4) indivíduos Triplóides e (5) Variedades cultivadas. A matriz de distância e identidade genética foi obtida pelo coeficiente de Nei (1978), com o auxílio do software PopGene versão 1.3 (Yeh e Boyle, 1997). Uma análise de variância dos dados moleculares (Amove) foi realizada com auxílio do programa GENES, segundo Excoffier et al (1992), com o objetivo de quantificar a variação genética contida entre e dentro das populações.

Tabela 1 – Descrição dos 24 genótipos de cafeeiro utilizados para o estudo da diversidade genética.

Número	Genótipos	Número	Genótipos
1 ^{CA}	Catuaí Vermelho UFV 2144	131 ^T	UFV 557-2
3 ^{CA}	Típica c117 UFV 2945	132 ^T	UFV 557-3
4 ^{CA}	Bourbon Amarelo UFV 2952	133 ^T	UFV 557-4
5 ^{CA}	Bourbon Vermelho UFV 535-1	134 ^{CA}	Típica Cv.113, acesso 832
6 ^{CC}	Conillon 3751	135 ^{CA}	Bourbon Amarelo IAC.JC, acesso 745
7 ^{CC}	Conillon 3580	136 ^{CR}	<i>Coffea racemosa</i>
8 ^{CC}	Guarini 513	137 ^V	Catiguá MG2
9 ^{CC}	Guarini 514	138 ^V	IAPAR 59
10 ^{CC}	Robusta C2258	139 ^V	Oeiras MG6851
13 ^{HT}	CIFC 832/2	140 ^V	Sacramento MG1
14 ^{HT}	CIFC 4106	141 ^V	Catuaí Amarelo 2SL
15 ^{HT}	CIFC 1343/269	142 ^V	Obatã Amarelo 4932

^{CA} *Coffea arabica*; ^{CC} *Coffea canephora*; ^{HT} Híbrido de Timor; ^T Triplóides; ^{CR} *Coffea racemosa*; ^V Variedades cultivadas.

Resultados e Discussão

Os 17 pares de *primers* EST-SSR apresentaram 100% de polimorfismo entre todos os genótipos avaliados, indicando elevado potencial destes marcadores para estudos da diversidade genética do cafeeiro. Os maiores graus de polimorfismo foram encontrados dentro dos genótipos de *C. canephora* (88,23%) e variedades cultivadas (35,29%). Por outro lado, o menor grau de polimorfismo (11,76%) foi encontrado dentro dos genótipos de *C. arabica* (Tabela 2). Em média, cada par de *primer* EST-SSR apresentou 5,1 alelos por loco.

Todos os pares de *primers* foram capazes de detectar diferenças genéticas entre as populações de *C. arabica* e *C. canephora*, assim como entre *C. canephora* e as demais populações (Tabela 2). Este fato deve-se principalmente pela natureza reprodutiva (polinização cruzada) da espécie *C. canephora*, a qual gera grande variabilidade genética. 29,41% dos *primers* permitiram distinguir as populações de *C. arabica* dos Híbridos de Timor. Embora grande parte das variedades cultivadas avaliadas neste trabalho, descenderem de *C. arabica*, 35,29% dos *primers* testados apresentaram-se polimórficos entre as duas populações, indicando a importância do uso desta classe de marcadores moleculares para este tipo de estudo.

Tabela 2 – Porcentagem de locos polimórficos (PLP) entre (fora da diagonal) e dentro (na diagonal) das populações.

Populações	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>	Híbrido de Timor	Triplóides	Variedades cultivadas
<i>C. arabica</i>	11,76	100,00	29,41	47,06	35,29
<i>C. canephora</i>		88,23	100,00	100,00	100,00
Híbrido de Timor			23,53	58,82	47,06
Triplóides				23,53	52,94
Variedades cultivadas					35,29

O dendrograma gerado pela matriz de similaridade genética de Jaccard (Figura 1), considerando todos os genótipos individualmente, gerou quatro grupos distintos. O grupo I, contendo os genótipos de *C. arabica* (CA), as Variedades cultivadas (V), os Híbridos de Timor (HT) e os genótipos Triplóides (T); o grupo II, com um indivíduo de *C. racemosa* (CR); o grupo III, contendo 4 genótipos (Conillon e Guarini) de *C. canephora* (CC) e o grupo IV, contendo o genótipo Robusta C2258 de *C. canephora* (CC). O grupo I foi subdividido em três grupos: a) contendo os genótipos de *C. arabica*, os Híbridos de Timor e 5 Variedades cultivadas; b) contendo os genótipos Triplóides; e c) contendo a variedade Catiguá MG2.

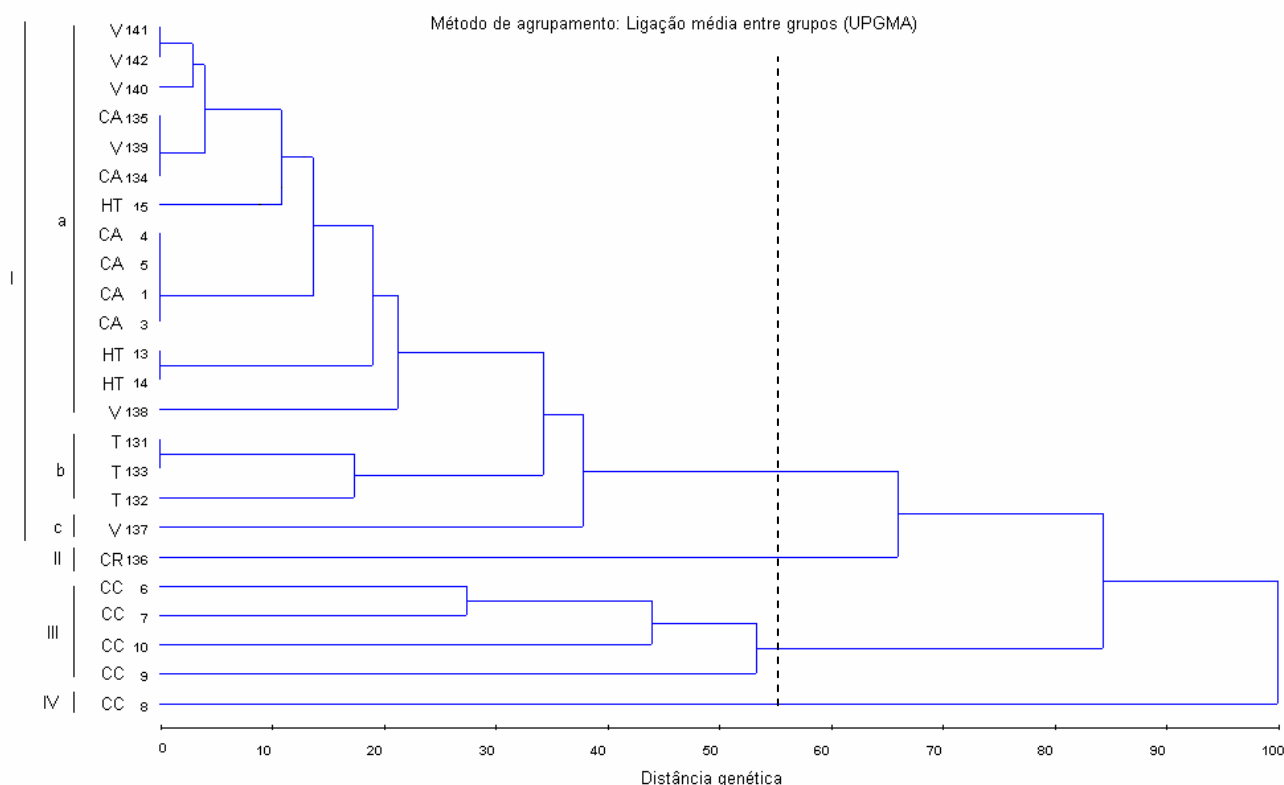


Figura 1 – Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas expressas em complementos de Jaccard, estimadas entre os 24 genótipos de cafeeiro, baseadas em marcadores EST-SSR.

A maioria das variedades, exceto a variedade Catinguá MG2, está mais próxima geneticamente dos genótipos de *C. arabica*. Os indivíduos Triplóides (com o número básico de cromossomos triplicados) formaram um grupo intermediário entre os genótipos tetraplóides (*C. arabica*, Híbridos de Timor e Variedades cultivadas) e os genótipos diplóides (*C. canephora*).

Pelo dendrograma (Figura 1) é possível identificar Híbridos de Timor mais próximos e mais distantes dos genótipos de *C. arabica*. Este fato é de suma importância para programas de melhoramento que visam incorporar um ou alguns genes de resistência à doença de *C. canephora* e manter as demais características de *C. arabica*. Para isso, deve-se escolher o acesso do Híbrido de Timor mais próximo geneticamente de *C. arabica*. Entretanto, quando a prioridade é aumentar a base genética do programa de melhoramento, o uso de genitores divergentes geneticamente torna-se mais apropriado.

Analisando os genótipos agrupados por populações (Tabela 3 e Figura 2), verifica-se que as Variedades cultivadas e os Híbridos de Timor apresentaram alta similaridade genética com os genótipos de *C. arabica*, indicando que a constituição genética destes indivíduos são bastante semelhantes.

Para estudar a diversidade genética entre e dentro das populações, foi realizada uma análise de variância molecular (Amova), segundo Excoffier et al (1992). Os resultados apontam que aproximadamente 64% da variação genética encontram-se entre as populações, enquanto que 34% está dentro das populações.

Tabela 3 – Medidas de distância genética (baixo da diagonal) e identidade genética (acima da diagonal).

Populações	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>	Híbrido de Timor	Triplóides	Variedades
<i>C. arabica</i>	0	0,689	0,944	0,893	0,957
<i>C. canephora</i>	0,372	0	0,689	0,599	0,710
Híbrido de Timor	0,057	0,373	0	0,842	0,930
Triplóides	0,113	0,513	0,172	0	0,873
Variedades	0,044	0,343	0,072	0,136	0

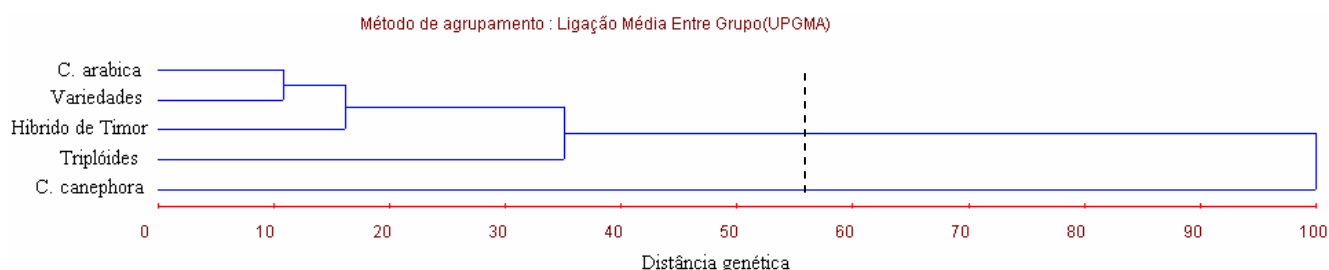


Figura 2 – Dendrograma das cinco populações obtido por meio do método UPGMA, a partir da matriz de distância e identidade genética de Nei (1978), baseadas em marcadores EST-SSR.

Conclusões

Os marcadores EST-SSR apresentaram elevado grau de polimorfismo entre os genótipos, tornando-os eficientes para o estudo da diversidade genética do cafeeiro. A utilização desta classe de marcadores possibilitou distinguir os diferentes genótipos estudados, inclusive, dentro das populações de *C. arabica*, a qual possui baixa variabilidade genética.

Estes marcadores podem ser de grande utilidade para o programa de melhoramento do cafeeiro, principalmente para orientações de cruzamentos, estudos de diversidade e introgressão genética e mapeamento genético.

Referências Bibliográficas

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 coffee species. **Molecular Ecology**, 9:1171–1193.

Cruz, C.D. **Genes versão 2006.4.1** (2006): Programa GENES versão Windows. Editora UFV, Viçosa, MG.

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. (2005) Analysis of AFLP marker associated to the *Mex-1* resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5:387-393.

Excoffier, L.; Smouse, P.E.; e Quattro, J.M. (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics**, 131:479-491.

Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Societé Vanddoise des Sciences Natureles**, 44:223-270.

Lashermes, P.; Combes, M.C.; Prakash, N.S.; Trouslot, P.; Lorieux, M.; Charrier, A. (2001) Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. **Genome**, 44:589-596.

Maluf, M.P.; Silvestrini, M.; Ruggiero, L.M.C.; Guerreiro Filho, O.; Colombo, C.A. (2005) Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP AND SSR marker systems. **Scientia Agricola**, 62:366-373.

Nei, M. (1978) Estimation of average hetrozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590.

Yeh, F.C.; Boyle, T.J.B. (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany** 129:157.

Teixeira-cabral, T.A.; Sakiyama, N.S.; Zambolim, L.; Pereira, A.A.; Barros, E.G.; Silva, D.S. (2004) Characterization of differential coffee tree hosts for *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. with RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 4:68-73.