



**GABRIELLA SANTOS PEREIRA**

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO BICHO-MINEIRO  
E CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Coffea*  
*arabica* COM  
MICROSSATÉLITES**

**LAVRAS – MG  
2011**



**GABRIELLA SANTOS PEREIRA**

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO BICHO-MINEIRO E CARACTERIZAÇÃO  
DE GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* COM MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

**LAVRAS – MG  
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Pereira, Gabriella Santos.

Análise da resistência ao bicho-mineiro e caracterização de genótipos de *Coffea arabica* com microssatélites / Gabriella Santos Pereira. – Lavras : UFLA, 2011.

80 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Genoma Café. 2. Melhoramento do cafeeiro. 3. Marcadores moleculares. 4. EST. 5. SSR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.733

**GABRIELLA SANTOS PEREIRA**

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA AO BICHO-MINEIRO E NA  
CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* COM  
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2011.

Dr. Carlos Henrique S. de Carvalho	EMBRAPA CAFÉ
Dra. Lilian Padilha	EMBRAPA CAFÉ
Dra. Luciane Vilela de Resende	UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2011**

**OFEREÇO**

*A Deus*

**DEDICO**

*Aos meus pais, Saulo e Angélica*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre abençoar minha família e sempre nos guiar pelo melhor caminho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café e à Fapemig, pelo financiamento do trabalho.

Aos meus pais, Saulo e Angélica, meus exemplos de vida, pelo apoio e amor incondicional, sem o que eu não conseguiria concluir este trabalho. Amo muito vocês.

A minha orientadora e amiga Édila, por quem tenho uma inefável admiração, por acreditar em mim e pelo apoio nos momentos difíceis, paciência e compreensão. Em cinco anos de orientação ela me ensinou a amar o meu trabalho. Tenho a como um exemplo a ser seguido.

À minha coorientadora Lilian, pela enorme paciência, por sempre me aconselhar e escutar nos momentos difíceis, sem a qual não conseguiria concluir este trabalho. Nossa amizade será para sempre, independente da cultura que estivermos trabalhando.

À querida amiga professora Luciane, pela nossa amizade e por sempre me ajudar. Tenho muito carinho por você.

À dedicada Rita, que foi tudo para mim nestes experimentos, pela ajuda, amizade e enorme carinho. Adoro você.

Ao Dudu e Fabinho, por me encherem de alegria, pelos conselhos, pelo amor e respeito e admiração que têm por mim.

Aos meus avós, por serem meus anjos e terem me ensinado a gostar da simplicidade e da terra.

Às minhas queridas amigas de infância, Letícia, Li, Fabíola, Marcela, Marina, Janaína, Tássia, Flávias, Camila e Helena que, mesmo, às vezes, distantes, sempre estão comigo no pensamento, por emails e etc.

Aos professores Renato, Laene e João Almir e, em especial ao professor Samuel, pelo carinho e por me ajudarem sempre.

Aos amigos da graduação que sempre me ajudaram com muito boa vontade, em especial Bruna, que se dedicou muito a este trabalho e a Lalá.

Aos amigos da pós-graduação, Vivian, Renatinha, Maria Cecília, Dri, Ivan Caixeta, Fran, Alexana, Adriano Alves, Everson, Mateus, Humberto, Zé Maria, Poliana, Damy, Ana e Gleice, pelo carinho e por tornarem as tardes no laboratório e as aulas muito mais divertidas.

Aos funcionários do Setor de Sementes Elenir, Dalva, etc., em especial a minha amiga D. Euza, que foi meio ponto de apoio durante estes cinco anos em que estive por lá e pelos conselhos e ensinamentos.

À Marli, pela paciência e por sempre me ajudar.

Ao pessoal da Fundação Procafé, em especial ao pesquisador Carlos Henrique, pela disposição para me ajudar.

Aos pesquisadores do Instituto Agrônomo de Campinas, Oliveiro Guerreiro e Mirian (Embrapa Café), pela ajuda e suporte durante o desenvolvimento do trabalho.



## RESUMO GERAL

Em programas de melhoramento de instituições de pesquisas do café no Brasil buscaram-se genótipos de *Coffea arabica* resistentes ao bicho-mineiro, praga que causa maiores danos nas lavouras cafeeiras. Os marcadores moleculares de microssatélites ou SSR podem ser uma alternativa nos programas melhoramento genético do cafeeiro, acelerando a obtenção de novos genótipos com resistência à esta praga. Estes marcadores podem ser utilizados ainda para a caracterização de cultivares em bancos de germoplasma. Objetivou-se nesta pesquisa, analisar genótipos de *C. arabica* que segregam para a característica de resistência ao bicho-mineiro e caracterizar genótipos de café arábica, utilizando-se marcadores moleculares do tipo EST-SSR e SSR. Para a análise da resistência ao bicho-mineiro foram usados 66 locos SSR (*simple sequence repeat*), dos quais 63 foram desenvolvidos a partir de EST (*expression sequence tag*) do Genoma Café. Estes *primers* foram testados em *bulks* de indivíduos de 10 famílias resistentes e 10 famílias suscetíveis e em oito acessos de *Coffea racemosa*, espécie doadora da característica de resistência ao bicho-mineiro. Foi verificado polimorfismo entre os genótipos resistentes e os suscetíveis, quando da utilização de dois *primers*. Em seguida, foram analisados 78 indivíduos das 10 famílias suscetíveis e 55 das 10 famílias resistentes em F<sub>5</sub> e 37 indivíduos resistentes e 54 suscetíveis em F<sub>6</sub>. Os dois alelos polimórficos identificados por meio dos dois *primers* estiveram presentes em torno de 70% dos genótipos suscetíveis em F<sub>5</sub> e em aproximadamente 90% dos indivíduos suscetíveis em F<sub>6</sub>. Não foi encontrado nenhum alelo ligado à característica de resistência em estudo. Assim, foi possível diferenciar genótipos de café arábica resistentes ao bicho-mineiro em relação aos suscetíveis por meio de marcadores microssatélites. Para a caracterização dos genótipos, foram utilizados 38 *primers*, sendo 34 do tipo EST-SSR, em 12 cultivares e 3 clones de *C. arabica*. Foram observados sete locos polimórficos entre os genótipos. Pelo dendrograma obtido a partir dos coeficientes de Jaccard, foi observado um menor valor de similaridade genética, 0,88, entre a cultivar Acauã e os demais genótipos e similaridade de 100% para sete cultivares e um clone. Foi possível caracterizar as cultivares Acauã, IBC-Palma 2, Sabiá Tardio e Icatu Amarelo IAC 3282 por meio de sete *primers*.

Palavras-chaves: Marcadores moleculares. SSR. Genoma Café. *Leucoptera coffeella*. EST.

## GENERAL ABSTRACT

In breeding programs of research institutions of coffee in Brazil seek to genotype *Coffea arabica* resistant to leaf miner, a pest that causes major damage to coffee crops. Molecular markers of microsatellite or SSR may be an alternative in plant breeding programs, accelerating the development of new genotypes with resistance to this pest. These markers can also be used for the characterization of cultivars in germplasm banks. The objective of this research, analyze genotypes of *Coffea arabica* segregating for the trait of resistance to leaf miner and to characterize genotypes of arabica coffee, using molecular markers SSR and EST-SSR. For the analysis of resistance to leaf miner were used 66 loci SSR (simple sequence repeat), of which 63 were developed from EST (expression sequence tag) Genome Café. These primers were tested in bulks of resistant individuals from 10 families and 10 susceptible families and eight accessions of *Coffea racemosa*, characteristic of the donor species for resistance to leaf miner. It was observed polymorphism between resistant and susceptible genotypes when using two primers. Next, we analyzed 78 individuals from 10 families susceptible and resistant 55 of 10 families and 37 individuals in F5 resistant and 54 susceptible F6. The two polymorphic alleles identified by the two primers were present in approximately 70% of susceptible genotypes in F5 and in approximately 90% of susceptible individuals in F6. We found no allele linked to the resistance trait under study. It was possible to distinguish genotypes of arabica coffee resistant to leaf miner in relation to susceptible by microsatellite markers. To characterize the genotypes, 38 primers were used, 34 EST-SSR type in 12 cultivars and three clones of *C. arabica*. Seven polymorphic loci were observed among genotypes. For dendrogram from Jaccard coefficients, we observed a lower genetic similarity values, 0.88, and between cultivar Acauã the other genotypes and similarity of 100% for seven cultivars and one clone. It was possible to characterize the cultivars Acauã, IBC-2 Palm, and Sabia Late Icatu Amarelo IAC 3282 by seven primers.

Keywords: Molecular markers. SSR. Genome Coffee. *Leucoptera coffeella*. EST.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 Introdução geral</b>	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
<b>2.1</b>	<b>Origem e variabilidade do gênero <i>Coffea</i></b>	14
<b>2.2</b>	<b>Bicho-mineiro, <i>Leucoptera coffeella</i></b>	15
<b>2.3</b>	<b>Melhoramento genético do cafeeiro para a resistência ao bicho-mineiro</b>	16
<b>2.4</b>	<b>Marcadores moleculares EST-SSR</b>	19
<b>2.5</b>	<b>Registro e proteção de cultivares</b>	23
	<b>REFERÊNCIAS</b>	26
	<b>CAPÍTULO 2 Marcadores microsatélites na análise da resistência ao bicho-mineiro em <i>Coffea arabica</i> L.</b>	32
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	35
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	37
<b>2.1</b>	<b>Genótipo</b>	37
<b>2.2</b>	<b>Desenho dos <i>primers</i></b>	38
<b>2.3</b>	<b>Extração do DNA</b>	39
<b>2.4</b>	<b>Reações PCR</b>	40
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
<b>3.1</b>	<b>Desenvolvimento dos <i>primers</i></b>	42
<b>3.2</b>	<b>Amplificação dos fragmentos</b>	45
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	49
	<b>REFERÊNCIAS</b>	50
	<b>ANEXOS</b>	53
	<b>CAPÍTULO 3 Caracterização de genótipos de <i>Coffea arabica</i> por meio de marcadores EST-SSR E SSR</b>	58
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	61
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	63

<b>2.1</b>	<b>Genótipo</b>	63
<b>2.2</b>	<b>Desenvolvimento dos <i>primers</i></b>	64
<b>2.3</b>	<b>Extração do DNA</b>	65
<b>2.4</b>	<b>Reações de PCR</b>	65
<b>2.5</b>	<b>Análise dos locos SSR</b>	66
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	67
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	74
	<b>REFERÊNCIAS</b>	75
	<b>ANEXOS</b>	78

**CAPÍTULO 1 Introdução geral**

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de grãos de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional, volume equivalente à soma da produção dos outros cinco maiores países produtores. É também o segundo mercado consumidor, perdendo somente para os Estados Unidos.

Em algumas instituições de pesquisas do Brasil, o melhoramento genético do cafeeiro se destaca com a obtenção de cultivares mais produtivas e adaptadas a diferentes regiões e também resistentes a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos. Ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de cultivares com resistência ao bicho-mineiro, praga considerada a principal desta espécie. Esta praga pode causar redução de até 50% na produtividade do cafeeiro (LA VEJA, 1985; SOUZA et al., 1998).

Pelo fato de *Coffea arabica* ser uma cultura perene, o período para o desenvolvimento de novas cultivares é muito longo, o que justifica a utilização de marcadores mais estáveis, como os marcadores moleculares de DNA nos processos de seleção.

Os marcadores moleculares de DNA do tipo microssatélites ou SSR, sequências simples repetidas, são uma alternativa para a seleção assistida em programas de melhoramento genético, pois facilitam a seleção de genótipos com alelos de interesse e aceleram a obtenção de novas cultivares (ALZATE- MARIN et al., 2005).

Outra aplicação destes marcadores é na caracterização de genótipos em bancos de germoplasma e no registro de cultivares, para fins de comercialização de sementes e mudas (VIEIRA et al., 2010), pois apresentam uma ampla cobertura do genoma em elevado grau de polimorfismo quando comparados aos marcadores morfológicos. Em café, até o momento, são utilizados apenas marcadores morfológicos como descritores mínimos para a distinção de cultivares.

Com crescente ênfase na genômica funcional, conjuntos de dados de ESTs (etiqueta de sequência expressa) estão sendo desenvolvidos. Associado a isso, a evolução de ferramentas de bioinformática permite a rápida identificação e o desenvolvimento de marcadores EST-SSR (BHAT, et al., 2005). Estas sequências representam uma alternativa para o desenvolvimento de *primers* SSR para a identificação de cultivares de café.

O Projeto Genoma Café, banco de dados com mais de 200 mil sequências de cDNA, tem sido utilizado por pesquisadores para diversas finalidades, dentre elas o desenvolvimento de marcadores moleculares associados a características de interesse (VIEIRA et al., 2006).

Objetivou-se, com esta pesquisa, analisar genótipos de *C. arabica* para a característica de resistência ao bicho-mineiro e caracterizar genótipos de café arábica por meio de marcadores moleculares do tipo EST-SSR e SSR.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Coffea* reúne cerca de cem espécies originárias do continente africano. Muitas destas espécies podem ser usadas como fonte de variabilidade genética em programas de melhoramento do café.

### 2.1 Origem e variabilidade do gênero *Coffea*

Dentre as espécies do gênero *Coffea*, as de maior importância econômica e mais difundidas na cafeicultura são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre (CARNEIRO-FILHO, 1996).

Cerca de 60 espécies selvagens do gênero *Coffea* foram descritas por serem potenciais fontes de alelos nos programas de melhoramento. As espécies *C. racemosa* e *C. stenophylla* são importantes fontes de resistência ao bicho-mineiro e *C. liberica* à ferrugem em programas de melhoramento (MEDINA-FILHO et al., 1977).

A espécie *C. arabica*, família Rubiaceae originária da região sudoeste da Etiópia (SYLVAIN, 1955), é preferida devido às características dos grãos, com produção de bebida de sabor suave e com baixo teor de cafeína, enquanto *C. canephora* é preferencialmente destinada à produção de café solúvel (MENDES; GUIMARÃES, 1998).

Dentro do gênero *Coffea*, todas as espécies estudadas são alógamas e diploides com  $2n = 2x = 22$  cromossomos e apresentam autoincompatibilidade, com exceção do *C. arábica*, que é autógama e poliploide com  $2n = 4x = 44$  cromossomos (MENDES; GUIMARÃES, 1998). Lashermes et al. (1999), por meio de hibridação *in situ*, demonstraram que, provavelmente, *C. canephora* e *C. eugenoides* são as espécies que originaram *C. arabica*.

As cultivares de *C. arabica* apresentam estreita base genética, provavelmente pelo fato de serem plantas autógamas e terem sido derivadas de poucos acessos e de pequenas quantidades de sementes durante o processo de dispersão do café



(CARVALHO et al., 1993). A maioria das cultivares de *C. arabica* deriva das cultivares Típica, originalmente introduzidas no Brasil em 1727 e Bourbon (ANTHONY et al., 2002), cultivar nobre e que produz café de boa qualidade. Nos programas de melhoramento genético do cafeeiro, diferentes espécies do gênero *Coffea* têm sido utilizadas para o desenvolvimento de cultivares de café com características de interesse.

O desenvolvimento de cultivares com resistência ao bicho-mineiro tem sido priorizado em função dos danos causados em lavouras em diferentes regiões do país.

Até o momento, as todas as cultivares registradas de *C. arabica* são altamente suscetível ao bicho-mineiro, principal praga das lavouras cafeeiras.

## **2.2 Bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella***

O bicho-mineiro (Lepidoptera:Lyonetiidae) é uma praga exótica originária do continente africano (GALLO et al., 1978), sendo constatada no Brasil já no século XIX, provavelmente advindo de mudas de café provenientes das Antilhas e da ilha de Bourbon, atual ilha Réunion. No Brasil, *L. coffeella* é a praga considerada mais prejudicial ao cafeeiro. É observada maior incidência desta praga em regiões de altas temperaturas com longos períodos de seca, como no cerrado (SOUZA et al., 1998).

Este inseto é considerado de metamorfose completa, passando pela fase de ovo, lagarta, crisálida e adulto. O adulto do bicho-mineiro é um microlepidóptero cuja mariposa mede 6,5 mm de envergadura, tem coloração branco-prateada e asas anteriores e posteriores franjadas (SOUZA et al., 1998; GUERREIRO FILHO, 2006).

A lagarta do inseto penetra na folha aloja-se entre as duas epidermes, consome o tecido paliádico e forma lesões que são denominadas minas ou galerias. As lesões são necróticas, com bordas irregulares, de coloração amarelo-pálido que, posteriormente, tornam-se pardacentas (LA VEJA, 1985). A injúria desencadeia uma resposta “imune” inespecífica na planta, com aumento dos níveis de etileno, oxidação do tecido atacado e, conseqüentemente, queda das folhas (SOUZA et al., 1998;

GUERREIRO FILHO, 2006). Este desfolhamento inesperado causa grande redução na atividade fotossintética da planta, resultando em redução na produtividade de até 50% (LA VEJA, 1985).

Segundo Souza et al. (1998) e Guerreiro Filho (2006), a drástica desfolha do cafeeiro, em julho, impede a formação de botões florais, afetando a produção de frutos e, entre os meses de agosto a setembro, uma acentuada desfolha pode afetar a floração e, conseqüentemente, a formação dos frutos.

O uso de genótipos resistentes é uma alternativa para o controle desta praga. Dessa forma, nos programas de melhoramento genético do cafeeiro, tem-se buscado a obtenção de genótipos de *C. arabica* resistentes a esta praga.

### **2.3 Melhoramento genético do cafeeiro para a resistência ao bicho-mineiro**

A partir de 1852, foram introduzidas no Brasil inúmeras variedades estrangeiras de *C. arabica* (CARVALHO et al., 1993) que foram utilizadas em hibridações com as antigas variedades cultivadas no país. A partir de inúmeros cruzamentos foram selecionadas novas variedades de *C. arabica*, mais produtivas e melhor adaptadas às diferentes regiões (ANTHONY et al., 2002).

Em espécies diploides do gênero *Coffea* foram reportados diferentes níveis de resistência ao bicho-mineiro, tanto em condições de campo quanto de laboratório (GUERREIRO FILHO, 2006). As espécies *C. stenophylla*, *C. salvatrix*, *C. liberica* var *liberica*, *C. brevipes*, *C. sp* 'Moloundou', *C. jasminoides* e *C. farafaganensis* são consideradas resistentes devido à alta mortalidade das larvas deste inseto. *Coffea kapakata*, *C. eugenioides*, *C. racemosa*, *C. liberica* var. *dewevrei*, *C. humilis*, *C. tetragona*, *C. tsirananae*, *C. resinosa*, *C. millotii*, *C. bertrandii*, *C. dolichophylla* e *C. bonnieri* são consideradas moderadamente resistentes e *C. congensis*, *C. sessiliflora*, *P. travancorensis* e *C. perrieri*, moderadamente susceptíveis a *L. coffeella* (GUERREIRO FILHO, 2006).

Nos programas de melhoramento genético desenvolvidos no Brasil, a resistência ao bicho-mineiro em genótipos de *C. arabica* foi introduzida por uma planta fértil, descendente de um cruzamento natural interespecífico entre as espécies *C. racemosa* e *C. arabica* cv. Blue Montain. Medina Filho et al. (1977) sugeriram que a resistência ao bicho-mineiro proveniente da espécie *C. racemosa* é determinada por dois genes dominantes e complementares. Esse resultado corrobora os de Guerreiro Filho et al. (1999).

O desenvolvimento de cultivares resistentes ao ataque do bicho-mineiro combina processos de retrocruzamento e genealógico. Atualmente, na Fundação Procafé, os genótipos mais avançados para a característica em questão foram obtidos do cruzamento natural entre *C. racemosa* e *C. arabica* cv. Blue Montain, ocorrido no Instituto Agrônomo de Campinas, IAC. Posteriormente, também no IAC, ocorreram dois retrocruzamentos naturais com *C. arabica* e a planta selecionada recebeu a sigla IAC 1195-56-2. As sementes dessa introdução foram doadas ao extinto Instituto Brasileiro do Café (IBC) e plantadas em Caratinga, MG, onde foi selecionada a planta C1195-5-6-2-119, então cruzada com Catimor UFV 417, para também incorporar a resistência à ferrugem. Deste cruzamento, a planta 842, resistente ao bicho-mineiro e à ferrugem, foi selecionada e suas sementes enviadas para Varginha, MG, em 1994. Seleções para a resistência ao bicho-mineiro tiveram continuidade com os pesquisadores da Fundação Procafé e Embrapa Café, em Varginha, Coromandel, Varjão de Minas e Manhuaçu, MG. As progênies oriundas deste material foram denominadas Siriema e, atualmente, encontram-se em F<sub>5</sub> (CARVALHO et al., 2008).

O IAC também continua o seu programa de melhoramento do cafeeiro para resistência ao bicho-mineiro, utilizando indivíduos pertencentes a diferentes gerações do cruzamento natural entre *C. racemosa* e *C. arabica*, além de alguns triploides de origem artificial. No campo, podem ser encontradas populações avançadas com elevado nível de produtividade e resistência ao inseto, além de porte reduzido, característica de grande importância para a cafeicultura moderna. Apesar disso, tanto na Fundação Procafé quanto no IAC, as populações ainda segregam para a característica de resistência ao

bicho-mineiro e a estratégia da propagação vegetativa tem sido avaliada pelos melhoristas destas instituições.

Guerreiro-Filho e Mazzafera (2000) tentaram correlacionar a variabilidade genética do conteúdo de cafeína, alcaloide que apresenta efeitos inibitórios ao desenvolvimento de insetos, em folhas de diferentes espécies de café à resistência ao *L. coffeella*. Os autores constataram acúmulo de cafeína com a infestação por *L. coffeella*, o que demonstra existir uma resposta metabólica ao estresse causado por essa praga. Magalhães et al. (2008) concluíram que a concentração de cafeína age como um potencial mediador da interação hospedeiro-pragas. Segundo eles, este alcaloide é um estimulante de oviposição para os minadores.

Ramiro et al. (2004) realizaram uma caracterização comparativa da espessura foliar de *C. arabica*, de *C. racemosa* e de progênies derivadas de cruzamentos entre essas espécies. Os autores não encontraram uma correlação entre as características anatômicas foliares e resistência ao bicho-mineiro. Em outra abordagem, Ramiro et al. (2006) verificaram que os compostos fenólicos não têm papel importante na resistência a essa praga. Os autores constataram diferenças entre a concentração dessas substâncias entre folhas de *C. arabica* e *C. racemosa* e na atividade das enzimas peroxidase e polifenol oxidase. Porém, os híbridos resistentes e suscetíveis não diferiram para nenhuma destas características.

Mondego et al. (2005) isolaram genes diferencialmente expressos durante o ataque do bicho-mineiro a plantas de uma progênie híbrida derivada de cruzamentos entre *Coffea arabica* e *C. racemosa*. A expressão diferencial de cinco genes expressos (*PR-8*, *CAX9*, *SPC25*, *psaH*, *BEL*) foi detectada em diferentes órgãos da planta e durante o desenvolvimento do fruto de café. Os autores verificaram a expressão de um gene denominado *Comir*, que expressa uma proteína do tipo miraculina, induzida após a oviposição em plantas resistentes, porém esse gene não foi induzido após a eclosão da lagarta em plantas resistentes e nem em plantas suscetíveis.

O padrão de regulação de genes ligados à resistência a estresses bióticos observado em outras espécies de plantas é observado também em café. Assim, o gene

*Lox*, envolvido na via biossintética de jasmonatos, apresenta uma diminuição na expressão em folhas de café suscetíveis atacadas pelo bicho-mineiro, indicando uma repressão desta via de defesa. Por outro lado, a expressão da enzima  $\beta$ -glucanase, ativada em resposta à herbivoria em outras espécies, foi reduzida em folhas resistentes infectadas pelo bicho-mineiro.

Estes resultados sugerem que, apesar da ativação da resposta de defesa em café apresentar vias de sinalização comuns a outras espécies, o papel específico de cada gene ainda necessita ser caracterizado.

O fato de o cafeeiro ser uma cultura perene, o período para o desenvolvimento de novas cultivares é muito longo, o que justifica a utilização de marcadores moleculares para o auxílio ao processo de seleção de genótipos com a resistência ao bicho-mineiro.

#### **2.4 Marcadores moleculares EST-SSR**

Desde 1980, os marcadores moleculares de DNA são utilizados em estudos de genética e melhoramento de plantas e evolução de espécies. Essa tecnologia é aplicada em estudos de genética de populações, mapeamento genético, análises de similaridade e distância genética e também para a identificação de acessos de plantas.

Os marcadores moleculares são usados para a seleção assistida em plantas para acelerar a obtenção de genótipos superiores (OLIVEIRA et al., 2007; MIKLAS et al., 2009).

O genoma dos organismos é composto por uma grande proporção de locos microssatélites, sequências repetitivas de DNA constituídas por um a seis nucleotídeos *in tandem* (TAUTZ; RENZ, 1984). Os microssatélites, ou SSR, possuem várias características desejáveis, tais como herança codominante, multialelismo, elevado conteúdo informativo de polimorfismo e herança mendeliana (TAUTZ; RENZ, 1984; GUPTA; VARSHNEY, 2000; MORGANTE et al., 2002). Estes marcadores tem sido utilizados para a identificação de cultivares de café (VIEIRA et al., 2010), batata

(MAISON-THIERY et al., 2005), maçã (MOREYA et al., 2011) e cana-de-açúcar (SWAPNA et al., 2010), dentre outras culturas.

Com a crescente ênfase na genômica funcional, grandes conjuntos de dados de etiquetas de sequências expressas ou ESTs são desenvolvidos e, com a evolução de ferramentas de bioinformática, é possível identificar e desenvolver marcadores EST-SSR em grande escala, com a redução de tempo e a um custo eficaz (BHAT, et al., 2005). O EST representa uma sequência parcial de *cDNA*, de um gene que foi expresso em um tecido, num determinado momento e sob condições específicas, apresentando, portanto, vantagens para a identificação de marcadores (STERKY; LUNDEBERG, 2000). Estas sequências são recursos valiosos para a busca de microssatélites (PONCET et al., 2004).

A busca por SSR *in silico* em bibliotecas de ESTs é uma estratégia para o desenvolvimento destes marcadores. Se um marcador EST-SSR estiver geneticamente associado a um gene de interesse, ele será um excelente marcador que poderá ser associado à característica de interesse (CATO et al., 2001).

Devido às vantagens dos marcadores gênicos e pelo fácil acesso aos grandes bancos de dados de EST, aumentou-se o número de marcadores SSR derivados dessas sequências em várias espécies de plantas cultivadas. Marcadores do tipo SSR já foram identificados em ESTs de soja (ZHANG et al., 2004), café (BHAT et al., 2005; PONCET et al., 2004; AGGARWAL et al., 2007; PINTO et al., 2007), gérbera (GONG & DENG, 2010), alface (SIMKO, 2009), seringueira (FENG et al., 2009) e uva (HUANG et al., 2010), dentre outras.

Bhat et al. (2005) descreveram pela primeira vez a potencialidade da utilização de *primers* EST-SSRs para avaliação genética de germoplasma de café. Foram obtidas 16 sequências de bibliotecas de *cDNA* de folhas derivadas de um cruzamento interespecífico (*Coffea congensis* x *Coffea canephora*). Destas, nove amplificaram também para *C. arabica*, indicando que existem sequências homólogas no genoma de espécies deste gênero. Neste estudo observou-se alta similaridade

genética entre os 45 acessos de *C. arabica* estudados e maior polimorfismo entre os genótipos de *C. canephora*, espécie que apresenta autoincompatibilidade.

Poncet et al. (2004) desenvolveram 25 *primers* SSR a partir de bibliotecas de cDNA de folhas e frutos de *C. canephora* para avaliar o potencial de transferência de genes em cruzamentos interespecies do gênero *Coffea*. Esses marcadores apresentaram alto nível de locos polimórficos, podendo ser usados em espécies silvestres de *Coffea*.

O Projeto Genoma do Café teve início em fevereiro de 2002, por iniciativa do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, coordenado pela Embrapa Café em colaboração com a FAPESP e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O principal objetivo do projeto foi disponibilizar recursos da genômica à comunidade científica para o desenvolvimento de novas tecnologias em benefício dos diferentes segmentos da cadeia produtiva do café.

Foram sequenciados mais 214.964 mil clones oriundos de bibliotecas de cDNA de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* provenientes de vários tecidos do cafeeiro em diversos estádios de desenvolvimento e/ou sob estresses bióticos e abióticos, resultando em 130.792, 12.381 e 10.566 sequências de cada espécie, respectivamente (VIEIRA et al., 2006). Para a construção das bibliotecas foram escolhidos tecidos e tratamentos baseados nos problemas biológicos limitantes para o desenvolvimento da cafeicultura, tais como suscetibilidade a pragas e doenças, sensibilidade ao frio e à seca, maturação não-uniforme dos frutos e composição química de sementes.

Isso permitiu a identificação de cerca de 33 mil genes distintos, responsáveis pelos diversos mecanismos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento do cafeeiro. Segundo Vieira et al. (2006), pela comparação destas sequências pelo programa BLAST, foi observado que 22% não tiveram nenhuma similaridade significativa com as sequências contidas no Banco de dados do National Center for Biotechnology Information.

Os marcadores moleculares quando estão proximamente ligados a alelos de interesse. Eles podem ser usados na seleção assistida por marcadores (SAM) nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento, acelerando a obtenção de genótipos superiores (ALZATE-MARIN, et al., 2005). Por meio destes marcadores, a seleção de genótipos é indireta, não sendo necessárias inoculações ou exposição da planta ao patógeno, praga ou outro tipo de estresse em condições de campo.

Nos processos de retrocruzamento, a seleção assistida por marcadores moleculares é de grande importância para acelerar a recuperação do genoma do genitor recorrente, porém, com a característica introduzida pelo genitor doador.

Outra aplicação de marcadores moleculares na seleção assistida é no processo de piramidação de alelos de interesse. Estes marcadores permitem o monitoramento simultâneo de vários genes de interesse em um mesmo retrocruzamento (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Segundo Mohan et al. (1997), para realizar a SAM em programas de melhoramento genético, devem-se considerar três requisitos: o marcador deve estar ligado ou associado ao gene de interesse; a técnica deve ser eficiente para a avaliação de grandes populações e a técnica deve se mostrar reproduzível entre laboratórios, ser econômica e de fácil execução.

Na literatura, há vários exemplos de aplicações bem sucedidas de SAM no melhoramento de plantas, como é o caso da transferência de alelos favoráveis de espécies selvagens para cultivadas para aumento de tamanho de fruto em tomate (TANKSLEY; NELSON, 1996; TANKSLEY; MCCOUCH, 1997), o retrocruzamento assistido para monitorar a transferência de alelos favoráveis de QTL em milho (BOUCHEZ et al., 2002), o retrocruzamento assistido em milho para geração de linhagens semi-isogênicas (*Near Isogenic Lines*, NIL) (STUBER et al., 1999) e a piramidação de locos de arroz para resistência a doenças (SINGH et al., 2001; HITTALMANI et al., 2000). RIBAUT; RAGOT (2008) reportaram um aumento na produção de grãos sob condições de seca em milho tropical por meio de estratégia de retrocruzamento assistido com marcadores moleculares. Ottoman et al. (2009)



validaram *primers* para seleção assistida de genótipos de batata resistentes ao PVY. Eles atribuíram o sucesso da SAM à pequena distância entre o gene de interesse e os marcadores moleculares utilizados.

Mahé et al. (2008) identificaram dois marcadores moleculares que cossegregaram perfeitamente com um dos genes,  $S_{H3}$ , que confere resistência a *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem em cafeeiro. Segundo os autores, esses marcadores são adequados para a seleção assistida para resistência e facilitam a piramidação do gene com outros genes de resistência a doenças.

A SAM fornece outras vantagens em programas de melhoramento para doenças e pragas, permitindo respostas mais rápidas quando ocorre a quebra da resistência, a possibilidade de introgressão de múltiplos locos a partir de germoplasmas distintos e seleção de recombinantes raros entre locos de resistência ligados muito proximamente (MICHELMORE et al., 1991).

Outra aplicação importante dos marcadores moleculares é a utilização destes para a caracterização de genótipos para fins de registro e proteção de cultivares.

## **2.5 Registro e proteção de cultivares**

O desenvolvimento de uma nova cultivar demanda muito trabalho, tempo e investimento. Para assegurar o direito do obtentor sobre a cultivar desenvolvida foi aprovada no Brasil, em 1997, a Lei de Proteção de Cultivares (L. 9456) (Brasil, 2003).

Para o registro e proteção de cultivares são necessárias informações, genotípicas ou fenotípicas, sobre a identidade genética da cultivar para que possa ser diferenciada das outras.

Para que uma cultivar seja lançada no mercado, ela não precisa ser necessariamente protegida, mas, deve ser obrigatoriamente inscrita no Registro Nacional de Cultivares. É necessário que ela passe pelo teste de valor de cultivo e uso (VCU) para o registro, apresente características estáveis e homogêneas que a diferenciem de outras que já estão no mercado, assegurando sua identidade genética.

No caso de proteção, deve-se comprovar a distinguibilidade, a homogeneidade e a estabilidade (DHE) da nova cultivar (AGUIAR et al., 2004).

Em 2001, *C. arabica* foi incluída na lista de espécies registradas (VIEIRA et al., 2010). As instruções para execução dos ensaios DHE de cultivares de cafeeiros e a relação de descritores estão publicadas no Diário Oficial de União, na Portaria n.º 2, de 17 de novembro de 2000. Essa relação inclui características botânicas da planta ou de órgãos como haste, ramos, folhas, flores, frutos e sementes, algumas características agrônômicas, como a precocidade de maturação dos frutos, ou tecnológicas, como o teor de cafeína presente no endosperma e o peso de cem sementes (GUERREIRO FILHO, 2001).

Atualmente, existem sete cultivares brasileiras de *C. arabica* protegidas no MAPA, Araponga MG1, Catiguá MG1, Catiguá MG2, IPR98, MGS Travessia, Pau Brasil MG1 e Sacramento MG1 ([http://extranet.agricultura.gov.br/php/proton/cultivarweb/cultivares\\_protegidas.php](http://extranet.agricultura.gov.br/php/proton/cultivarweb/cultivares_protegidas.php)). Estas cultivares foram protegidas utilizando-se marcadores morfológicos como descritores.

Marcador morfológico é definido como um fenótipo que deve ser de fácil identificação, normalmente determinado por um único alelo, e que deve ser herdável. Para que um marcador seja eficiente na seleção, é necessário que ele esteja intimamente ligado ao alelo que desejamos selecionar, ou seja, eles tendem a ficar juntos e, sempre que um indivíduo expressar o fenótipo do marcador, ele deverá também ser portador do alelo de interesse (RAMALHO et al., 2000).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) indica os descritores morfológicos para caracterizar e garantir a proteção de cultivares. Porém, esses marcadores apresentam algumas limitações, principalmente em espécies de base genética estreita, como *Coffea arabica* (CARVALHO et al., 1993; ANTHONY et al., 2002; LÓPEZ-GARTNER et al., 2009), por apresentarem baixo grau de polimorfismo. Além disso, muitos destes descritores são influenciados pelo ambiente e expressos

somente nas plantas adultas, o que demanda tempo e espaço para a avaliação dos mesmos (AGUIAR et al., 2004).

Em soja, Vieira et al. (2009) verificaram que os marcadores morfológicos avaliados nos estádios de plântula, planta e semente, recomendados pela Lei de Proteção de Cultivares e UPOV, foram eficientes na separação das dez cultivares. Já em arroz, os descritores morfológicos não foram seguros para a caracterização e a diferenciação das cultivares Carisma, IAC 202, Confiança, Douradão, Guarani, Primavera, Canastra e Caiapó (BONOW et al., 2007).

Aguiar et al. (2004) estudaram a eficiência de descritores mínimos na caracterização de cultivares de cafeeiro e como diferenciadores entre cultivares a serem submetidas ao processo de proteção no Brasil. Foram avaliadas 38 características listadas pelo MAPA como descritores mínimos para o café em 29 cultivares. Os autores concluíram que os descritores avaliados podem ser eficientes na identificação de grupos distintos de cultivares, mas pouco úteis na discriminação entre cultivares do mesmo grupo.

Dessa forma, é necessário avaliar outros marcadores que sejam mais estáveis e que apresentem polimorfismo para a diferenciação de cultivares de café para posterior registro e proteção, como os marcadores moleculares de DNA.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, R. K. et al. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 2, p. 359–372, Nov. 2007.
- 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.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 333-342, jul. 2005.
- 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.
- BHAT, P. R. et al. Identification and characterization of expressed sequence tags-derived simple sequence repeat markers from robusta coffee variety 'C X R' (an interspecific hybrid of *Coffea canephora* X *Coffea congensis*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 80-83, Mar. 2005.
- BONOW, S. et al. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 291-300, fev. 2001.
- BOUCHEZ, A. et al. Marker-assisted introgression of favorable alleles at quantitative trait loci between maize elite lines. **Genetics**, Pittsburgh, v. 162, n. 4, p. 1945–1959, Dec. 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ato nº.2, de 17 de janeiro de 2003. Estabelece regras para análises de sementes. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jan. 2003. p. 2-3.
- CARNEIRO FILHO, F. Qual o café que o mercado quer? É a pergunta de alguns cafeicultores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 22., 1996, Águas de Lindóia. **Anais...** Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 1996. p. 23-24.
- CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C. Café. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. A. (Ed.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1993. Cap. 2, p. 29-76.

CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café**. Brasília: EMBRAPA, 2008. 247 p.

CATO, S. A. et al. A rapid PCR- based method for genetically mapping ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin v. 102, n. 2, p. 296- 306, May 2001.

FENG, S.P et al. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 23, n. 1, p. 85–97, Jan. 2009.

GALLO, D. et al. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Ceres, 1978. 531 p.

GONG, L.; DENG, Z.; EST-SSR markers for gerbera (*Gerbera hybrida*). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 125–132, Jan. 2010.

GUERREIRO FILHO, O. Cafeeiro: nova espécie vegetal passível de proteção no Brasil. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, n. 2, p. 38-39, 2001.

GUERREIRO FILHO, O. Coffee leaf miner resistance. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 109-117, Jan. 2006.

GUERREIRO FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner, *Perileuoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 6, p. 1447-1464, Feb. 2000.

GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B.; ESKES, A. B. Expression and mode of inheritance of resistance to leaf miner. **Euphytica**, Dordrecht, v. 105, n. 1, p. 7-15, Jan. 1999.

GUPTA P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers fore genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v. 113, n. 3, p. 163–185, June 2000.

HITTALMANI, S. et al. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1121-1128, May 2000.

HUANG, H. et al. Mining and validating grape (*Vitis L.*) ESTs to develop EST-SSR markers for genotyping and mapping. **Molecular Breeding**. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/p21665275731j22u>>. Acesso em: 29 set. 2010.

LA VEJA, K. L. de. A. Nocividad de *Leucoptera coffeella* (Lepdoptera-Lyonetiidae). III. Características y dimensiones de las lesiones producidas a las hojas del cafeto. **Ciencia y Tecnología Agrícola Café y Cacao**, Habana, v. 7, n. 1, p. 25-40, 1985.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 261, n. 2, p. 259-266, Mar. 1999.

LÓPEZ-GARTNER, G. et al. Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica*) using fluorescent SSR markers. **Tree Genetics & Genome**, Berlin, v. 5, n. 3, p. 435-446, July 2009.

MAGALHÃES, S. T. V. et al. Coffee leaf volatiles and egg laying by coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella*. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 6, p. 1038-1041, June 2008.

MAHÉ, L. et al. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 105-113, Jan. 2008.

MEDINA FILHO, H. P.; CARVALHO, A.; MEDINA, D. M. Germoplasma de *C. racemosa* e seu potencial no melhoramento do cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 43-46, jan. 1977.

MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Genética e melhoramento do cafeeiro**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 99 p.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis - a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

MIKLAS, P. N. et al. Tagging and Mapping Pse-1 Gene for resistance to halo blight in common bean differential cultivar UI-3. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 1, p. 41-48, Jan. 2009.

MOHAN, M. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop Plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 3, n. 2, p. 87-103, Apr. 1997.

MOISAN-THIERY, M. et al. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). **Potato Research**, Wageningen, v. 48, n. 3, p. 191-200, June 2005.

MONDEGO, J. M. C. et al. Isolation and characterization of *Coffea* genes induced during coffee leaf-miner (*Leucoptera coffeella*) infestation. **Plant Science**, Limerick, v. 169, n. 2, p. 351-360, Aug. 2005.

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.

MOREYA, S. et al. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 177, n. 1, p. 135-150, Jan. 2011.

OLIVEIRA, A. C. B. et al. Partial map of *Coffea arabica* l. and recovery of the recurrent parental in backcross progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 196-203, Jan. 2007.

OTTOMAN, R. J. et al. Validation and Implementation of Marker-Assisted Selection (MAS) for PVY Resistance (*Ry<sub>adg</sub>* gene) in a tetraploid potato breeding program. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 86, n. 4, p. 304-314, Aug. 2009.

PINTO, F. O.; MALUF, M. P.; GUERREIRO-FILHO, O. Study of simple sequence repeat markers from coffee expressed sequences associated to leaf miner resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 377-384, mar. 2007.

PONCET, V. et al. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea spp.*). **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 1071-1081, Dec. 2004.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo; Lavras: FAEPE, 2000. 472 p.

RAMIRO, D. A. et al. Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p. 363-372, dez. 2004.

RAMIRO, D. A.; GUERREIRO-FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Phenol contents, oxidase activities and the resistance of coffee to the leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 32, n. 9, p. 1977-1988, Feb. 2006.

RIBAUT, J. M.; RAGOT, M. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 351-360, July 2008.

SIMKO, I. Development of EST-SSR Markers for the Study of Population Structure in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Heredity**, Washington, v. 100, n. 2, p. 256–262, Sept. 2009.

SINGH, S. et al. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (xa5, xa13 and Xa21) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 6, p. 1011-1015, May 2001.

SOUZA, J. C. de.; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. de O. **Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado**. 2.ed. Belo Horizonte: EPAMIG, 1998. 48 p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 54).

STERKY, F.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 1-31, Jan. 2000.

STUBER, C. W.; POLACCO, M.; SENIOR, M. L. Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1571–1583, Nov. 1999.

SYLVAIN, P. G. Some observations on Coffea arabica L. in Ethiopia. **Turrialba: revista interamericana de ciencias agrícolas**, San Jose, v. 5, p. 37-53, 1955.

SWAPNA, M. et al. Single-strand conformational polymorphism of EST-SSRs: a potential tool for diversity analysis and varietal identification in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**. Disponível em <<http://www.springerlink.com/content/b441717481x575m2/>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Potential from the wild seed banks and molecular maps: unlocking genetic. **Science**, Washington, v. 277, n. 5329, p. 1063-1066, Aug. 1997.

TANKSLEY, S. D.; NELSON, J. C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, n. 1, p. 191-203, Feb. 1996.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.



VIEIRA, E. S. N. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 95-108, Jan. 2006.

VIEIRA, E. S. N. et al. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 86-94, Jan. 2009.

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.

ZHANG, W. K. et al. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 1131–1139, Jan. 2004.

**CAPÍTULO 2** Marcadores microssatélites na análise da resistência ao bichomineiro em *Coffea arabica* L.

## RESUMO

O bicho-mineiro, principal praga das lavouras cafeeiras do Brasil, causa danos nas folhas e reduz área fotossintética das plantas, o que resulta em queda na produtividade. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de genótipos de *Coffea arabica* resistentes a essa praga. A seleção assistida por marcadores moleculares contribui para o direcionamento dos programas de melhoramento e reduz o tempo gasto para a obtenção de novos genótipos. Objetivou-se, neste trabalho, analisar genótipos de café arábica resistentes ao bicho-mineiro por meio de marcadores microssatélites. Foram utilizados 66 *primers simple sequence repeat* (SSR), dos quais 63 foram desenvolvidos a partir de *expression sequence tag* (EST) do Genoma Café. Esses *primers* foram amplificados em *bulks* de indivíduos em geração F<sub>5</sub> de 10 famílias resistentes e 10 famílias susceptíveis e em oito acessos de *Coffea racemosa*, espécie doadora da característica de resistência ao bicho-mineiro. Os polimorfismos foram verificados em dois locos SSR, sendo estes observados nos *bulks* das plantas susceptíveis em relação ao *C. racemosa* e aos *bulks* das plantas resistentes. Em seguida, foram analisados 78 indivíduos susceptíveis e 55 resistentes de cada família em F<sub>5</sub> e 37 indivíduos resistentes e 54 susceptíveis de F<sub>6</sub>. Os dois alelos polimórficos identificados por meio de dois *primers* estiveram presentes em torno de 70% dos genótipos susceptíveis em F<sub>5</sub> e em, aproximadamente, 90% dos indivíduos susceptíveis em F<sub>6</sub>. Assim, foi possível diferenciar genótipos de café arábica resistentes ao bicho-mineiro em relação aos susceptíveis por meio de marcadores microssatélites. Não foi encontrado nenhum alelo ligado à característica de resistência em estudo.

Palavras-chaves: Marcadores moleculares. *Coffea racemosa*. *Leucoptera coffeella*. EST.

## MICROSATELLITES MARKERS IN THE ANALYSIS OF RESISTANCE IN LEAF MINER *Coffea arabica* L.

### ABSTRACT

The leaf miner, the main pest of coffee plantations in Brazil, damages the leaves and reduce photosynthetic area of plants, which results in lower productivity. So it becomes important the development of *Coffea arabica* genotypes resistant to this pest. The marker-assisted selection contributes to the targeting of improvement programs and reduces the time spent to obtain new genotypes. The objective of this work to analyze genotypes of arabica coffee resistant to leaf miner by microsatellite markers. We used 66 SSR primers (Simple Sequence Repeat), of which 63 were developed from EST (Expression Sequence Tag) Coffee Genome. These primers were amplified in bulks of individuals in the F5 generation of 10 families and 10 families resistant and susceptible eight accessions of *Coffea racemosa*, characteristic of the donor species for resistance to leaf miner. The polymorphisms were found in two SSR loci were observed in these susceptible bulks of plants in relation to *C. racemosa* and the bulks of resistant plants. They were then analyzed 78 and 55 susceptible individuals resistant to every family in F5 and 37 were resistant and 54 susceptible to F6. The two polymorphic alleles identified by two primers were present in approximately 70% of susceptible genotypes in F5 and in approximately 90% of susceptible individuals in F6. Thus it was possible to differentiate genotypes of arabica coffee resistant susceptible to leaf miner using microsatellite markers. We found no allele on the trait of resistance in the study.

Keywords: Molecular markers. *Coffea racemosa*. *Leucoptera coffeella*. EST.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, nas lavouras cafeeiras, principalmente das regiões dos cerrados, a incidência do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*), considerada a principal praga desta cultura, ocorre de maneira expressiva. Este microlepdóptero reduz a área fotossintética das folhas, causando grandes perdas na produção de café (SOUZA et al., 1998). Até o momento, cultivares comerciais de café arábica registradas no Brasil são altamente susceptíveis ao bicho-mineiro, tornando indispensável o controle químico desta praga.

A utilização de cultivares resistentes é uma alternativa vantajosa para o controle de estresses bióticos. Esta estratégia contribui para uma maior competitividade dos agricultores, pois permite que maiores produtividades sejam alcançadas ao reduzir as perdas provocadas pelo ataque de pragas e doenças, além de reduzir os custos de produção e da poluição do ambiente pela aplicação de defensivos.

Nos programas de melhoramento genético desenvolvidos no Brasil, a resistência ao *Leucoptera coffeella* em genótipos de *C. arabica* foi introduzida por uma planta fértil, descendente de um cruzamento natural interespecífico entre as espécies *C. racemosa* e *C. arabica* cv. Blue Montain. Populações híbridas obtidas pela combinação dos processos de retrocruzamentos e genealógico encontram-se em campo, mas ainda segregam para essa característica (GUERREIRO-FILHO, 2006).

O controle genético para resistência ao bicho-mineiro em cafeeiros foi definido como sendo a partir de dois genes (MEDIANA FILHO et al., 1977; GUERREIRO FILHO et al., 1999), mas, no campo, a dificuldade de estabilizar esta característica nos genótipos indica a necessidade de ampliar os estudos relacionados à herança desta característica. Por outro lado, até o momento, as pesquisas relacionadas com a caracterização dos aspectos moleculares da resistência ao bicho-mineiro não permitiram a elucidação da natureza da defesa nas plantas resistentes a esta praga (MONDEGO et al., 2005; GUERREIRO-FILHO, 2006; PINTO et al., 2007).

O cafeeiro, por ser uma cultura perene, demanda um tempo longo para o desenvolvimento de novas cultivares, podendo chegar a 25 ou a 30 anos. Por isso,

tecnologias como a dos marcadores moleculares podem auxiliar e direcionar estes programas de melhoramento e acelerar a obtenção de genótipos superiores (MAHÉ et al., 2008).

Os marcadores moleculares, especialmente os de DNA, são abundantes, apresentam herança mendeliana, não são influenciados pelo ambiente e podem ser detectados em qualquer tipo de tecido e fase de desenvolvimento da planta. Dentre esses marcadores, os microssatélites ou *simple sequence repeat*, ou, ainda, SSR, que se baseiam nas sequências de DNA repetitivo e ocorrem no genoma de todos os organismos. Eles destacam-se pela característica de codominância e elevado conteúdo informativo de polimorfismo, sendo locos genéticos altamente variáveis e multialélicos (TAUTZ; RENZ, 1984; GUPTA; VARSHNEY, 2000; MORGANTE et al., 2002) .

No projeto Genoma Café, há um banco de dados com mais de 200 mil sequências de DNA. Dentre as diferentes estratégias para a utilização destas informações, está a possibilidade de gerar marcadores moleculares que possam estar associados às características de interesse (VIEIRA et al., 2006). Porém, até o momento, não foram identificados marcadores moleculares associados à característica de resistência ao bicho-mineiro em cafeeiros (PINTO et al., 2007)

Nesta pesquisa objetivou-se avaliar marcadores moleculares do tipo EST-SSR e SSR para a detecção da variabilidade existente entre genótipos de *Coffea arabica* para a característica de resistência ao bicho-mineiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

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

### 2.1 Genótipo

Os genótipos foram obtidos do banco de germoplasma do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), em Campinas, SP, e do programa de melhoramento da Fundação Procafé, nos campos experimentais de Coromandel e Boa Esperança, MG.

No banco de germoplasma do IAC, representantes de oito acessos de *C. racemosa* foram utilizados para possível identificação de alelos ligados a estes genótipos e que poderiam estar ligados à característica de resistência ao bicho-mineiro.

O clima do município de Coromandel (latitude, 18°33'34"S; longitude, 46°48'01"W; altitude, 904 m) é classificado como mesotérmico, com temperatura média anual de 22° C e precipitação média de 1474,4 mm. Em Boa Esperança (latitude, 21°05' 15"S; longitude, 45°35'02"W; altitude, 775m) o clima também é mesotérmico, com temperatura média anual de 19 ° C e precipitação média anual de 1500 mm.

Em Coromandel, MG, foram utilizadas 20 famílias em F5 do material Siriema, caracterizadas em campo durante cinco colheitas quanto à tolerância ao bicho-mineiro. Estas famílias, apesar do avançado processo de seleção e do alto grau de homozigose esperado, ainda segregam para a característica de resistência ao ataque de bicho-mineiro. Dessa maneira, com base nos dados de avaliação dos melhoristas, foram escolhidas 10 famílias que apresentavam o maior número de plantas resistentes (R) e 10 famílias que apresentavam o maior número de plantas suscetíveis (S), que estão apresentadas no ANEXO A. É importante frisar que estas famílias tiveram como

origem o cruzamento natural interespecífico entre a espécie *Coffea arabica*, suscetível ao bicho-mineiro e *C. racemosa*, resistente à praga.

Da Fazenda Experimental da Fundação Procafé, em Boa Esperança, MG, foi utilizada uma população em F<sub>6</sub> de três anos, composta por 91 indivíduos. Com esta população, objetivou-se avaliar a segregação de locos SSR polimórficos encontrados a partir do estudo das 20 famílias anteriores.

A caracterização dos indivíduos em Boa Esperança quanto à tolerância ao ataque do bicho-mineiro foi realizada em laboratório no IAC, seguindo a metodologia descrita por (KATIYAR; FERRER, 1968) e adaptada por Parra (1975).

## **2.2 Desenho dos *primers***

A partir dos SSR já disponibilizados no banco de dados do Genoma Café, definiu-se, como estratégia para aumentar a possibilidade de obtenção de marcadores polimórficos, a utilização de SSR-EST aleatórios, ou seja, sem associação direta à característica de resistência ao bicho-mineiro. Assim, escolheu-se, preferencialmente, SSR-EST das classes di e trinucleotídeos, as quais apresentam maior polimorfismo comparada aos tetra, penta e hexa nucleotídeos (PONCET et al., 2004; PINTO et al., 2007). Na Tabela, no ANEXO B, estão apresentadas as bibliotecas, nas quais estão inseridas as sequências utilizadas para o desenho dos *primers* SSR-EST. No banco de dados, estavam também disponíveis o padrão de repetição (PR) e a frequência de repetições no banco (FR) dos SSR-EST. Também foi observado no banco de dados qual o *motif* que mais se repetiu e a porcentagem de cada nucleotídeo repetido *in tandem*.

As 35 sequências de ESTs selecionadas foram salvas no formato FASTA e armazenadas em arquivo de texto. Foi utilizado o programa Primer3 ([www.frodo.wi.mit.edu](http://www.frodo.wi.mit.edu)) (ROZEN; SKALETSK, 2000) para o desenho dos *primers*. Os parâmetros físicos utilizados foram semelhantes com a finalidade de assegurar o desempenho entre os pares de *primers*. A *temperature melting*, T<sub>m</sub>, foi de, no mínimo,



54°C, máximo 65°C e ótima de 60°C, durante o desenho dos *primers*. O percentual de bases CG contido na sequência alvo de DNA foi no mínimo 40% e, no máximo, 55%. O tamanho dos fragmentos amplificados (*amplicon*) variou de 100 a 300 nucleotídeos. O comprimento estipulado para os *primers* foi, no mínimo, de 18, máximo de 22 e ideal de 20 pares de bases.

Foram utilizados também 28 *primers* SSR-EST cedidos pela Embrapa Café/IAC, os quais foram desenvolvidos a partir do banco de dados do Genoma Café, ligados a características que podem estar associadas à resistência ao bicho-mineiro (PINTO et al., 2007). Além destes, mais três *primers*, desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas, disponíveis, na literatura, já caracterizados quanto à ligação à característica de resistência à ferrugem também foram utilizados neste estudo: Sat 225 (F: 5'CAT GCC ATC ATC AAT TCC AT 3'; R: 5'TTA CTG CTC ATC ATT CCG CA3'), Sat 229 (F: 5'TTC TAA GTT GTT AAA CGA GAC GCT TA3'; R: 5'TTC CTC CAT GCC CAT ATT G3') e Sat 259 (F: 5'GCC AAT TGT GCA AAG TGC T-3'; R: 5'ATT CAT GGG GCC TTT GTC TT3') (BARUAH et al., 2003; MONCADA; MCCOUCH, 2004; PONCET et al., 2006; BHAT et al., 2005; HERRERA et al., 2009).

### 2.3 Extração do DNA

As folhas foram coletadas do terço médio de cada planta, pela manhã, ainda úmidas. Em seguida, foram armazenadas em sacos plásticos para posterior extração do DNA, seguindo método de Ferreira e Grattapaglia (1996) com algumas modificações.

As folhas foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido até a obtenção de um pó bem fino. Após isso, foram adicionados, a 200 mg do tecido vegetal, 700 µL do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 100 mM Tris-HCl pH 7,8; 20 mM de EDTA pH 8,0; 1,4 mM NaCl; 2% de β mercaptoetanol) e incubados a 65°C, por 30 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) que foram homogeneizados cuidadosamente por cinco minutos para a obtenção de uma

emulsão, que posteriormente foi centrifugada, por 10 minutos, a 14.000 rpm. Ao sobrenadante foram adicionados mais 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e a emulsão foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos, a 14.000 rpm. Em seguida, foi coletado o sobrenadante e adicionados 400 µL do volume da solução aquosa de isopropanol gelado (-20°C) para a precipitação do DNA e os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm, por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado, por 10 minutos, com 1.000 µL de etanol 70%, a -20°C. Após a secagem, o pellet foi ressuscitado com 50 µL de água ultrapura e autoclavada. Em seguida, foram adicionados 2 µL de RNase (10 mg/mL) e as amostras foram incubadas, a 37°C, por 30 minutos.

O DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nano Vue e a sua qualidade foi avaliada em gel de agarose 0,7%.

## 2.4 Reações PCR

Para avaliar o potencial de obtenção de fragmentos polimórficos, num primeiro *screening*, foram utilizados os DNAs dos oito acessos de *C. racemosa* e os *bulks* provenientes de cada família da população instalada em Coromandel, MG. Os oligonucleotídeos polimórficos foram utilizados para amplificar os fragmentos de DNAs de cada indivíduo das famílias em F<sub>5</sub> e dos indivíduos em F<sub>6</sub>.

Nas reações em cadeia de polimerase, PCR, foram utilizados 1X de tampão de PCR da Invitrogen (Tris-HCl, 200 mM, pH 8,4; KCl, 500 mM); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 400 µM de d’NTPs; 0,3 µM de cada *primer*, 0,5U de DNA Taq polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 94°C, por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C, por 1 minuto; temperatura de anelamento de 55° a 57°C, por 1 minuto, em *touchdown*, 72°C, por 1 minuto e extensão final, a 72°C, por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de acrilamida a 10% por eletroforese a 90 v por 2,5h.

Para revelação, foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas separadas e o gel foram imersos em 1 L de solução fixadora (etanol 10%-ácido acético 0,5%) e mantidos sob lenta agitação, por 15 minutos. Em seguida, o gel foi imerso em solução de coloração 0,2%  $\text{AgNO}_3$ , sob agitação lenta, por 15 minutos. O gel, então, foi lavado com água corrente e revelado com solução NaOH 3% - formaldeído 0,5%. Após a revelação, foi realizada uma análise qualitativa dos produtos, visando caracterização dos alelos com relação ao polimorfismo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 3.388 sequências aleatórias do banco de dados do Genoma Café e identificados 77 ESTs-SSR, do tipo tri e dinucleotídeos repetidos *in tandem*, dos quais foram selecionadas e analisadas 35 sequências SSR, expressas em diferentes bibliotecas (Tabela 1). Na seleção dos SSR levou-se em consideração se as sequências pertenciam a uma biblioteca conhecida e se eram microssatélites perfeitos.

#### 3.1 Desenvolvimento dos *primers*

Com estratégia de utilizar sequências aleatórias buscou-se aumentar a probabilidade de serem identificados marcadores associados à característica de resistência ao bicho-mineiro. Pinto et al. (2007) identificaram 32 SSR-EST, sequências SSR expressas em bibliotecas de folhas, submetidas ou não a algum tipo de estresse, tais como inóculo de patógeno e uso de indutores químicos de defesa, entre outros. Foram priorizadas sequências expressas em folhas infectadas por bicho-mineiro e ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Porém, não foram identificados marcadores ligados à resistência ao bicho-mineiro.

Dentre os SSR disponibilizados no banco de dados, observou-se que os trinucleotídeos foram os *motifs* mais abundantes (39,02%) encontrados no banco de dados do Genoma café, seguidos dos di (35,83%), tetra (1,65%), hexa (0,79%) e pentanucleotídeos (0,38%). A presença de mono-nucleotídeo também foi significativa, representando 22,19% dos *motifs*, porém, esses microssatélites não são muito utilizados por apresentarem um baixo grau de polimorfismo. Poncet et al. (2004) observaram, na análise *in silico*, em ESTs em folhas e frutos de *C. canephora*, que os microssatélites do tipo trinucleotídeos também são os mais abundantes dos *motifs*, seguidos dos di e hexanucleotídeos, representando 34,34%, 25,75% e 22,04%, respectivamente. Os autores relataram também a presença significativa de mononucleotídeo. Em ESTs de gérberas, os dinucleotídeos (42,8%) foram mais

abundantes entre os *motifs* identificados, seguidos dos trinucleotídeos (25,6%) (GONG; DENG, 2010).

Observou-se também, a partir dos SSRs disponíveis no banco de dados do genoma, que os trinucleotídeos AAG/CTT foram os que mais se repetiram no banco de dados (26,17%). Poncet et al. (2004) observaram que o *motif* de trinucleotídeos mais abundante em EST de *C. canephora* foi AGG/CCT (23%) e Vieira et al. (2010) observaram que o padrão de repetição de trinucleotídeos mais encontrado foi TGA/GAA, a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas de *C. arabica*. O padrão de dinucleotídeo mais observado nesta pesquisa foi AG/CT. Estes resultados corroboram os relatados por Poncet et al. (2006), Gong; Deng (2010) e Feng et al. (2009).

O dinucleotídeo mais encontrado no trabalho de Vieira et al. (2010), em *C. arábica*, foi GT/AC. Como estes autores utilizaram bibliotecas genômicas enriquecidas, era esperado resultado divergente do presente trabalho.

A partir das buscas foram verificados o padrão de repetição (PR) e a frequência de repetições no banco (FR) do SSR. O resultado destas análises está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Caracterização das 35 sequências selecionadas do Banco de dados do Projeto Genoma Café

	<b>Contig</b>	<b>Bibliotecas</b>	<b>PR</b>	<b>FR</b>
LEG 1	6239	CL2, PA1	GA	21,5
LEG 2	846	AR1	AC	15,5
LEG 3	2664	FB1, FR2	AT	26,0
LEG 4	2796	AR1, LV9, RX1	AT	26,0
LEG 5	4345	LV9, LP1, SS1	AT	80,0
LEG 6	7115	CL2	TA	15,0
LEG 7	8478	RT8, CS1, RX1	TC	15,5
LEG 8	8911	FB1, LP1	GAG	16,7
LEG 9	10226	FB4	GAT	19,0
LEG 10	10393	LV9	AG	15,0
LEG 11	11764	BP1, CB1, EA1, EB1, EM1, FR4, IC1, RX1, S13, RM1	TGG	27,3
LEG 12	13870	BP1, LV5, S13	TC	20,5
LEG 13	14035	EM1, S13, SH2	GAA	18,0
LEG 14	1174	RX1, FR1	AT	20,5
LEG 15	2291	CL2	CT	16,5
LEG 16	2913	CL2, FB2, LV5, RT5, RX1	CA	27,5
LEG 17	10221	FB4, PC1	CT	22,0
LEG 18	1177	CL2, EA1, FR1, S13, RX1	GCT	10,7
LEG 19	3388	CB1, CS1, FB1, FR2, IA1, IA2, LV5, LV9, RT5, RX1	GAA	22
LEG 20	3982	CS1, FB1, LV5, RX1, RM1	TA	22,0
LEG 21	5374	EA1, S13, SH2	AGG	14,0
LEG 22	5376	EA1	TC	21,5
LEG 23	6480	CA1, RT8, FR4, EA1, RX1, S13	GA	23,0
LEG 24	6708	CA1, FR2, FB1, FB2, BP1, CB1, EA1, IA2, LP1, PA1, S13, SH3, FV2	TC	27,0
LEG 25	7368	LV5, CL2, CB1, IA2	AT	17,5
LEG 26	7797	CS1	ATA	12,7
LEG 27	7861	FB1, CB1	TA	20,0
LEG 28	10553	BP1, FR4, RT3	AGT	11,0
LEG 29	11836	CA1, CL2, CS1, EA1, FR2, FR4, S13, SH2	AG	16,0
LEG 30	12228	LV5	CTG	19,0
LEG 31	13778	AR1, CS1, LV5, S13	CCT	13,3
LEG 32	13853	CS1, RX1, S13	AGA	19,0
LEG 33	11356	CS1, RT8	AG	56,0
LEG 34	11478	CS1, FR4	TA	25,5
LEG35	11696	BP1, CB1, CS1, FR4, IC1, RX1, S13, RM1	AT	23,5

Fonte: Banco de dados do Projeto Genoma Café

### 3.2 Amplificação dos fragmentos

As sequências dos 35 SSR-EST desenhados por meio do programa PRIMER3 estão disponíveis no ANEXO C.

Dos 35 locos de EST-SSR aleatórios, foi observada amplificação de fragmentos em 27 nos bulks e nos acessos de *C. racemosa*. Todos amplificaram fragmentos de tamanho esperado. Dentre estes, nove foram polimórficos, LEG 3, LEG 5, LEG 9, LEG 11, LEG 12, LEG 13, LEG 14, LEG 17 e LEG 28, porém não para a característica de resistência ao bicho-mineiro, 18 foram monomórficos e, no restante, não foi observada amplificação ou estes apresentaram bandas difusas.

Os locos LEG 9, LEG 11, LEG 12, LEG 13, LEG 22, LEG 26, LEG 28 e LEG 32 foram polimórficos entre os acessos de *C. racemosa* e as famílias de *C. arabica* susceptíveis e resistentes, indicando a existência de variabilidade genética entre as duas espécies e de regiões conservadas no genoma dentro do gênero. Poncet et al. (2004) também observaram polimorfismo utilizando *primers* desenvolvidos a partir de EST-SSR de *C. canephora* para sete espécies do gênero *Coffea*, *C. eugenoides*, *C. heterocalys*, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. sp. Moloundou* e *C. pseudozanguebariae*.

É comum observar polimorfismo entre espécies do gênero *Coffea*, principalmente as diploides, usando marcadores SSR. Este fato mostra a diversidade genética entre espécies deste gênero, que podem ser usadas como fonte de variabilidade genética em programas de melhoramento genético (MONCADA; MCCOUCH, 2004; BARUAH et al., 2003; BHAT et al., 2005).

Nos fragmentos amplificados utilizando os nove locos polimórficos foram detectadas diferenças entre os *bulks* de algumas famílias de *C. arabica*, porém, não foi observado polimorfismo ligado à característica de resistência ao bicho-mineiro. A utilização de locos SSR em café é baixa devido ao número limitado de microssatélites (CRISTANCHO; GAITÁN, 2008) e, como se trata de uma espécie de base genética estreita, a probabilidade de encontrar polimorfismo é menor (BARUAH et al., 2003;

VIEIRA et al., 2006). No entanto, estes *primers* têm potencial para outros estudos de mapeamento genético, identificação de cultivares e conservação de germoplasma.

Dentre os 28 *primers* desenvolvidos a partir das bibliotecas de folhas, submetidas ou não a algum tipo de estresse, priorizando infecção do bicho-mineiro e ferrugem, não houve amplificação para apenas três locos, cinco foram polimórficos entre os acessos de *C. racemosa* e o restante apresentou bandas monomórficas para os genótipos suscetíveis em relação aos resistentes. Este resultado foi semelhante ao encontrado por PINTO et al. (2007), porém, para o loco SSR18 não houve polimorfismo associado a genótipos suscetíveis ao bicho-mineiro em relação aos resistentes. Por meio deste *primer* foi possível diferenciar apenas alguns acessos de *C. racemosa*. Foram observadas algumas bandas polimórficas que foram consideradas inespecíficas devido à sua intensidade e baixa repetibilidade.

Por meio dos locos Sat 225 e Sat 229, foi observado polimorfismo entre os genótipos suscetíveis e os resistentes. No perfil de amplificação de alelos amplificados com o *primer* Sat 225 (Figura 1), pode ser observado o alelo com aproximadamente 300 pb, presente tanto nos *bulks* de indivíduos suscetíveis quanto no perfil dos *bulks* resistentes e também nos indivíduos *C. racemosa*. Outro alelo com aproximadamente 270 pb foi verificado nos *bulks* suscetíveis S4, S8, S15, S21, S24, S38, S42 e S48. Para o *primer* Sat 229, observou-se o alelo polimórfico com 190 pb, presente nos indivíduos dos *bulks* S4, S8, S15, S21, S38 e S42.

Herrera et al. (2009), utilizando os *primers* Sat 225 e Sat 229, observaram polimorfismo para resistência à ferrugem entre o parental suscetível, *C. arabica* cv. Caturra e o parental resistente, híbrido proveniente do cruzamento entre *C. arabica* e *C. Canephora* e para indivíduos da população F<sub>2</sub> segregante.

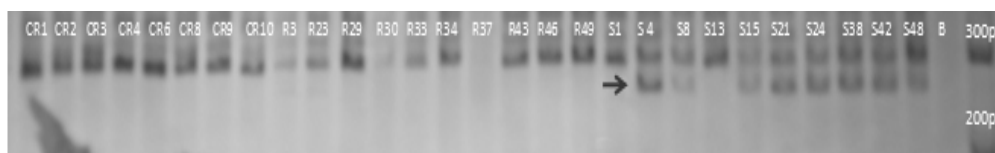


Figura 1 Padrão de amplificação em gel de poli-acrilamida 10% do SSR Sat 225, em indivíduos de *C. racemosa* (CR1, CR2, CR3, CR4, CR6, CR8, CR9, CR10), *bulks* de plantas



resistentes (R3, R23, R29, R30, R33, R34, R37, R43, R46, R49) e plantas suscetíveis (S1, S4, S8, S13, S15, S21, S24, S38, S42, S48) ao bicho-mineiro.

Após screening nos *bulks* segregantes, foram avaliados os dois *primers* polimórficos, Sat 225 e Sat 229, nos indivíduos das famílias em F<sub>5</sub> de Coromandel e em F<sub>6</sub> de Boa Esperança.

O padrão de amplificação do *primer* Sat 225 nos indivíduos das famílias, em geração F<sub>5</sub>, foi igual ao padrão visto nos *bulks*. O alelo de 270 pb, supostamente ligado à susceptibilidade ao bicho-mineiro, esteve presente no perfil de amplificação de 73% dos indivíduos suscetíveis. A ausência do alelo foi observada em 90,9% dos indivíduos resistentes. Por meio do padrão observado quando da utilização dos *primers* Sat 229 observou-se presença do alelo polimórfico de 190 pb em 70,1% dos indivíduos suscetíveis (Figura 2) e ausência do alelo foi verificada em 93,9% dos indivíduos resistentes.

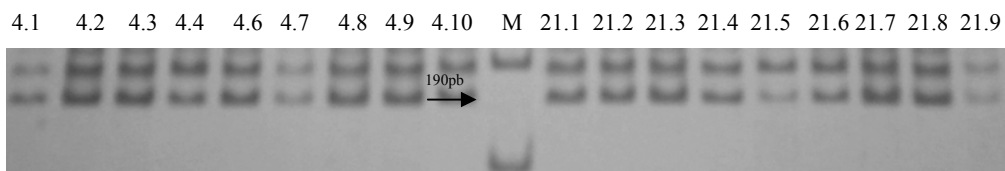


Figura 2 Padrão de amplificação em gel de poliacrilamida 10% do SSR Sat 229, com dois alelos nas famílias S4 (4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10) e S21(21.1, 21.2, 21.3, 21.4, 21.5, 21.6, 21.7, 21.8, 21.9) e marcador molecular de 100 pb (M).

Na avaliação da resistência ao bicho-mineiro na população F<sub>6</sub>, observou-se que 37 indivíduos foram resistentes e 54 susceptíveis à praga. Comparando os resultados para a característica de resistência ao bicho-mineiro avaliada em laboratório e os resultados de amplificação para o *primer* Sat 225, foi verificada a presença do alelo de 270 pb em 90,6% dos genótipos suscetíveis e ausência em 36% dos resistentes.

Pelo padrão de amplificação para o *primer* Sat 229 pode-se observar presença da banda polimórfica de 190pb em 90,9% dos indivíduos susceptíveis. A planta

resistente ao bicho-mineiro que gerou essa população apresentou os alelos polimórficos de 270 pb e o de 190 pb amplificados por esses dois *primers*. Utilizando a combinação destes dois *primers*, aumenta-se a segurança de identificar nas populações genótipos suscetíveis ao bicho-mineiro para a eliminação.

Não foi encontrado um alelo ligado à característica de resistência ao bicho-mineiro. Esse resultado corrobora os dados de Pinto et al. (2007). Segundo Carvalho et al. (2010), a frequência de plantas com resistência a essa praga não tem aumentado, mesmo após quatro gerações de seleção, permanecendo, em média, próxima de 35%, embora algumas famílias apresentem uma frequência mais elevada. Estes resultados mostram que o controle genético da resistência ao bicho-mineiro parece ser mais complexo e não determinado por apenas dois genes, como mencionado por Medina Filho (1977) e Guerreiro Filho et al. (1999). Uma das hipóteses é a de que esta característica é determinada por um mecanismo de pós-transcrição, conhecido como *splicing* alternativo do RNA. Os éxons, regiões codantes, podem ser agrupados de maneira diferente da sequência do alelo transcrito, formando, conseqüentemente, proteínas diferentes, ou seja, um gene pode ter mais de uma tradução. Este processo aumenta a diversidade de proteínas de uma espécie.

Análises no genoma humano revelaram que de 40% a 60% dos genes sofrem *splicing* alternativo (MODRECK; LEE, 2002). Segundo Graveley (2001), o número de genes é pouco para a complexidade de um organismo, o que reforça a teoria do *splicing* alternativo. Em algumas variedades de arroz, o gene OsIM codifica uma oxidase alternativa em condições de estresse salino. Essa enzima atua na remoção do oxigênio reativo, tornando a planta mais resistente à salinidade. Foi verificada também, em variedades de arroz, resistência ao déficit hídrico causada pelo mecanismo de *splicing* alternativo (KAZAN, 2003).

Em relação aos alelos encontrados nos genótipos suscetíveis, os mesmos podem estar relacionados a características que conferem à planta suscetibilidade ao bicho-mineiro. Estas características podem ser substâncias químicas que atraem este inseto, mecanismo de desfolha da planta, dentre outras.

#### 4 CONCLUSÕES

Os *primers* SSR desenvolvidos a partir de EST aleatórios não amplificaram alelos ligados à resistência ao bicho-mineiro.

Os dois alelos polimórficos identificados por meio dos *primers* Sat225 e Sat 229 estiveram presentes em torno de 70% dos genótipos suscetíveis em F<sub>5</sub> e em aproximadamente 90% dos indivíduos suscetíveis em F<sub>6</sub>.

## REFERÊNCIAS

BARUAH, A. et al. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L. showing wide cross-species amplifications. **Molecular Ecology: notes**, v. 3, n. 4, p. 647–650, Oct. 2003.

BHAT, P. R. et al. Identification and characterization of expressed sequence tags-derived simple sequence repeat markers from robusta coffee variety ‘C X R’ (an interspecific hybrid of *Coffea canephora* X *Coffea congensis*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 80-83, Mar. 2005.

BOUCHEZ, A. et al. Marker-assisted introgression of favorable alleles at quantitative trait loci between maize elite lines. **Genetics**, Pittsburgh, v. 162, n. 4, p. 1945–1959, Dec. 2002.

CARVALHO, C. H. S. et al. Desenvolvimento de cultivares de café com resistência ao bicho mineiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 36., 2010, Guarapari. **Anais...** Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2010. v. 36, p. 82-83.

CRISTANCHO, M. A.; GAITÁN, A. Isolation, characterization and amplification of simple sequence repeat loci in coffee. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, p. 321-329, 2008.

FENG, S.P et al. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 23, n.1, p. 85–97, Jan., 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1996. 220 p.

GONG, L.; DENG, Z.; EST-SSR markers for gerbera (*Gerbera hybrida*). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 125–132, Jan. 2010.

GRAVELEY, B. R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. **Trends Genetics**, London, v. 17, n. 2, p. 100–107, Feb. 2001.

GUERREIRO FILHO, O. Coffee leaf miner resistance. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 109-117, Jan. 2006.

GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B.; ESKES, A. B. Expression and mode of inheritance of resistance to leaf miner. **Euphytica**, Dordrecht, v. 105, n. 1, p. 7-15, Jan. 1999.

GUPTA P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers fore genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v. 113, n. 3, p. 163–185, June 2000.

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.

KATIYAR, K. P.; FERRER, F. Rearing technique biology and sterilization of the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (GUÉRIN-MENEVILLE, 1842) (*Lepidoptera:Lyonetiidae*). In: \_\_\_\_\_. **International atomic energy agency**. Vienne: IAEA, 1968. p. 165-175.

KAZAN, K. Alternative splicing and proteome diversity in plants:the tip of the iceberg has just emerged. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 468-471, Oct. 2003.

MAHÉ, L. et al. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 105–113, Jan. 2008.

MEDINA FILHO, H. P.; CARVALHO, A.; MEDINA, D. M. Germoplasma de *C. racemosa* e seu potencial no melhoramento do cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 43-46, Jan. 1977.

MODREK, B.; LEE, C. A genomic view of alternative splicing. **Nature Genetics**, New York, v. 30, n. 1, p. 3-19, Jan. 2002.

MONCADA, P.; MCCOUCH, S. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid coffee species. **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 501–509, June 2004

MONDEGO, J. M. C. et al. Isolation and characterization of *Coffea* genes induced during coffee leaf-miner (*Leucoptera coffeella*) infestation. **Plant Science**, Limerick, v. 169, n. 2, p. 351-360, Aug. 2005.

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.

PARRA, J. R. P. **Bioecologia de *Perileucoptera coffeella* (GUÉRIN-MENEVILLE, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) em condições de campo.** 1975. 114 p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1975.

PINTO, F. O.; MALUF, M. P.; GUERREIRO-FILHO, O. Study of simple sequence repeat markers from coffee expressed sequences associated to leaf miner resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 377-384, mar. 2007.

SOUZA, J. C. de.; REIS, P. R. RIGITANO, R. L. de O. **Bicho-mineiro do cafeeiro:** biologia, danos e manejo integrado. 2.ed. Belo Horizonte: EPAMIG, 1998. 48 p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 54).

PONCET, V. et al. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea spp.*). **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 1071–1081, Dec.,2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols:** methods in molecular biology. Totowa: Humana, 2000. p. 365–386.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.

VIEIRA, E. S. N. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 95-108, Jan. 2006.

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.

**ANEXOS**

**ANEXO A** Famílias em F<sub>5</sub> de *C. arabica* resistentes e susceptíveis ao bicho-mineiro, conduzidas em Coromandel, MG.

<b>Família</b>	<b>Identificação</b>
S1	S1.1, S1.2, S1.3, S1.5, S1.6, S1.7, S1.8, S1.9, S1.10
S4	S4.1, S4.2, S4.3, S4.4, S4.6, S4.7, S4.8, S4.9, S4.10
S8	S8.2, S8.3, S8.5, S8.6, S8.7, S8.8, S8.9
S13	S13.2, S13.3, S13.4, S13.5, S13.6, S13.8
S15	S15.1, S15.2, S15.4, S15.5, S15.6, S15.7, S15.8
S21	S21.1, S21.2, S21.3, S21.4, S21.5, S21.6, S21.7, S21.8, S21.9
S24	S24.1, S24.2, S24.4, S24.5, S24.6, S24.7, S24.8, S24.9, S24.10
S38	S38.1, S38.2, S38.3, S38.4, S38.6, S38.7, S38.8
S42	S42.2, S42.3, S42.5, S42.8, S42.9, S42.10
S48	S48.1, S48.2, S48.3, S48.4, S48.5, S48.6, S48.8, S48.9
R3	R3.1, R3.4, R3.5, R3.6, R3.7, R3.8
R23	R23.2, R23.4, R23.5, R23.8, R23.9
R29	R29.3, R29.4, R29.7, R29.10
R30	R30.1, R30.8, R30.9, R30.10
R33	R33.1, R33.3, R33.4, R33.5, R33.8, R33.9
R34	R34.1, R34.2, R34.6, R34.7, R34.8, R34.10
R37	R37.1, R37.6, R37.7, R37.10
R43	R43.1, R43.3, R43.4, R43.5, R43.8, R43.9, R43.10
R46	R4 R46.1, R46.3, R46.4, R46.5, R46.6, R46.9, R46.10
R49	R49.2, R49.5, R49.7, R49.8, R49.9, R49.10



**ANEXO B** Bibliotecas do Projeto Brasileiro do Genoma Café

<b>Biblioteca</b>	<b>Descrição</b>
CA1	Calo não embriogênico
LV4	Folha ponteiro- ramo ortotrópicos sem BION- longa
LV5	Folha ponteiro- ramo ortotrópico sem BION- curta
LV8	Folha ponteiro- ramos plagiotrópico sem BION- longa
LV9	Folha ponteiro- ramos plagiotrópico sem BION- curta
RT3	Raíz sem BION
RT5	Raíz com BION
CL2	Calo hipocótilo com e sem BION
FR1	Botão floral n.6, chumbinho n.1, frutos estágio 1e 2- longa
FR2	Botão floral n.6, chumbinho n.1, frutos estágio 1e 2- curta
FBI	Botão floral estágio 1e 2- longa
FB2	Botão floral estágio 1e 2- curta
FB4	Botão floral estágio 3 e 4.
RT8	Raíz e células em suspensão com alumínio
BP1	Células em suspensão raiz e folha com BION
RM1	Folha infestada com bicho-mineiro e ferrugem
CB1	Células em suspensão com BION e brassinosteroides
CS1	Células em suspensão com manose, NaCl e KCl
FR4	Frutos de racemosa
EA1	Calo embriogênico de <i>C. arabica</i>
EC1	Calo embriogênico de <i>C. canephora</i>
IC1	Linhagem não embriogênica (folha <i>C. arabica</i> ) sem indução de 2,4D
PC1	Linhagem não embriogênica (folha <i>C. arabica</i> ) com indução de 2,4D
1A2	Linhagem embriogênica (folha <i>C. arabica</i> ) com indução de 2,4D
AR1	Folhas tratadas com ácido araquidônico
LP1	Plântulas tratadas com ácido araquidônico
RX1	Ramos infectados com <i>Xylella</i> spp.
PA1	Linhagem embriogênica (calos primários <i>C. arabica</i> )
S13	Sementes em início de germinação
SH2	Estresse hídrico no campo (pool de tecidos- folhas, ramos, gemas, etc.)
SH3	Estresse hídrico no campo (clone tolerante à seca <i>C. canephora</i> )
FV2	Folha estágio 1, 2 e 3 ( <i>C. racemosa</i> )
SS1	Irrigado no campo (pool de tecidos- folhas, ramos, gemas, etc.)
BB1	Embrião (fruto verde)
EM1	Embrião (semente)
NS1	Raíz com nematóide

---

**ANEXO C Sequência (5'-3') dos locos microssatélites de *Coffea arabica*.**


---

<b>Loco</b>	<b>Sequência</b>
LEG1	F: GTG GCC AGT TGA GTT GCA TA R: GAG ATG AGA TGG GCT TCT TGA
LEG2	F: GGA CAA AGA CGC CTA ATC CA R: CCG TTG CAT GAT AAA CGA CA
LEG3	F: GGA TAT CGC ATC AGC CTC TC R: AGC GGT TTC TTT CTT TG
LEG4	F: CCT TTG AGG TGG TCA GCC TA R: AGA GAA CCC AGG GTC AAG TTT A
LEG5	F: GTC CAT TAG GCA TTT GTT GC G: CTG GCC GCT AAA GAT AAG TAG A
LEG6	F: GGT TTA CCC CAT GAG AGC AG R: CTT GTG CTT GAG CCA TTT CA
LEG7	F: CGA GGA GTT GAT TGC TGG A R: TTC GAG TGA AAT CCC AAT CC
LEG8	F: ACG GAA GAG GCA GAG ACT GA R: CTT CCT TGG ACC CTC ATC AA
LEG9	F: AGG TTT CCA AAG GAG ATG AGC R: GAA GAC AAG TCC ATC GTC CAA
LEG10	F: CAT GAT CAA CCC AAC AGC AT R: TGA ATG TGT ATC GGG AGC AG
LEG11	F: CAC TGA AGG CCT GGA AGA AT R: AGC ATC TGC AGC CTC CAT AG
LEG12	F: CAC CAT AGC AAC TTC AAA CAC G R: CAC ATC CAG GAA CCT TGC TC
LEG13	F: GAA GAG GAA GAA GGG GCA AG R: GTG GTG GAG GAA AGG GAT TC
LEG14	F: AGA GCC CCT TCT CGC TAT GT R: GTT AAC GCC GGA TAT GCT TC
LEG15	F: TCT ATG CAC ACC CTC CAC AA R: AGC ATT GGT TTG CTT CTT GC
LEG16	F: CTG CTT GTT GGC CAT AAT GA R: ACA GTG GAA GAA GGC GAG AG
LEG17	F: TGC GAC ATT TCA CTC TGC AT R: GCC TAT GTT GTG TAC GTG TGC
LEG18	F: CAA ACA ATG GTG ACG TGC TC R: CAA GGC CAG CGA AAA AGA T
LEG19	F: GTT GCC GTC TTC AGC TCT TC R: CAT TGG AAT TGT TGC TGG TG
LEG20	F: ATC TGC AAC GAA AGC TGG AG R: GGC TTT CCT TTG ACA ACT GG
LEG21	F: GGA TGA TGG AAA AGC GAA TG R: GGC CAA GTA GAG AGT GAT TTG C

---

“Continua”

**ANEXO C** Conclusão.

<b>Loco</b>	<b>Sequência</b>
LEG22	F: CTT CAT CTC CCT GCC AAC AC R: TCT TCT AAG GCC AGC AAG GA
LEG23	F: ACA GCA GGG GAA GAG TGT GT R: CCC AAT CTA AGC CCC TGA AT
LEG24	F: CGT AGG CGA ACC AAA AAC TT R: CAG GAC CCA AGG TCA CAT TC
LEG25	F: CGA AGA CGA AGC ACC AAG AT R: TAA TGG GTT CAA CCG GAG TC
LEG26	F: TGA AGC TGC CTC CTG TTT CT R: CGT CAG CTC AAG AAC TGT GC
LEG27	F: ATA GAT TCC AGC GGA AAG CA R: TGC TCC ACA CCA CTG CTA AC
LEG28	F: TGT TCA CAG CTA AAC CCA ACC R: TTG ACG GTG ACG ATG TTG AT
LEG29	F: TGG CTT CCT TGA TGC TTT CT R: TGT GAT GGA ACG CGA ATA TG
LEG30	F: TTG CCA TGT TTC CCA TAC CT R: CAA AGA TCA CCC CTC ATG CT
LEG31	F: ACT ATT GCT CCC CCG GTA TC R: GAC TCG GAG AAC ACG TTG GA
LEG32	F: GGG TGA TGG AAA AGC AAA TG R: CCA GCA TCA GCA AGT AAA AGG
LEG33	F: TGT GAA AAA GCC TCG AGT GA R: TAA CAC GAG GGA GGG AGA GA
LEG34	F: GCA AAC TTG TGG CTG ATC G R: ATC AAA CGC ACC CTG ACA TT
LEG35	F: CCG ATG CTT CCC TAT TTC CT R: CTC TTT GTG GCC ATC GAT CT

**CAPÍTULO 3 Caracterização de genótipos de Coffea arabica por meio de marcadores EST-SSR E SSR**

## RESUMO

A caracterização de genótipos é importante tanto em bancos de germoplasma quanto para o registro de cultivares para a comercialização de sementes e mudas. Para a maioria das espécies, esta caracterização é realizada por meio de marcadores morfológicos. Esses marcadores apresentam algumas limitações para distinção de cultivares de espécies que apresentam estreita base genética como o cafeeiro, principalmente por sofrerem efeito do ambiente e pelo baixo grau de polimorfismo, além de muitos serem avaliados somente nas plantas adultas, o que requer tempo e espaço. Os marcadores moleculares SSR são uma alternativa para a identificação de cultivares de café por apresentarem ampla cobertura do genoma, resultando em um elevado grau de polimorfismo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar, por meio de marcadores SSR, genótipos de *Coffea arabica* com potencial comercial. Foram utilizados 38 *primers*, dos quais 34 foram desenvolvidos a partir de EST, etiquetas de sequência expressa, do Genoma Café, para a caracterização de 12 cultivares e três clones. Foram observados sete locos polimórficos entre os genótipos. Pelo dendrograma obtido a partir dos coeficientes de Jaccard, foi observado um menor valor de similaridade genética, 0,88, entre a cultivar Acauã e os demais genótipos e também se observou similaridade de 100% para sete cultivares e um clone. Foi possível caracterizar as cultivares Acauã, IBC-Palma 2, Sabiá Tardio e Icatu Amarelo IAC 3282 por meio de sete *primers*.

Palavras-chaves: Microsatélites. Registro de cultivares. Cafeeiro.

## CHARACTERIZATION OF GENOTYPES *Coffea arabica* THROUGH EST-SSR AND SSR MARKERS

### ABSTRACT

The characterization of genotypes is important in germplasm banks for the registration of cultivars for the marketing of seeds and seedlings. For the majority of species in this characterization was performed by morphological markers. These markers have some limitations in distinguishing cultivars of species with narrow genetic base as coffee, mainly to undergo environmental effect and a low degree of polymorphism, and many are evaluated only in adult plants, which requires time and space. The SSR markers are an alternative for cultivar identification of coffee because they have a wide coverage of the genome resulting in a high degree of polymorphism. The objective of this study was to characterize genotypes of *Coffea arabica* with commercial potential of using SSR markers. We used 38 primers, with 34 of these were developed from EST, expressed sequence tags, Genome Café, for the characterization of 12 cultivars and three clones. Seven polymorphic loci were observed among genotypes. For dendrogram from Jaccard coefficients, we observed a lower genetic similarity values, 0.88, and between cultivar Acauã the other genotypes and also revealed similarity of 100% for seven cultivars and one clone. It was possible to characterize the cultivars Acauã, IBC- Palma 2, Sabiá Tardio and Icatu Amarelo IAC 3282 by seven primers.

Keywords: Microsatellites. Cultivars registration. Coffee.

## 1 INTRODUÇÃO

Em instituições de pesquisa têm sido desenvolvidas novas cultivares de café resistentes a estresses bióticos e abióticos e com altas produtividades, para atender à demanda do mercado nacional.

Para assegurar o direito do obtentor sobre a cultivar desenvolvida, foi aprovada no Brasil, em 1997, a Lei de Proteção de Cultivares (L. 9456) (Brasil, 2003). Porém, para que uma cultivar seja lançada no mercado, ela não precisa ser protegida, mas deve estar, obrigatoriamente, inscrita no Registro Nacional de Cultivares.

Para a proteção e registro de cultivares têm 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 são expressos somente nas plantas adultas (AGUIAR et al., 2004; Vieira et al., 2010).

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 (TAUTZ; RENZ, 1984; GUPTA; VARSHNEY, 2000; MORGANTE et al., 2002).

Os marcadores microssatélites têm sido utilizados para a identificação de cultivares de café (VIEIRA et al., 2010), batata (MAISON-THIERY et al., 2005), maçã (MOREYA et al., 2011) e cana-de-açúcar (SAWPNA et al., 2010).

Com crescente ênfase na genômica funcional, conjuntos de dados de ESTs (etiqueta de sequência expressa) estão sendo desenvolvidos. Associado a isso, a evolução de ferramentas de bioinformática permite a rápida identificação e o desenvolvimento de marcadores EST-SSR (VARSHNEY et al., 2002; BHAT, et al., 2005). 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.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

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

### 2.1 Genótipo

Foram avaliados 15 genótipos de *C. arabica*, sendo 12 cultivares comerciais e 3 clones resistentes ao bicho-mineiro provenientes da Fundação Procafé (Quadro 1). A genealogia dos materiais está apresentada na Tabela 1.

Quadro 1 Cultivares de *C. arabica*, Fundação Procafé. 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 Acaiá
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

“Continua...”

Quadro 1 “Conclusão”.

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

## 2.2 Desenvolvimento dos *primers*

Em função da estreita base genética do cafeeiro, foram realizadas buscas de microssatélites aleatórios no Genoma Café, preferencialmente das classes de di e trinucleotídeos, que apresentam maior polimorfismo, comparadas aos tetra, penta e hexa nucleotídeos.

Com as sequências selecionadas, por meio do software PRIMER3 ([www.frodo.wi.mit.edu](http://www.frodo.wi.mit.edu)) (ROZEN; SKALETSK, 2000), foram desenhados *primers* que flanqueiam os SSR de tri e dinucleotídeos, considerando os seguintes parâmetros: comprimento mínimo e máximo de 18 pb e 24 pb, respectivamente; porcentagem de CG de 40% a 55%, temperatura de anelamento de 55° a 65°C e produtos de amplificação inferiores a 350 pb. As sequências dos 35 *primers* desenhados estão apresentadas em ANEXO A.

Foram utilizados também um *primer* SSR, P18, desenvolvido a partir de EST do Genoma Café (PINTO et al., 2007), cedido pela Embrapa Café/IAC e três *primers* desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas, Sat 225 (F: 5’CAT GCC ATC ATC AAT TCC AT 3’; R: 5’TTA CTG CTC ATC ATT CCG CA3’), Sat 229 (F: 5’TTC TAA GTT GTT AAA CGA GAC GCT TA3’; R: 5’TTC CTC CAT GCC CAT ATT G3’) e Sat 259(F: 5’GCC AAT TGT GCA AAG TGC T-3’; R: 5’ATT CAT GGG GCC TTT GTC TT3’) (BARUAH et al., 2003; MONCADA; MCCOUCH, 2004; PONCET et al., 2006; BHAT et al., 2005; HERRERA et al., 2009).

### **2.3 Extração do DNA**

As folhas foram coletadas do terço médio de cada planta, pela manhã, ainda úmidas. Em seguida, foram armazenadas em sacos plásticos para posterior extração do DNA, seguindo método de Ferreira e Grattapaglia (1996) com algumas modificações.

As folhas foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido até a obtenção de um pó bem fino. Após isso, foram adicionados, a 200 mg do tecido vegetal, 700µL do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 100mM Tris-HCl pH 7,8; 20mM de EDTA pH 8,0; 1,4mM NaCl; 2% de β mercaptoetanol) e incubados, a 65°C, por 30 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), que foram homogeneizados cuidadosamente, por 5 minutos, para a obtenção de uma emulsão que, posteriormente, foi centrifugada, por 10 minutos, a 14.000 rpm. Ao sobrenadante foram adicionados novamente 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e a emulsão foi homogeneizada e centrifugada, por 5 minutos, a 14.000 rpm. Em seguida, ao sobrenadante foram adicionados 400 µL do volume da solução aquosa de isopropanol gelado (-20°C) para a precipitação do DNA e os tubos foram centrifugados, a 7.500 rpm, por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e pellet foi lavado, por 10 minutos, com 1.000 µL de etanol 70% a -20°C. Após a secagem, o pellet foi ressuscitado com 50 µL de água ultrapura e autoclavada e, em seguida, foram adicionados 2 µL de RNase (10 mg/mL) e as amostras foram incubadas, a 37°C, por 30 minutos.

O DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nano Vue e a sua qualidade foi avaliada em gel de agarose 0,7%.

### **2.4 Reações de PCR**

Nas reações em cadeia de polimerase, PCR, foram utilizados 1X de tampão de PCR da Invitrogen (Tris-HCl, 200 mM, pH 8,4; KCl, 500 mM); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 400

$\mu\text{M}$  de d’NTPs; 0,3  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, 0,5U de DNA Taq polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 94°C, por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C, por 1 minuto; temperatura de anelamento de 55° a 57°C, por 1 minuto, em *touchdown*, 72°C, por 1 minuto, e extensão final, a 72°C, por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de acrilamida 10% por eletroforese a 90 v, por duas horas e 30 minutos.

## 2.5 Análise dos locos SSR

Para revelação, foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas separadas e o gel foram imersos em 1 L de solução fixadora (etanol 10%-ácido acético 0,5%) e mantidos sob lenta agitação, por 15 minutos. Em seguida, o gel foi imerso em solução de coloração 0,2%  $\text{AgNO}_3$  sob agitação lenta por 15 minutos. O gel, então, foi lavado com água corrente e revelado com solução NaOH 3% - formaldeído 0,5%.

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 ( $S_{gij}$ ) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, representado pela seguinte expressão:

$$\text{Coeficiente de Jaccard: } S_{gij} = \frac{a}{a + b + c},$$

sendo

a = presença de banda em ambos os genótipos i e j;

b = presença de banda no indivíduo i e ausência no indivíduo j;

c = ausência de banda no indivíduo i e presença no indivíduo j.

Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, os genótipos foram agrupados pelo Unweighted Pair-Group Method, ou UPGMA, utilizando-se o programa NTSYS versão 2.11 (ROHLF, 1992).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 34 *primers* de EST-SSR, foi observada amplificação de fragmentos em 22. Para os demais não houve amplificação ou eles apresentaram bandas difusas. Foi observado polimorfismo em cinco *primers*; LEG 11, LEG 13, LEG 29, LEG 26, LEG 32 e 17 foram monomórficos. 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. Estes resultados demonstram a estreita base genética do *C. arabica* (LASHERMES et al., 1999; ANTHONY et al., 2002; STEIGER et al., 2002; RUAS et al., 2003; MONCADA; MCCONCH 2004; MALUF et al., 2005; VIEIRA et al., 2010). Isto é devido ao fato de terem sido introduzidos poucos acessos de *C. arabica* no Brasil e também de a maioria das cultivares ser derivada da cultivar Typica. Na Figura 1 pode ser visualizado o perfil de amplificação para o *primer* Sat 225. Observou-se a ausência do alelo de aproximadamente 270 pb para o clone 5(c), e da cultivar Acauã (m). Nesta última foram observados dois alelos, sendo um de aproximadamente 290 pb e outro de 330 pb.

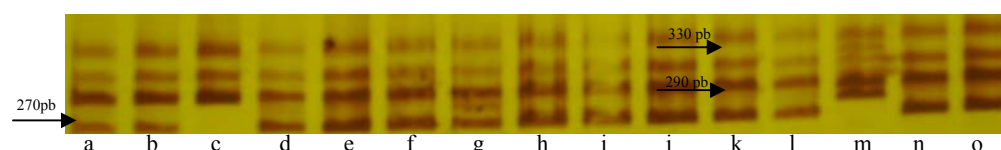


Figura 1 Padrão de amplificação em gel de poliacrilamida 10% do SSR SAT 225, em três clones (Clone 3-a, Clone 12-b, Clone 5-c) e doze cultivares (Catuaí Vermelho IAC 144- d, Mundo Novo IAC 376-4-e, Sabiá Tardio-f, IBC-Palma 2- g, Catucaí Vermelho 2015cv476-h, Catucaí Amarelo 2015 cv479-i, Obatã-j, Icatu Amarelo IAC 3282-k, Bourbon Amarelo-l, Acauã-m, Catuaí Amarelo IAC 62-n, Paraíso-o).

Por meio do padrão de amplificação do *primer* LEG13, observou-se um alelo polimórfico de aproximadamente 240 pb para os genótipos Clone 12(b), IBC Palma 2 (g), Acauã( m) (Figura 2).

O polimorfismo verificado com a amplificação do *primer* Sat225, combinado com o polimorfismo observado com a amplificação do *primer* LEG13, permitiu a identificação única das cultivares Acauã(m), Palma 2(g) e Clone 5 (c) (Figura 2).

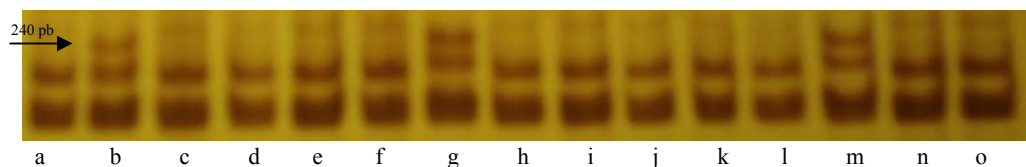


Figura 2 Padrão de amplificação em gel de poliacrilamida 10% do SSR LEG 13, em três clones (Clone 3-a, Clone 12-b, Clone 5-c) e doze cultivares (Catuaí Vermelho IAC 144- d, Mundo Novo IAC 376-4-e, Sabiá Tardio -f, IBC-Palma 2- g, Catuaí Vermelho 2015cv476-h, Catuaí Amarelo 2015 cv479-i, Obatã-j, Icatu Amarelo IAC 3282-k, Bourbon Amarelo-l, Acauã-m, Catuaí Amarelo IAC 62-n, Paraíso-o).

Para o *primer* LEG 11 foi verificado um alelo de aproximadamente 240 pb para as cultivar Sabiá Tardio (f) e um outro alelo de 250 pb para a cultivar Acauã (m) (Figura 3). Para estes dois genótipos foi verificado também um alelo de 170 pb.

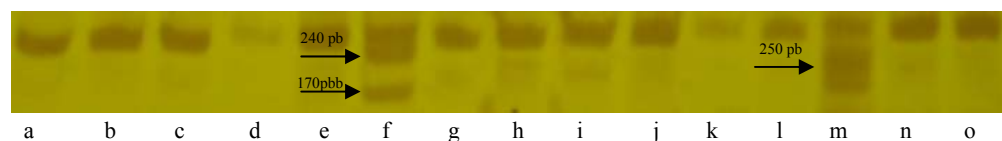


Figura 3 Padrão de amplificação em gel de poliacrilamida 10% do SSR LEG 11, em três clones (Clone 3-a, Clone 12-b, Clone 5-c) e doze cultivares (Catuaí Vermelho IAC 144- d, Mundo Novo IAC 376-4-e, Sabiá Tardio -f, IBC-Palma 2- g, Catuaí Vermelho 2015cv476-h, Catuaí Amarelo 2015 cv479-i, Obatã-j, Icatu Amarelo IAC 3282-k, Bourbon Amarelo-l, Acauã-m, Catuaí Amarelo IAC 62-n, Paraíso-o).

No padrão de amplificação, quando da utilização do *primer* P 18, observaram-se dois alelos de aproximadamente 680 pb e 800 pb para as cultivares Sabiá Tardio (f) e IBC Palma 2(g). O alto peso molecular dos dois alelos indica a presença de introns nestes produtos amplificados, como também observado por Pinto et al. (2007)

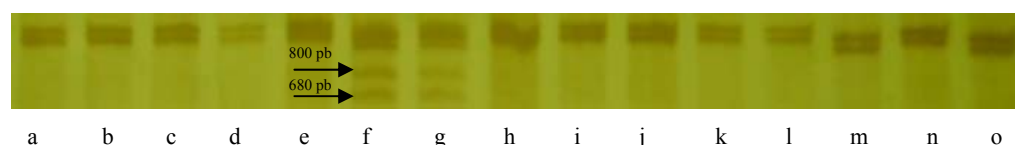


Figura 4 Padrão de amplificação em gel de poliacrilamida 10% do SSR P18, em três clones (Clone 3-a, Clone 12-b, Clone 5-c) e doze cultivares (Catuaí Vermelho IAC 144- d,

Mundo Novo IAC 376-4-e, Sabiá Tardio -f, IBC-Palma 2- g, Catucaí Vermelho 2015cv476-h, Catucaí Amarelo 2015 cv479-i, Obatã-j, Icatu Amarelo IAC 3282-k, Bourbon Amarelo-l, Acauã-m, Catucaí Amarelo IAC 62-n, Paraíso-o).

Por meio do *primer* LEG 29 (Figura 5), foram verificados dois alelos de 270 pb e 330 pb, para a cultivar Icatu Amarelo IAC 3282 (k) e, quando utilizado o *primer* LEG 26, verificou-se um alelo de, aproximadamente, 185 pb para esta mesma cultivar (Figura 6).

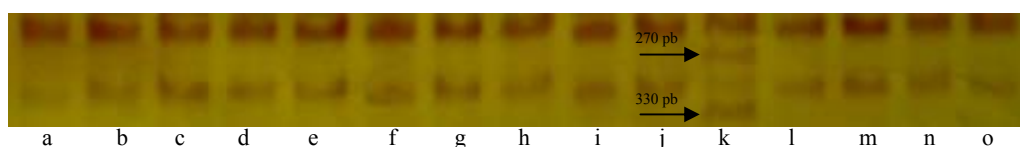


Figura 5 Padrão de amplificação em gel de poliacrilamida 10% do SSR LEG 29, em três clones (Clone 3-a, Clone 12-b, Clone 5-c) e doze cultivares (Catucaí Vermelho IAC 144- d, Mundo Novo IAC 376-4-e, Sabiá Tardio -f, IBC-Palma 2- g, Catucaí Vermelho 2015cv476-h, Catucaí Amarelo 2015 cv479-i, Obatã-j, Icatu Amarelo IAC 3282-k, Bourbon Amarelo-l, Acauã-m, Catucaí Amarelo IAC 62-n, Paraíso-o).

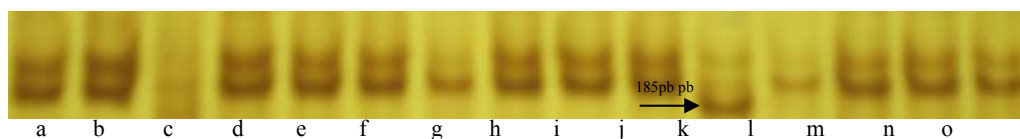


Figura 6 Padrão de amplificação em gel de poliacrilamida 10% do SSR LEG 26, em três clones (Clone 3-a, Clone 12-b, Clone 5-c) e doze cultivares (Catucaí Vermelho IAC 144- d, Mundo Novo IAC 376-4-e, Sabiá Tardio -f, IBC-Palma 2- g, Catucaí Vermelho 2015cv476-h, Catucaí Amarelo 2015 cv479-i, Obatã-j, Icatu Amarelo IAC 3282-k, Bourbon Amarelo-l, Acauã-m, Catucaí Amarelo IAC 62-n, Paraíso-o).

Na Figura 7 pode-se observar um alelo de aproximadamente 350 pb para a cultivar Bourbon Amarelo-l, no padrão de amplificação do *primer* LEG 32.

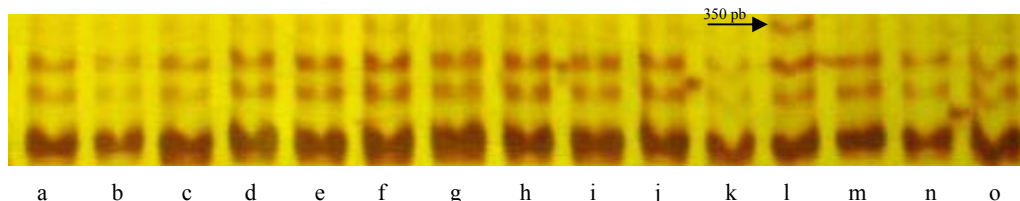


Figura 7 Padrão de amplificação em gel de poliacrilamida 10% do SSR LEG 32, em três clones (Clone 3-a, Clone 12-b, Clone 5-c) e doze cultivares (Catucaí Vermelho IAC 144- d, Mundo Novo IAC 376-4-e, Sabiá Tardio -f, IBC-Palma 2- g, Catucaí Vermelho

2015cv476-h, Catucaí Amarelo 2015 cv479-i, Obatã-j, Icatu Amarelo IAC 3282-k, Bourbon Amarelo-l, Acauã-m, Catucaí Amarelo IAC 62-n, Paraíso-o).

Pelo dendrograma obtido, foi observado menor valor de similaridade, 0,88, entre a cultivar Acauã e os demais genótipos.

A similaridade de 100% foi observada para os genótipos clone 3, Catucaí Vermelho IAC 144, Catucaí Amarelo IAC 62, Catucaí Vermelho 2015 cv.476, Catucaí Amarelo 2015 cv.479, Mundo Novo IAC 376-4, Obatã e Paraíso. Pelos dados de genealogia (Tabela 1), observa-se que cultivar Catucaí Amarelo IAC 62 possui mesma genealogia que cultivar Catucaí Vermelho IAC 144. O que as difere é um alelo mutante para a cor do fruto. 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 Catucaí Vermelho 2015 cv. 476 e Catucaí Amarelo 2015 cv. 479, por terem sido desenvolvidos a partir de um cruzamento entre Icatu e Catucaí, apresentaram alta similaridade genética entre si e também com as cultivares do grupo Catucaí. A cultivar Paraíso H419-10-6-2-5-1 foi desenvolvida de um genótipo do grupo Catucaí, 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 cultivar do grupo Catucaí, explicando, assim, sua alta similaridade genética com estas cultivares.

Vieira et al. (2010) separaram 25 variedades de café analisadas em dois grupos, sendo um das cultivares brasileiras e o outro dos híbridos interespecíficos de *C. arabica*, *C. liberica* e *C. canephora*. Vieira et al. (2010) também observaram, para a maioria das cultivares brasileiras avaliadas, altos valores de similaridade genética. Os autores também não conseguiram separar espécies aparentadas como Catucaí Vermelho e seu mutante Catucaí Amarelo, apesar de serem fenotipicamente diferentes. Estudando a eficiência de marcadores morfológicos para a caracterização de cultivares de *C. arabica*, Aguiar et al. (2004) também não encontraram descritores eficientes para discriminação de cultivares do grupo Catucaí Vermelho e Catucaí Amarelo antes da fase de frutificação.



Foi observada alta similaridade também entre os genótipos 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 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. Já a alta similaridade, 0,946, observada entre as cultivares Sabiá Tardio e IBC-Palma 2, pode ser explicada pelo fato de possuírem em suas genealogias as cultivares Catimor UFV 386 e Catimor UFV 353, respectivamente, que são seleções de um mesmo cruzamento .

Pelo dendrograma foram verificadas diferenças entre os clones resistentes ao bicho-mineiro, isto pode ser explicado pelo fato de estes genótipos serem derivados de plantas de uma população que ainda segrega para várias características.

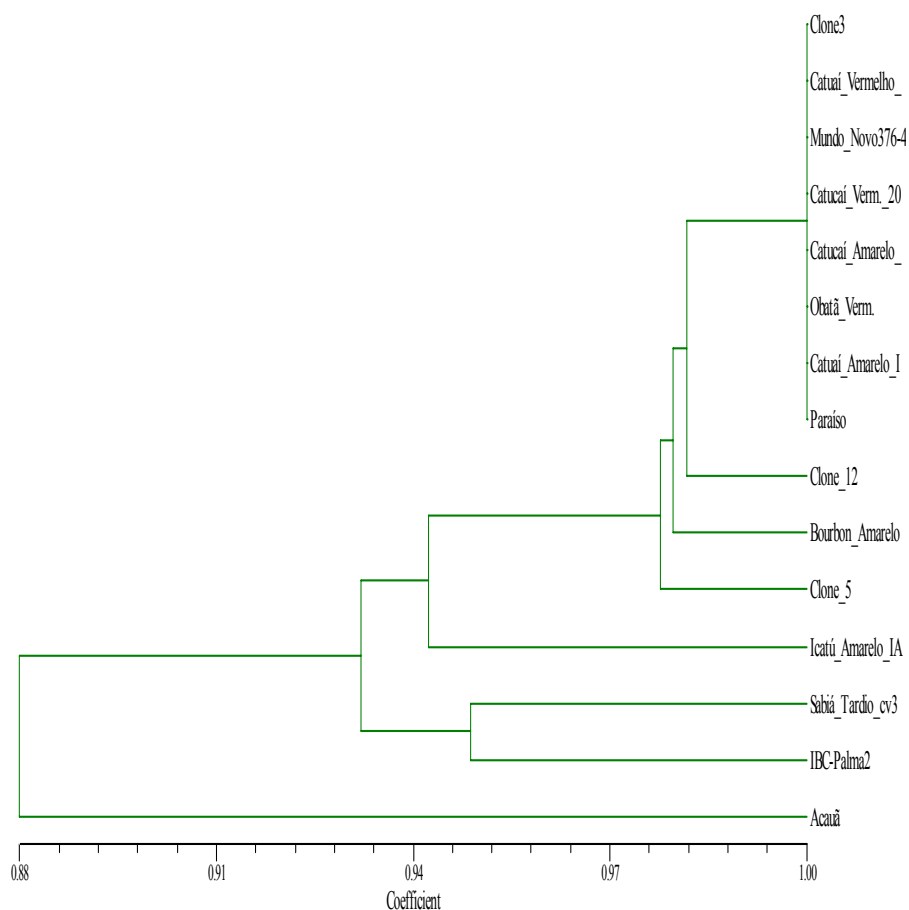


Figura 8 Dendrograma de 15 genótipos de *Coffea arabica* obtido pela análise de agrupamento UFGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores SSR. Lavras, MG, 2011.

Apesar da alta similaridade genética verificada entre os genótipos é importante ressaltar que muitos destes apresentam comportamento agrônômico diferenciado. Diante disto é necessária a utilização de um maior número de *primers* para a caracterização de cultivares. Os SNPs (polimorfismo em um único nucleotídeo) apresentam uma alternativa para estudos como este. Esta técnica possibilita a detecção

de polimorfismo resultante da alteração de uma única base no genoma (RAFALSKI, 2002).

Nunes et al. (2003) utilizaram marcadores AFLP para a caracterização de cultivares elite de *C. arabica* e verificaram eficiência destes marcadores para a distinção de cultivares. A técnica de AFLP apresenta vantagens, tais como detecção de maior número de locus e cobertura ampla do genoma, porém, é muito laboriosa (LOPES et al., 2002). Já CROCHEMORE et al. (2004) distinguiram oito cultivares de *C. arabica* com apenas cinco *primers* RAPD. Esta técnica não é recomendada para a caracterização de cultivares por ser dominante e apresentar baixa reprodutibilidade (COSTA et al., 2008).

#### **4 CONCLUSÃO**

Foi possível caracterizar as cultivares Acauã, Palma 2, Sabiá Tardio e Icatu Amarelo IAC 3282 por meio dos locos LEG 11, LEG 13, LEG 29, LEG 26, LEG 32, P18 e Sat 225.

## REFERÊNCIAS

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.

BARUAH, A. et al. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L. showing wide cross-species amplifications. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 4, p. 647-650, Oct. 2003.

BHAT, P. R. et al. Identification and characterization of expressed sequence tags-derived simple sequence repeat markers from robusta coffee variety 'C X R' (an interspecific hybrid of *Coffea canephora* X *Coffea congensis*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 80-83, Mar. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ato nº.2, de 17 de janeiro de 2003. Estabelece regras para análises de sementes. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jan. 2003. p. 2-3.

COSTA, M. M. et al. Marcadores RAPD para detecção de resistência à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1733-1739, dez. 2008.

CROCHEMORE, M. L. et al. Varietal identification of coffee seeds by RAPD technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 7-11, Mar. 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1996. 220 p.

GUPTA P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v. 113, n. 3, p. 163-185, June 2000.

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.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 261, n. 2, p. 259-266, Mar. 1999.

LOPES, M. S. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biociência**, Uberlândia, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

MALUF, M. P. et al. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 366-373, July 2005.

MOISAN-THIERY, M. et al. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). **Potato Research**, Wageningen, v. 48, n. 3, p. 191-200, June 2005.

MONCADA, P.; MCCOUCH, S. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 501-509, 2004.

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.

MOREYA, S. et al. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 177, n. 1, p. 135-150, Jan. 2011.

NUNES, L. M. et al. Distinção entre cultivares de cafeeiro por AFLP: perspectivas para o registro e proteção. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: MAPA/PROCAFÉ, 2003. v. 1, p. 92.

PONCET, V. et al. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea spp.*). **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 1071-1081, Dec. 2004.

PINTO, F. O.; MALUF, M. P.; GUERREIRO-FILHO, O. Study of simple sequence repeat markers from coffee expressed sequences associated to leaf miner resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 377-384, mar. 2007.

RAFALSKI, J. A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. **Plant Science**, Limerick, v. 162, n. 3, p. 329-33, 2002.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2.11. New York, 1992. 470 p.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. **Bioinformatics methods and protocols**: methods in molecular biology. Totowa: Humana, 2000. p. 365–386.

RUAS, P. M. et al. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter- Simple Sequence Repeat) markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 319-327, July 2003

SWAPNA, M. et al. Single-strand conformational polymorphism of EST-SSRs: a potential tool for diversity analysis and varietal identification in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**. Disponível em <<http://www.springerlink.com/content/b441717481x575m2/>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

STEIGER, D. L. et al. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 2, p. 209-215, Aug. 2002.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E.; Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, Jan. 2005.

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.

**ANEXOS**



**ANEXO A** Sequência (5'-3') dos locos microssatélites de *Coffea arabica*.

<b>Loco</b>	<b>Sequência</b>
LEG1	F: GTG GCC AGT TGA GTT GCA TA R: GAG ATG AGA TGG GCT TCT TGA
LEG2	F: GGA CAA AGA CGC CTA ATC CA R: CCG TTG CAT GAT AAA CGA CA
LEG3	F: GGA TAT CGC ATC AGC CTC TC R: AGC GGT TTC TTT CTT TG
LEG4	F: CCT TTG AGG TGG TCA GCC TA R: AGA GAA CCC AGG GTC AAG TTT A
LEG5	F: GTC CAT TAG GCA TTT GTT GC G: CTG GCC GCT AAA GAT AAG TAG A
LEG6	F: GGT TTA CCC CAT GAG AGC AG R: CTT GTG CTT GAG CCA TTT CA
LEG7	F: CGA GGA GTT GAT TGC TGG A R: TTC GAG TGA AAT CCC AAT CC
LEG8	F: ACG GAA GAG GCA GAG ACT GA R: CTT CCT TGG ACC CTC ATC AA
LEG9	F: AGG TTT CCA AAG GAG ATG AGC R: GAA GAC AAG TCC ATC GTC CAA
LEG10	F: CAT GAT CAA CCC AAC AGC AT R: TGA ATG TGT ATC GGG AGC AG
LEG11	F: CAC TGA AGG CCT GGA AGA AT R: AGC ATC TGC AGC CTC CAT AG
LEG12	F: CAC CAT AGC AAC TTC AAA CAC G R: CAC ATC CAG GAA CCT TGC TC
LEG13	F: GAA GAG GAA GAA GGG GCA AG R: GTG GTG GAG GAA AGG GAT TC
LEG14	F: AGA GCC CCT TCT CGC TAT GT R: GTT AAC GCC GGA TAT GCT TC
LEG15	F: TCT ATG CAC ACC CTC CAC AA R: AGC ATT GGT TTG CTT CTT GC
LEG16	F: CTG CTT GTT GGC CAT AAT GA R: ACA GTG GAA GAA GGC GAG AG
LEG17	F: TGC GAC ATT TCA CTC TGC AT R: GCC TAT GTT GTG TAC GTG TGC
LEG18	F: CAA ACA ATG GTG ACG TGC TC R: CAA GGC CAG CGA AAA AGA T
LEG19	F: GTT GCC GTC TTC AGC TCT TC R: CAT TGG AAT TGT TGC TGG TG
LEG20	F: ATC TGC AAC GAA AGC TGG AG R: GGC TTT CCT TTG ACA ACT GG
LEG21	F: GGA TGA TGG AAA AGC GAA TG R: GGC CAA GTA GAG AGT GAT TTG C

“Continua”

**ANEXO A** “Conclusão”

<b>Loco</b>	<b>Sequência</b>
LEG22	F: CTT CAT CTC CCT GCC AAC AC R: TCT TCT AAG GCC AGC AAG GA
LEG23	F: ACA GCA GGG GAA GAG TGT GT R: CCC AAT CTA AGC CCC TGA AT
LEG24	F: CGT AGG CGA ACC AAA AAC TT R: CAG GAC CCA AGG TCA CAT TC
LEG25	F: CGA AGA CGA AGC ACC AAG AT R: TAA TGG GTT CAA CCG GAG TC
LEG26	F: TGA AGC TGC CTC CTG TTT CT R: CGT CAG CTC AAG AAC TGT GC
LEG27	F: ATA GAT TCC AGC GGA AAG CA R: TGC TCC ACA CCA CTG CTA AC
LEG28	F: TGT TCA CAG CTA AAC CCA ACC R: TTG ACG GTG ACG ATG TTG AT
LEG29	F: TGG CTT CCT TGA TGC TTT CT R: TGT GAT GGA ACG CGA ATA TG
LEG30	F: TTG CCA TGT TTC CCA TAC CT R: CAA AGA TCA CCC CTC ATG CT
LEG31	F: ACT ATT GCT CCC CCG GTA TC R: GAC TCG GAG AAC ACG TTG GA
LEG32	F: GGG TGA TGG AAA AGC AAA TG R: CCA GCA TCA GCA AGT AAA AGG
LEG33	F: TGT GAA AAA GCC TCG AGT GA R: TAA CAC GAG GGA GGG AGA GA
LEG34	F: GCA AAC TTG TGG CTG ATC G R: ATC AAA CGC ACC CTG ACA TT
LEG35	F: CCG ATG CTT CCC TAT TTC CT R: CTC TTT GTG GCC ATC GAT CT