



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

RAFAELLE VECCHIA FERREIRA

**“GENOTIPAGEM DE UMA COLEÇÃO DE *COFFEA*  
*ARABICA* UTILIZANDO MARCADORES  
MICROSSATÉLITES”**

---

Londrina  
2013

RAFAELLE VECCHIA FERREIRA

**“GENOTIPAGEM DE UMA COLEÇÃO DE *COFFEA*  
*ARABICA* UTILIZANDO MARCADORES  
MICROSSATÉLITES”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira.

Coorientador: Dr. Douglas Silva Domingues.

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

F383g Ferreira, Rafaelle Vecchia.  
Genotipagem de uma coleção de *Coffea arabica* utilizando marcadores  
microsatélites / Rafaelle Vecchia Ferreira. – Londrina, 2013.  
61 f.: il.

Orientador: Luiz Filipe Protasio Pereira.  
Coorientador: Douglas Silva Domingues.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Café – Melhoramento genético – Teses. 2. DNA – Teses. 3. Marcadores  
biológicos – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Pereira, Luiz  
Filipe Protasio. II. Domingues, Douglas Silva. III. Universidade Estadual de Londrina.  
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular. IV. Título.

CDU 631.52:633.73

RAFAELLE VECCHIA FERREIRA

**“GENOTIPAGEM DE UMA COLEÇÃO DE *COFFEA ARABICA*  
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira  
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

---

Profa. Dra. Andrea Akemi Hoshino  
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

---

Profa. Dra. Mirian Perez Maluf  
Instituto Agrônômico - IAC

Londrina, 20 de maio de 2013.

Aos meus pais e à minha irmã, família para sempre,  
Ao meu esposo, minha nova família.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo agradeço a DEUS, por cuidar de mim, por ser meu verdadeiro amigo e por ser minha real força. Pelo o que eu sou e por tudo aquilo que Ele me capacita ser.

À minha Grande Mãe, Maria Santíssima, pela sua intercessão e imenso apoio, em todos os momentos de minha vida.

À minha verdadeira mãe, Clarice, pelo exemplo de mulher, esposa e principalmente amiga que me ensinou ser.

Ao meu verdadeiro pai, José Ferreira, por ser um homem digno, responsável e exemplo de honestidade.

À minha irmã Danielle, pelo seu carinho e por toda sua preocupação comigo.

Ao meu esposo Gabriel, minha nova família, por todo o amor, carinho, dedicação e por sempre cuidar de mim.

Ao meu orientador Dr. Luiz Filipe por estar de portas abertas sempre que precisei e pela confiança depositada.

Ao Dr. Douglas por aceitar a co-orientação no exame de qualificação e por todas as sugestões para este trabalho.

À Dra. Giselly por me acompanhar na condução deste trabalho e pela grande ajuda nas análises.

A todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal pelo incentivo e amizade.

Ao Consórcio de Pesquisa Café, CAPES e CIRAD pelo apoio financeiro neste trabalho.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao IAPAR pela oportunidade de estágio e a Universidade Estadual de Londrina por minha formação acadêmica.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

FERREIRA, Rafaelle Vecchia. **Genotipagem de uma coleção de *Coffea arabica* utilizando marcadores microssatélites**. 61 f. 2013. Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de café, além de ser o maior exportador e segundo maior consumidor. O melhoramento tradicional de cafeeiros tem mostrado expressivos resultados em relação ao aumento da produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos. Entretanto, a eficiência do melhoramento convencional é limitada em cafeeiros por ser uma espécie perene, com um longo período juvenil, e com baixa variabilidade genética entre as principais cultivares comerciais. Portanto, a identificação de marcadores moleculares relacionados a características de interesse seria de extrema valia, permitindo maiores ganhos genéticos por ciclo de seleção. Estudos preliminares com os marcadores microssatélites em uma coleção de *Coffea arabica* proveniente do centro de origem (Etiópia) permitiram a seleção de 48 locos microssatélites para futuras análises de diversidade. Neste trabalho validamos 8 locos microssatélites para discriminar novos acessos de *C. arabica* introduzidos na coleção. Estes 8 locos geraram um total de 19 alelos, com uma média de 2,3 alelos por loco. A análise genotípica indicou quais acessos corresponderiam corretamente aos acessos ET34, Java e ET19. Os locos microssatélites utilizados foram eficientes para discriminar os acessos de *C. arabica* provenientes de Camarões e o número de locos utilizado (8) também foi suficiente para a separação entre os acessos com seus respectivos genótipos. Em um segundo trabalho, com a finalidade de aumentar o conhecimento sobre a diversidade molecular dentro do centro primário de origem de *C. arabica*, os 48 microssatélites foram utilizados na análise de 132 genótipos que compõem a coleção da Etiópia, utilizando um sistema semi-automatizado de detecção dos alelos. Os fragmentos de PCR dos 132 genótipos foram separados por eletroforese capilar através do sequenciador automático de DNA. A diversidade genética dos acessos de *C. arabica* foi avaliada pelo número médio de alelos por loco ( $\bar{A}$ ) e pela porcentagem de locos polimórficos (P). Além disso, foi realizada a análise de distância genética, a partir da construção de um dendograma, usando o software DARwin 5. Quarenta e três locos microssatélites produziram 256 alelos para a coleção de *C. arabica* do centro de origem. Trinta e oito deles foram considerados polimórficos segundo a análise dos alelos, com número médio de 6,6 alelos por loco. A porcentagem de locos polimórficos (P) observada foi de 79,16%. Também foi confirmada a transferabilidade de locos desenvolvidos para *C. canephora* para os genótipos de *C. arabica* analisados. O dendograma construído a partir dos dados obtidos separou os genótipos em 2 grandes grupos, porém não houve a separação geográfica entre leste e oeste do Vale do Rift (Etiópia). A técnica semi-automatizada foi eficiente para a genotipagem da coleção da Etiópia, pois houve uma redução de tempo e trabalho no processo de genotipagem.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*. Diversidade. marcadores microssatélites.

FERREIRA, Rafaelle Vecchia. **Genotyping of a collection of *Coffea arabica* using microsatellite markers**. 61 p. 2013. Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

### ABSTRACT

Coffee is one of the main agricultural commodities and Brazil is their largest producer and exporter, being also the second largest consumer market. Coffee breeding has shown impressive results in terms of increased productivity and tolerance to biotic and abiotic stresses. However, the efficiency of conventional breeding is limited. The identification of molecular markers linked to traits of interest would be extremely valuable, allowing greater genetic gain per cycle of selection. Therefore, we start to use SSRs markers to characterize a wild population of *Coffea arabica*, originated from the center of origin, called Ethiopia collection. Preliminary studies with microsatellite markers in this collection allowed the selection of 48 loci for future analyzes of diversity. One initial work reported here, used eight microsatellites to discriminate new accessions of *C. arabica* introduced in the collection. The genotypic analysis of three new accessions, was able to distinguish them and correctly identified the new accessions. In a second work, the 48 microsatellite loci were tested with the 132 genotypes that make up the collection. PCR fragments of 132 genotypes were separated by capillary electrophoresis. The genetic diversity of accessions of *C. arabica* was evaluated by the average number of alleles per locus ( $\bar{A}$ ) and the percentage of polymorphic loci (P). A dendrogram with the genetic distance was built using the software Darwin 5. Forty-three microsatellite loci yielded 256 alleles for the collection of *C. arabica* center of origin. Thirty-eight of them were polymorphic. An average number of alleles per locus 6,6 were found. The percentage of polymorphic loci (P) was 79.16%. It was also confirmed the transferability of loci detected for *C. canephora* for genotypes of *C. arabica* collection. The dendrogram constructed separated the collection into two large groups, but there was no geographical separation between east and west of the Rift Valley (Ethiopia). The semi-automated genotyping technique was efficient to characterize the collection of Ethiopia, with a reduction in both time and effort to perform the work.

**Key words:** *Coffea Arabica*. genetic diversity. microsatellite markers.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>GÊNERO Coffea</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Coffea arabica</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>MARCADORES MOLECULARES</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Marcadores Microsatélites</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Marcadores microsatélites em Coffea</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE GENOTIPAGEM UTILIZANDO SSR</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 1 - Identificação de novos acessos de Coffea arabica introduzidos na coleção da Etiópia do IAPAR</b> .....		
	<b>RESUMO</b> .....	<b>29</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1</b>	<b>Material vegetal</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2</b>	<b>Isolamento do DNA genômico</b> .....	<b>33</b>
<b>2.3</b>	<b>Amplificação dos locos microsatélites via PCR</b> .....	<b>33</b>
<b>2.4</b>	<b>Eletroforese dos fragmentos</b> .....	<b>34</b>
<b>2.5</b>	<b>Análise dos dados</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Genotipagem de uma coleção de Coffea arabica utilizando marcadores microsatélites</b> .....		
	<b>RESUMO</b> .....	<b>40</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>2.1</b>	<b>Material vegetal</b> .....	<b>44</b>

<b>2.2</b>	<b>Isolamento do DNA genômico.....</b>	<b>45</b>
<b>2.3</b>	<b>Amplificação dos microssatélites via PCR .....</b>	<b>46</b>
<b>2.4</b>	<b>Análise dos dados .....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Caracterização dos locos microssatélites .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Transferabilidade dos marcadores microssatélites .....</b>	<b>51</b>
<b>3.3</b>	<b>Diversidade genética.....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café, além de ser o maior exportador e segundo maior consumidor. Duas espécies do gênero *Coffea*, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são cultivadas mundialmente, sendo que a espécie *C. arabica* representa cerca de 70% do café cultivado. Nos dias atuais, devido às exigências cada vez maiores do mercado consumidor e às preocupações com mudanças climáticas, a qualidade do café e a tolerância da planta aos estresses bióticos e abióticos vêm se tornando o foco central da maioria dos programas de melhoramento.

O melhoramento tradicional de cafeeiros tem mostrado expressivos resultados em relação ao aumento da produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos. Entretanto, a eficiência do melhoramento convencional é limitada devido à característica perene dessa espécie, ao longo período juvenil e a complexidade do controle genético das características de interesse, que são, na maioria dos casos, poligênicas, com custos de caracterização altos. Portanto, a identificação de marcadores moleculares relacionados a características de interesse seria de extrema valia, permitindo maiores ganhos genéticos por ciclo de seleção. No entanto, para que isso ocorra, existe a necessidade inicial de um estudo da diversidade da espécie para essas características. Nas Américas, os cultivares de *C. arabica* derivam basicamente de duas variedades botânicas: Typica e Bourbon. Sendo assim, a diversidade genética dos genótipos cultivados é pequena, o que gera restrições tanto para os programas de melhoramento, quanto para os trabalhos de busca de marcadores polimórficos para auxiliarem esses programas. Uma

variabilidade genética maior é encontrada nas coleções de acessos provenientes do centro de origem, a Etiópia, e que podem ser utilizadas como fonte de genes de interesse para o melhoramento do cafeeiro.

O Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) possui uma coleção de 132 acessos de *C. arabica* originários da Etiópia (centro de origem) e a avaliação desses acessos com marcadores moleculares constitui uma ferramenta importante para a caracterização da diversidade genética e para o mapeamento de características de interesse. Esta caracterização genotípica de uma coleção de cafeeiros provenientes da Etiópia será o ponto de partida para o mapeamento de genes ou marcas de interesse agronômico.

Em estudo anterior, foram pré-selecionados 48 locos microssatélites polimórficos a partir de genótipos que representavam parte da diversidade da coleção. Na primeira parte deste trabalho, 8 destes locos microssatélites foram validados através da identificação de novos acessos de *C. arabica* que vieram recompor a coleção da Etiópia do IAPAR.

Visando o trabalho em larga escala para o estudo de toda a coleção da Etiópia, na segunda parte do trabalho, foi implementada a metodologia de genotipagem utilizando um sistema semi-automático de eletroforese capilar associada a detecção por fluorescência em sistema multiplex.

Este trabalho fornecerá subsídios para estudos futuros de associação em *C. arabica* e permitirá, em curto ou médio prazo, a identificação de ferramentas moleculares para os programas de melhoramento dessa espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GÊNERO *Coffea*

Originário da Etiópia, o gênero *Coffea* pertence à família *Rubiaceae* e é formado por cerca de 100 espécies (VIEIRA et al., 2006). Este gênero se divide em quatro seções: *Eucoffea* que apresenta 24 espécies, *Marcarocoffea* com 18 espécies, *Argocoffea* com 11 espécies e *Paracoffea* com 13 espécies. Entre essas seções, a de maior importância econômica é a *Eucoffea*, pois abrange as espécies mais cultivadas para o consumo do café, que por sua vez se divide ainda em subseções, dentre as quais a *Erythrocoffea*, que apresenta as espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (BRIDSON e VERDCOURT, 1988).

A maioria das espécies conhecidas do gênero é diploide ( $2n = 2x = 22$  cromossomos) e predominantemente alógama. *Coffea arabica*, no entanto, é classificada como alotetraploide ( $2n = 4x = 44$  cromossomos), oriundo dos progenitores diploides *Coffea eugenioides* e *Coffea canephora* (LASHERMES et al., 1999) e com um sistema reprodutivo predominantemente autógamo.

Dentro do gênero *Coffea*, comercialmente são importantes as espécies *C. arabica* e *C. canephora* (BARUAH et al., 2003), que correspondem, respectivamente, a 70% e 30% do café produzido mundialmente (YU et al., 2011). A primeira estimativa de produção de café para a safra 2013 indica que o Brasil deverá colher entre 46,98 e 50,16 milhões de sacas de 60 quilos do produto beneficiado (CONAB, 2013).

### 2.1.1 *Coffea arabica*

As principais cultivares comerciais de *C. arabica* derivam, na grande maioria, das variedades Typica e Bourbon, originalmente introduzidas no Brasil em 1727 e 1859, respectivamente (ANTHONY et al., 2001). Com isso, a base genética das cultivares comerciais é estreita e a diversidade molecular observada entre eles é baixa (ANTHONY et al., 2002; STEIGER et al., 2002). Todavia, uma maior variabilidade é observada no centro primário de diversidade de *C. arabica*, que se encontra nos altiplanos do sudoeste da Etiópia (ANTHONY et al., 2001; SILVESTRINI et al., 2007). Prospecções foram organizadas para coletar genótipos originários dessa região pela FAO (1968) e as amostras coletadas foram encaminhadas para seis institutos: na Índia, na Tanzânia, na Etiópia, na Costa Rica, no Peru e em Portugal. Amostras destes acessos foram repassadas por sementes ao IAC, que por sua vez forneceu 132 acessos ao IAPAR. As plantas vêm sendo cultivadas em campo e, nos últimos anos, caracterizadas fenotípica e genotipicamente.

A importância e o valor econômico dos recursos genéticos de *C. arabica*, oriundos da Etiópia, foram discutidos por Hein e Gatzweiler (2006). Estes autores avaliaram algumas características alvo que já foram identificadas como variáveis entre os genótipos da Etiópia como, por exemplo, baixos níveis de cafeína (SILVAROLLA et al., 2004); resistência a doenças e pragas: como *Colletotrichum kahawae* (VAN DER VOSSSEN e WALYARO, 1980); *Hemileia vastatrix* (VAN DER GRAAFF, 1981; KUSHALAPPA e ESKES, 1989); *Meloidogyne incognita* (ANZUETO et al., 2001) e produtividade (BERTRAND et al., 2005). Devido ao seu valor econômico, pois constituem uma grande fonte de alelos para o melhoramento genético, os recursos genéticos de *C. arabica* da Etiópia, vêm sendo caracterizados,

tanto fenotípica (CARVALHO et al., 1983; MONTAGNON e BOUHARMONT, 1996; MAZZAFERA et al., 1990; SILVAROLLA et al., 2004) como molecularmente [LASHERMES et al., 1996 (RAPD); ANTHONY et al., 2001 (RAPD); ANTHONY et al., 2002 (AFLP e SSR); AGA et al., 2003 (RAPD); CHAPARRO et al., 2004 (RAPD); AGA et al., 2005 (ISSR), SILVESTRINI et al., 2007 (SSR)]. Esses estudos mostraram que existe uma diferenciação tanto fenotípica como molecular, quanto a origem do material na Etiópia, entre as regiões Leste e Oeste do Vale do Rift, esta última localizado no centro de origem primário de *C. arabica*. Entretanto, nenhum desses estudos foi planejado especificamente para identificar as associações entre marcadores e características de interesse para o melhoramento genético. No entanto, a análise da estrutura de populações constitui uma fonte de alelos para o melhoramento genético, inclusive para o cafeeiro, fornecendo informações importantes para os programas de melhoramento.

## **2.2 MARCADORES MOLECULARES**

Entende-se como marcador genético qualquer característica, processo bioquímico ou fragmentos de DNA herdável que permitam a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (FALEIRO, 2007). Quando esta característica está relacionada ao DNA, fala-se de um marcador molecular. Quando o marcador possui alterações na sequência de nucleotídeos na molécula de DNA, essas alterações são denominadas de polimorfismos.

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade existente no DNA e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, a natureza do marcador (dominante ou codominante), o custo, a facilidade de uso e a

consistência e repetibilidade, características importantes na escolha do marcador a ser utilizado (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA (MILACH,1998). Na hibridização, uma pequena sequência é marcada radioativamente e ligada ao DNA dos indivíduos, utilizando o princípio de pareamento de bases do DNA. Neste caso enquadram-se os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (MEYER, 2002).

Já aqueles identificados por amplificação de DNA, ou seja, que tem como base a PCR, incluem os marcadores RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), Microsatélites ou SSR (Short Tandem Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e SNP (Single Nucleotide Polymorphism), entre outros (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os primeiros marcadores desenvolvidos que detectavam as diferenças entre indivíduos diretamente no DNA foram os RFLPs (BOREM e CAIXETA, 2006). Porém por seu desenvolvimento apresentar um processo caro e laborioso e, além disso, a utilização de sondas radioativas, esta técnica não permite a automatização de suas etapas, o que torna difícil em estudos de população (BOREM e CAIXETA, 2006). No entanto ainda hoje é encontrado na literatura o uso deste tipo de marcador, como por exemplo, em estudos de diversidade (MISHRA et al, 2012).

Por outro lado, marcadores identificados por amplificação, especialmente RAPDs, são mais fáceis de manipular e de custo menor, embora sejam de resultados menos consistentes. Marcadores microsatélites e AFLP

revelam mais polimorfismo e têm sido as melhores opções para espécies onde este polimorfismo é limitado (MILACH, 1998).

Após o sequenciamento do genoma humano, os marcadores SNPs ganharam mais notoriedade. Com base na detecção de polimorfismos resultantes da alteração de uma única base no genoma, é possível evidenciar a presença de SNPs em espécies vegetais, inclusive em café (MISHRA et al, 2011). Eles podem ocorrer tanto em regiões expressas quanto não expressas, e ao se considerar que muitos desses SNPs estão localizados no interior de regiões gênicas, haverá então uma redução de tempo e custos na obtenção de genes de interesse agrônômico (BOREM e CAIXETA, 2006).

Há uma diferença importante a ser considerada para se escolher qual marcador deverá ser utilizado. Um determinado tipo de marcador que distingue os indivíduos homozigotos dos heterozigotos gera um grande volume de informações para estudos genéticos e para aplicações em programas de melhoramento de plantas. Estes são ditos marcadores codominantes e entre eles encontramos os marcadores RFLP, microssatélites e SNPs. Por outro lado, marcadores ditos dominantes não permitem a distinção de indivíduos homozigotos dominantes de heterozigotos. A presença de determinado fragmento pode ser devido à amplificação dos dois alelos de um loco, no caso de um indivíduo diplóide homozigoto, ou de apenas um alelo, quando a banda é originada da amplificação de um indivíduo heterozigoto. Os marcadores RAPD e AFLP apresentam este tipo de comportamento dominante (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Portanto, os diferentes tipos de marcadores moleculares apresentam suas vantagens e desvantagens. Tendo em vista a codominância e o multialelismo,

os marcadores microssatélites ou SSR são os que possuem maior conteúdo de informação de polimorfismo, ou seja, “PIC” (Polymorphism Information Content) na terminologia de marcadores moleculares. Os altos valores de PIC dos SSRs permitem que, teoricamente, qualquer população segregante possa ser usada como referência para estudos de ligação e mapeamento genético (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

### **2.2.1 Marcadores Microssatélites**

Os genomas de eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem (LIT e LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER e MAY, 1989). Essas regiões são denominadas microssatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*) (BOREM e CAIXETA, 2006) e são encontradas abundantemente em uma ampla diversidade de espécies de eucariotos e procariotos e mesmo no genoma cloroplastidial de plantas (HEARNE et al., 1992; QUELLER et al., 1993; JARNE e LAGODA, 1996). São distribuídas em todo o genoma, flanqueadas por sequências altamente conservadas, e podem ocorrer tanto em regiões codificadoras quanto aquelas que não codificam sequências transcritas (RAMALHO et al, 2012).

A região microssatélite é originada durante a replicação do DNA, devido ao pareamento desalinhado de sequências repetidas, também conhecido como *crossing over* desigual (RAMALHO et al, 2012). Pode acontecer também o deslize da DNA polimerase (*strand-slippage*) durante a duplicação da molécula (LEVINSON e GUTMAN, 1987; SCHLOTTERER e TAUTZ, 1992). Os alelos diferem

porque mostram números distintos de repetições em tandem, devido a um destes mecanismos.

Os microssatélites são classificados em três famílias: repetições puras, compostas e interrompidas. Nas repetições puras, os locos de microssatélites são formados por um único motivo repetido (5' TATTATTATTATTATTAT 3'); nas repetições compostas, mais de um motivo compõem o microssatélite, e nas repetições interrompidas os motivos são intercalados por nucleotídeos que não fazem parte da unidade de repetição (5' CACATTCACACACATTCA3') (PINTO et al, 2001).

As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma espécie, permitindo a seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo (BOREM e CAIXETA, 2006). Os segmentos amplificados a partir destes sítios de anelamento de iniciadores apresentam em geral um elevado polimorfismo, produto da presença de diferenças no número de elementos repetidos. Desta forma, cada sequência repetitiva, independentemente do elemento repetitivo (CA, GC, TG, ATC), constitui-se num loco gênico altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo em relação a uma espécie. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco dentro da população (SILVA, 2009).

Marcadores moleculares microssatélites tem sido desenvolvidos para várias espécies de plantas cultivadas (OLIVEIRA, 2006; MISSIO et al., 2009; PEREIRA, 2010; ALVARENGA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; CUNHA, 2011) devido a alguns fatores, como reprodutibilidade e simplicidade da técnica, pequena

quantidade de DNA requerida, baixo custo, grande poder de resolução e altos níveis de polimorfismo (BORÉM e CAIXETA, 2006). A natureza multi-alélica, herança codominante, alta abundância e ampla cobertura do genoma são fatores que caracterizam os estes marcadores como boas ferramentas para os estudos de diversidade e construção de mapas genéticos (AGGARWAL et al., 2006).

Para a identificação de microssatélites, observam-se as seguintes estratégias: método padrão, método automático e método de sequenciamento (HOSHINO et al., 2012).

No método padrão é necessária a construção de uma biblioteca genômica enriquecida, onde há hibridização com sondas contendo sequências repetitivas, clonagem e sequenciamento de clones hibridizados positivamente e desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) flanqueando os SSRs encontrados. Baruah et al. (2003) desenvolveram nove novos *primers* para identificação de microssatélites a partir de uma biblioteca genômica parcial de um genótipo elite de arábica (*C. arabica* var. HDT – Híbrido-De-Timor). Estes foram testados em genótipos de *C. arabica*, *C. canephora*, outras espécies de *Coffea* e ainda espécies do gênero *Psilanthus*. Entre os genótipos de *C. arabica* os novos *primers* revelaram baixo polimorfismo, quando comparados com os genótipos de *C. canephora*. Já entre as outras espécies de *Coffea* e as do gênero *Psilanthus*, os novos *primers* apresentaram elevado polimorfismo, sugerindo o potencial dos marcadores microssatélites para outras análises de cafeeiro.

Também a partir de uma biblioteca genômica enriquecida, Moncada e McCouch (2004) demonstraram o uso de 34 SSRs no estudo da diversidade entre espécies diploides e tetraploides em *Coffea*. As espécies diploides apresentaram um número médio de alelos por loco superior às espécies tetraploides. No entanto, entre

as espécies tetraploides, aquelas do centro de origem apresentaram um número médio de alelos por loco superior ao das cultivares, demonstrando que aquelas provenientes do centro de origem podem ser usadas como fonte de variação genética para outros estudos.

Com o advento da bioinformática e o acúmulo de informações de sequências genômicas disponíveis nos bancos de dados, o método automatizado vem sendo usado para o desenvolvimento de marcadores SSRs, a partir da análise, por programas computacionais, de sequências de DNA presentes em bancos de dados públicos. Essas sequências de DNA, que são na grande maioria sequências transcritas (ESTs), podem ser analisadas usando diferentes programas de computador hoje disponíveis. Os marcadores SSRs provenientes das ESTs (EST-SSR) possuem a vantagem adicional de serem desenvolvidos a partir de regiões transcritas do genoma, o que pode aumentar sua eficiência na seleção assistida por marcadores (BOREM e CAIXETA, 2006). Um estudo descrito por Bhat et al. (2005) pode exemplificar a origem dos SSRs a partir de ESTs. Nele 14 pares de oligos foram desenhados a partir de uma biblioteca de cDNA de folhas da variedade de café "CxR" (híbrido entre *C. congensis* e *C. canephora*). Os *primers* foram testados e nove deles foram validados, mostrando a potencial utilização destes para análises genéticas do germoplasma do cafeeiro.

Já a metodologia por sequenciamento seria a mais utilizada atualmente. A partir do sequenciamento de um genoma inteiro, ou apenas de uma parte dele, utilizando metodologias de alta capacidade, obtêm-se regiões ricas em microssatélites e a assim pode-se desenhar os *primers* específicos para essas regiões.

Os marcadores SSRs, juntamente com SNPs pela natureza codominante, tem sido os marcadores de preferência para as análises de estrutura de populações (ZHU et al., 2008). A disponibilidade desses marcadores inclusive em estudos prévios de análise de estrutura de populações em cafeeiro (SILVESTRINI et al., 2007, LOPES–GARTNER et al., 2009) pode facilitar a identificação das marcas polimórficas na coleção da Etiópia deste estudo

### **2.2.2 Marcadores microssatélites em *Coffea***

Os estudos de marcadores microssatélites em cafeeiros objetivam suprir a necessidade do desenvolvimento de programas de melhoramento para esta cultura. Dentre eles encontramos o trabalho de Moncada e McCouch (2004), onde foram analisados 34 locos microssatélites na diversidade entre espécies diploides e tetraploides em *Coffea*. O estudo indicou que as espécies tetraplóides provenientes do centro de origem poderiam ser usadas como fonte de variação genética para outros estudos. Silvestrini et al. (2007), utilizou 16 locos microssatélite em 115 acessos de *Coffea*, dentre eles acessos do centro de origem (Etiópia), cultivares comerciais, originados do Yemen e também de outras espécies. Os acessos do centro de origem foram distribuídos em dois grupos, separados de acordo com a origem geográfica, além de um grupo dos cultivares comerciais e outro grupo separado, das demais espécies. Outro exemplo de emprego destes marcadores pode ser observado no trabalho de Hendre et al.(2008) no qual se obteve nove novos locos que poderão ser utilizados em mapas de ligação de *C. canephora*, além de avaliar sua transferabilidade às espécies de cafeeiro relacionadas.

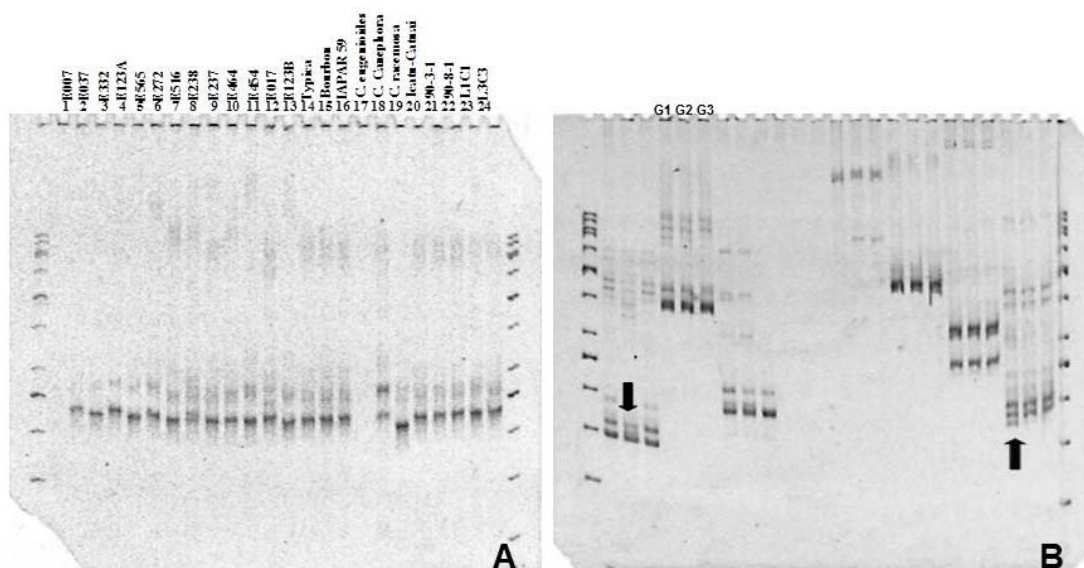
A partir de bibliotecas genômicas ao acaso, Cristancho e Gaitán (2008) identificaram locos de microssatélites para *C. arabica* var Caturra. Dos 12

locos de microsatélites desenvolvidos, 9 foram polimórficos em genótipos diploides (*C. liberica* e *C. eugenioides*), enquanto 5 foram polimórficos em genótipos tetraploides (Híbrido de Timor e *C. arabica* var Caturra), confirmando uma maior diversidade genética em espécies diploides. Com o estudo de Missio et al. (2009), foram construídas duas bibliotecas genômicas enriquecidas, a partir do genótipo de *C. arabica* var Bourbon Amarelo, com o objetivo de desenvolver novos locos microsatélites. Um total de 96 pares *primers* SSR foi desenhado e testado em dois genótipos de *C. arabica* (Híbrido de Timor e Catuaí). Noventa novos locos microsatélites foram validados para futuros estudos genéticos de *C. arabica*.

Outro estudo demonstrou o desenvolvimento de locos microsatélites para identificação de variedades brasileiras de *Coffea arabica*. Vieira et al. (2010) desenvolveu 127 locos microsatélites, 19 deles a partir de análise de banco de dados para *C. arabica* e DNA de cloroplasto e os demais a partir de biblioteca enriquecida de *C. arabica* var Catuaí Vermelho. Estes foram testados em 19 variedades brasileiras de *C. arabica* e em 6 híbridos interespecíficos de *C. arabica*, *C. liberica* e *C. canephora*. Dos 127 locos testados, 22 apresentaram polimorfismo entre as 25 amostras, que foram separadas em 2 grupos, um composto por somente variedades brasileiras e outro de híbridos interespecíficos.

Em trabalho realizado em nosso laboratório (FERREIRA, 2010), 292 locos, desenvolvidos tanto para *C. arabica* quanto para *C. canephora* e construídos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas no *Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD), foram avaliados quanto ao nível de polimorfismo. Um perfil de 24 genótipos foi utilizado, incluindo 13 genótipos da coleção do IAPAR de *C. arábica* (Etiópia), 3 cultivares, 2 outras espécies distintas (*C. canephora* e *C. eugenioides*) e 5 genótipos parentais de

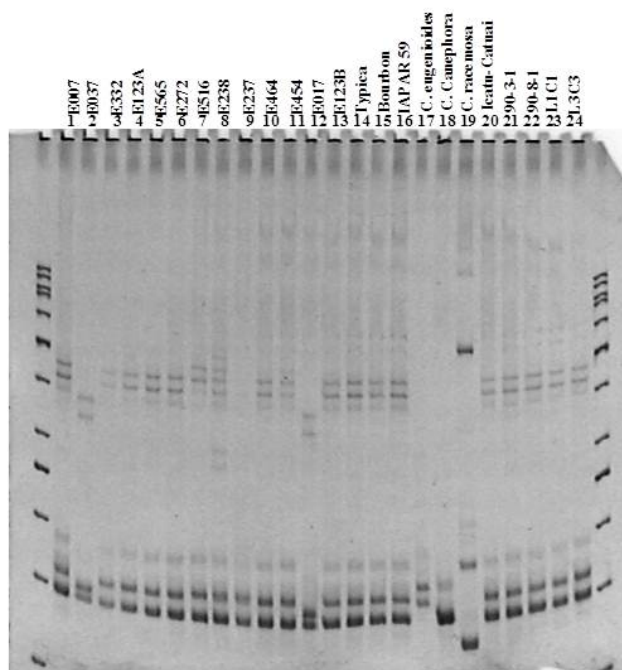
população de mapeamento. Um total de 105 locos foi analisado nos 24 genótipos do painel em estudo (Figura 01A) e o restante foi analisado por uma estratégia dos *pools* de DNA (Figura 01B).



**Figura 1** - Gel de Poliacrilamida revelando o polimorfismo de locos microsatélite em genótipos de *Coffea*. **A** - Perfil de amplificação do loco **270** em genótipos individuais; **B** - Identificação de locos polimórficos pela estratégia de *pools* de DNA (G1, G2 e G3 = grupos). As setas indicam polimorfismos observados dentro dos grupos. Ferreira, 2010.

Foram constituídos grupos de genótipos de *Coffea arabica* com base em dados de diversidade fenotípica. Dentre os genótipos de *C. arabica* utilizados, houve a separação destes em três grupos distintos: um com 6 plantas representando genótipos do leste do Vale do Rift (Etiópia), outro com 8 plantas representando genótipos do oeste do Vale do Rift e um terceiro grupo representado por um único genótipo. Assim pode-se validar grande parte dos *primers* microsatélites.

Os locos microssatélites que revelaram polimorfismos pela estratégia de *pools* de DNA (Figura 01B) foram, após este processo, testados no painel de 24 genótipos em estudo, a fim de validá-los para esta população (Figura 02).



**Figura 2** - Perfil de amplificação do loco **501** na análise com o painel dos 24 genótipos. Ferreira, 2010.

Considerando apenas os acessos da Etiópia, obteve-se 48 (19%) locos microssatélites polimórficos. Destes 48, 14 deles apresentaram mais de dois alelos.

Portanto, neste trabalho prévio, foi possível selecionar os locos microssatélites que poderiam ser utilizados em estudos futuros de diversidade genética e estudos de mapeamento de *Coffea arabica*.

## 2.3 SISTEMAS SEMI-AUTOMATIZADOS DE GENOTIPAGEM UTILIZANDO SSR

Para a genotipagem de coleções ou populações com centenas de indivíduos, é necessário que se estabeleçam sistemas de análise automatizada como, por exemplo, sistemas multiplex com marcação fluorescente. Esta metodologia apresenta uma gama de vantagens sobre as metodologias convencionais, tais como as análises em géis de poliacrilamida, incluindo rapidez e precisão na geração de dados, análise simultânea de vários locos e minimização da manipulação manual (AZEVEDO, 2007).

A PCR múltipla ou multiplex é uma variante da PCR, na qual dois ou mais locos são simultaneamente amplificados na mesma reação ou, ainda, amplificados em reações distintas, mas genotipados simultaneamente. O desenvolvimento de um sistema multiplex requer: 1) seleção de locos de acordo com a variação de tamanho de alelos em cada loco, evitando sobreposição de faixas de alelos em locos marcados com o mesmo fluorocromo; 2) PCR de cada loco sob as mesmas condições de amplificação; 3) PCR múltiplo numa mistura equimolar dos *primers*; 4) ajuste do tempo e temperatura de extensão; 5) ajuste do tempo e temperatura de anelamento; 6) ajuste da quantidade de locos em multiplex; e 7) ajuste da concentração do tampão. Esta técnica tem permitido a ampliação simultânea de vários locos na mesma reação e tornou-se um meio rápido e conveniente para a pesquisa laboratorial (SCHUCK, 2007).

Convencionalmente, a amplificação de fragmentos de DNA via PCR de um ou mais locos microssatélite é realizada utilizando um dos *primers* marcados

com fluorocromo. Em um analisador automático de fragmento, como o ABI3130 XL (Applied Biosystems, USA), os fragmentos são separados e detectados a laser.

Como alternativa de economia de fluorescência, é descrito na literatura (SCHUELK, 2000) a técnica de *primers tailed*, com a utilização de três *primers* em uma mesma reação de PCR. Nesta técnica, em um dos *primers* convencionais, geralmente o *forward*, é acrescentada uma “cauda”, ou seja, uma extensão da região 5' para posterior anelamento de um terceiro *primer*, que estará carregando a fluorescência, se anelando então no complemento da cauda. No entanto é importante que a sequência da cauda seja incomum a sequência do organismo que será genotipado, sendo a sequência do *primer* M13 de plasmídeo bacteriano a mais utilizada como cauda para todas as fluorescências (SCHUELK, 2000).

Desta forma é possível que vários *primers* marcados, cada qual com a sua fluorescência, sejam colocados juntos em um mesmo tríplex. Os grupos (tríplex) são formados não só com base nas cores, mas também baseado no tamanho dos fragmentos identificados em corrida de géis de poliacrilamida, para que não haja sobreposição entre os alelos.

Esta metodologia já foi estabelecida em diversos trabalhos em cafeeiros, tanto em *C. arabica* (SILVESTRINI et al., 2007; LÓPES-GARTNER et al., 2009; TORNINCASA et al., 2010; GELETA et al., 2012; AERTS et al., 2012), como em outras espécies de *Coffea* (TORNINCASA et al., 2010; KRISHNAN et al., 2012). Assim, para o trabalho de genotipagem da coleção de *C. arabica* da Etiópia descrito a seguir, esta técnica foi considerada necessária, devido ao grande número de genótipos e também ao número de locos testados.

Uma reação de PCR com vários *primers* ao mesmo tempo gera vantagens, com a redução de tempo, trabalho e custos. E, a análise de vários locos ao mesmo tempo nesta metodologia semi-automática, gera economia de tempo e aumento da acurácia na coleta de dados e o processamento da informação (AZEVEDO, 2007).

### 3 OBJETIVOS

Os principais objetivos desse trabalho foram:

1. Validar os marcadores microssatélites para discriminação de acessos de *Coffea arabica*;
2. Otimizar o uso de marcadores microssatélites através de um sistema automatizado de detecção;
3. Aumentar o conhecimento sobre a diversidade molecular dentro do centro primário de origem de *Coffea arabica*;

## **CAPÍTULO 1 - Identificação de novos acessos de *Coffea arabica* introduzidos na coleção da Etiópia do IAPAR**

### **RESUMO**

Marcadores microssatélites foram utilizados na discriminação de novos acessos de *Coffea arabica* que foram introduzidos na coleção da Etiópia do IAPAR, provenientes de uma coleção similar na República de Camarões. Inicialmente 46 acessos de Camarões foram repassados para a Embrapa CPAC (Embrapa Cerrados – Planaltina-DF), onde ficaram em quarentena. Em seguida, estes acessos foram transferidos para o IAPAR, porém durante os processos de quarentena e transferência, alguns dos acessos foram misturados. Visando identificar corretamente os acessos e também validar os SSRs previamente identificados, todos os 46 acessos foram analisados em géis de poliacrilamida. Os 8 locos microssatélites utilizados geraram um total de 19 alelos, com uma média de 2,3 alelos por loco. A variação alélica foi de 2 a 3 alelos por loco. Para realizar as análises de divergência genética uma matriz de distância foi computada e utilizada para obter uma árvore (dendograma) de diversidade global. Observou-se 3 diferentes agrupamentos entre os acessos ET34, Java e ET19. A análise genotípica dos diferentes locos microssatélites indicou quais acessos corresponderiam corretamente a ET34, Java ou ET19, já que este último teve o papel de controle positivo. Os marcadores microssatélites foram eficientes para discriminar os acessos de *C. arabica* provenientes de Camarões e o número de locos utilizado (8) também foi suficiente para a separação entre os acessos com seus respectivos genótipos.

## 1 INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética de plantas para a identificação de variedades e testes de identidade genética, para verificar a paternidade de híbridos, para estimar diversidade genética do germoplasma, avaliar a estrutura genética de populações ou para identificar regiões genômicas associadas às características de interesse econômico (LAMAS, 2010).

A identificação de variedades com base em aspectos morfológicos muitas vezes é insuficiente e demorada para espécies perenes, como é o caso de *Coffea arabica*, que apresenta uma diversidade estreita, por se tratar de uma espécie de origem recente (LASHERMES et al., 1999). Deste modo, o uso de marcadores moleculares para distinção de variedades oferece vantagens em relação aos estudos morfológicos, por apresentar uma resposta mais rápida e também por não ser influenciado pelo ambiente (LAMAS, 2010).

Os marcadores microsatélites tem alta capacidade de resolver diferenças genéticas, quando comparados às outras classes de marcadores moleculares. O grande poder de discriminação dos microsatélites justifica seu uso quando se pretende distinguir variedades ou cultivares de uma mesma espécie. Um exemplo está no estudo de Schuck et al. (2010), onde houve a necessidade de uma identificação precisa de variedades de uva Goethe, importante para atender aos requisitos de denominação de origem e indicação de procedência. O sucesso da utilização dos marcadores microsatélites foi confirmado, apontando as duas variedades estudadas como idênticas, porém únicas e diferentes de outras variedades.

Assim, definiu-se a utilização dos marcadores microssatélites para um estudo de identificação de novos acessos de *Coffea arabica* que foram introduzidos na coleção da Etiópia do IAPAR, provenientes de outra coleção que estava presente na República de Camarões. Inicialmente 46 acessos daquela região foram repassados para a Embrapa CPAC (Embrapa Cerrados – Planaltina-DF) onde ficaram em quarentena. Em seguida estes acessos foram transferidos para o IAPAR. No viveiro do IAPAR plantas com etiquetas "ET34" (17 mudas), "Java" (27 mudas) e "ET19" foram recebidas. Porém durante a quarentena e no deslocamento, alguns dos acessos foram misturados, sendo proposta uma avaliação molecular para distinguir os respectivos acessos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi validar os marcadores microssatélites para estudos de identificação de variedades através da discriminação de novos acessos de *Coffea arabica*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Um conjunto de 44 acessos de *Coffea arabica* inicialmente identificados como “ET34” e “Java” foram recebidos da Embrapa CPAC, juntamente com 2 acessos de ET19 (**Tabela 1**). As mudas destes acessos ficaram acondicionadas em viveiros até a coleta de folhas para o isolamento do DNA genômico.

**Tabela 1** - Conjunto de 46 acessos de *C. arabica* e identificação original utilizada na análise com os marcadores microssatélites. ET19 1 e ET19 2 são os controles positivos.

Identificação	Acesso	Identificação	Acesso
1	ET34 1	24	JAVA 7
2	ET34 2	25	JAVA 8
3	ET34 3	26	JAVA 9
4	ET34 4	27	JAVA 10
5	ET34 5	28	JAVA 11
6	ET34 6	29	JAVA 12
7	ET34 7	30	JAVA 13
8	ET34 8	31	JAVA 14
9	ET34 9	32	JAVA 15
10	ET34 10	33	JAVA 16
11	ET34 11	34	JAVA 17
12	ET34 12	35	JAVA 18
13	ET34 13	36	JAVA 19
14	ET34 14	37	JAVA 20
15	ET34 15	38	JAVA 21
16	ET34 16	39	JAVA 22
17	ET34 17	40	JAVA 23
18	JAVA 1	41	JAVA 24
19	JAVA 2	42	JAVA 25
20	JAVA 3	43	JAVA 26
21	JAVA 4	44	JAVA 27
22	JAVA 5	45	ET19 1
23	JAVA 6	46	ET19 2

## 2.2 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi isolado a partir de folhas de mudas pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990). Aproximadamente 5 g de folhas de cafeeiro foram maceradas em nitrogênio líquido e acondicionadas em tubos falcon de 50 ml. Após a maceração seguiu-se os passos descritos em Brasileiro e Carneiro (1998), com as modificações necessárias para evitar a oxidação do material e para purificar o DNA obtido, como a adição de 0,4 ml de metabissulfito de sódio 10% ao tampão de extração e purificação com fenol-clorofórmio, respectivamente.

Após a extração, a qualidade e a integridade do DNA extraído foi verificada por gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria.

## 2.3 Amplificação dos locos microssatélites via PCR

Foram utilizados 8 locos microssatélite (**Tabela 2**) para as análises de genotipagem, sendo que estes foram escolhidos por apresentarem resultados polimórficos em trabalho anterior (FERREIRA, 2010).

**Tabela 2** - Lista dos locos microssatélites utilizados nas análises dos 46 novos acessos de *C. arabica* introduzidos na coleção do IAPAR

Loco	Amplitude do Loco (pb)	Espécie	Tipo de repetição	Cod. Internacional	Lab. de Origem
260	120 - 180	<i>Coffea arabica</i> , clone Zapll.47	(CT)9(CA)8(CT)4(CA)5	AJ250260	IRD
270	215 - 255	<i>Coffea arabica</i> var HTD, clone 1-D8	(CA)10(TA)8	AY220270	CCMB
350	430 - 470	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(GT)8	AM231550	CIRAD-IRD
414	120 - 180	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(CA)9	AM408638	CIRAD-IRD
501	130 - 170	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(TG)8	AM231576	CIRAD-IRD
503	180 - 220	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(AC)9	AM408715	CIRAD-IRD
512	185 - 270	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(AC)11	AM408724	CIRAD-IRD
514	320 - 360	<i>Coffea canephora</i> , clone126	(AC)8	AM408726	CIRAD-IRD

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 10 µl, contendo 25 ng de DNA genômico, 2 µl do tampão 5X (Green Go Taq®

Flexi – Promega), 1,6 mM de dNTPs (dNTP–Solução Mix – Amresco), 0,5 mM de  $MgCl_2$ , 1  $\mu M$  de cada primer (*forward e reverse*) e 1 U de Taq DNA polimerase (Go Taq<sup>®</sup> Flexi – Promega). As amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp<sup>®</sup> - PCR System 9700 (Applied Biosystems), com o seguinte programa: 95°C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos de 95°C por 50 segundos; 50°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

## 2.4 Eletroforese dos fragmentos

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 10%, por aproximadamente 4 horas. Para estimar os tamanhos dos fragmentos, foi utilizado marcador com fragmento de DNA padrão com escala de 50 pb. Os fragmentos foram corados com brometo de etídio e a aquisição da imagem foi realizada através do sistema digital Kodak KS 120.

## 2.5 Análise dos dados

Os fragmentos separados nos géis de poliacrilamida correspondem aos diferentes alelos para cada loco. Os dados tabulados foram utilizados para acessar o número de alelos e a frequência alélica por loco. Para realizar as análises de divergência genética, uma matriz de distância foi computada utilizando o *software* DARwin 5 (PERRIER et al. 2003). Esta matriz foi utilizada para obter uma árvore (dendograma) de diversidade global, esperando-se assim identificar corretamente os diferentes acessos de *C. arabica*, segundo seus genótipos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

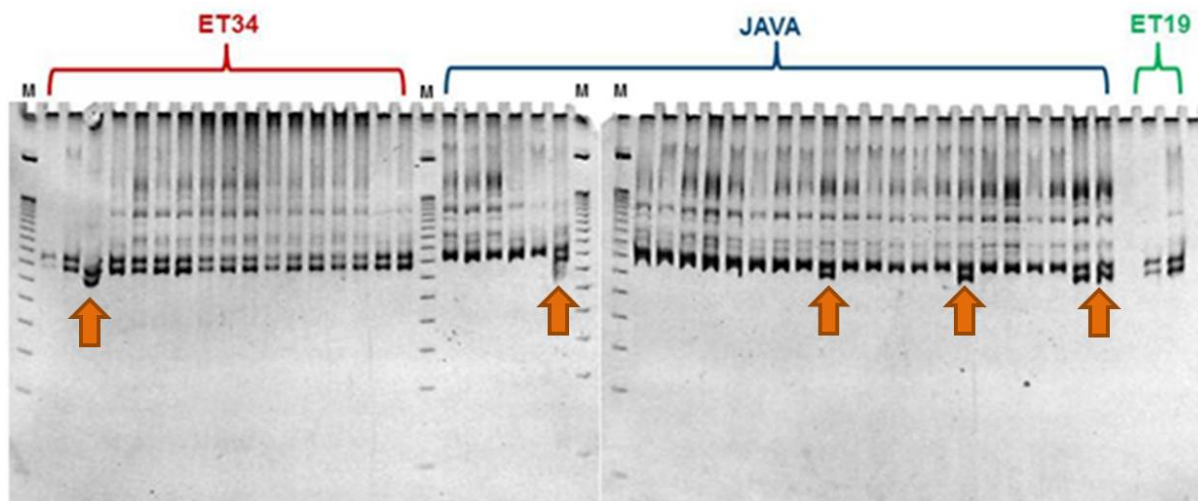
Os géis de acrilamida foram analisados e foi observado um total de 19 alelos, com uma média de 2,3 alelos por loco microssatélite. A variação alélica foi de 2 a 3 alelos por loco. A relação dos alelos encontrados e suas frequências absolutas e relativas constam na **Tabela 3**.

**Tabela 3** - Frequências alélicas encontradas nos 46 novos acessos de *C. arabica* introduzidos na coleção da Etiópia do IAPAR após análise com SSR.

Loco	Nº de Alelos	Frequência Absoluta				Frequência Relativa			
		a	b	c	Total	a	b	c	Total
270	2	46	46		92	0.5	0.5		1
350	2	23	46		69	0.3	0.7		1
414	2	30	46		79	0.4	0.6		1
503	2	46	46		92	0.5	0.5		1
514	2	46	46		92	0.5	0.5		1
260	3	9	38	45	92	0.09	0.41	0.5	1
501	3	46	46	46	130	0.3	0.3	0.3	1
512	3	2	29	46	77	0.03	0.37	0.6	1

De acordo com os dados encontrados anteriormente (Ferreira, 2010), apenas o loco 270 permaneceu apresentando 2 alelos distintos observados. Os demais locos (350, 414, 503, 514, 260 e 501) apresentaram, neste estudo, um número menor de alelos do que foi observado anteriormente. No entanto o alelo 512, que havia apresentado 2 alelos distintos no trabalho de seleção de marcadores polimórficos, apresentou neste estudo um alelo a mais, diferente dos anteriores.

Os 17 genótipos de ET34 e os 27 genótipos de Java foram avaliados com os 8 locos microssatélites selecionados (**Tabela 2**) e apresentaram perfil eletroforético como o da **Figura 1**.



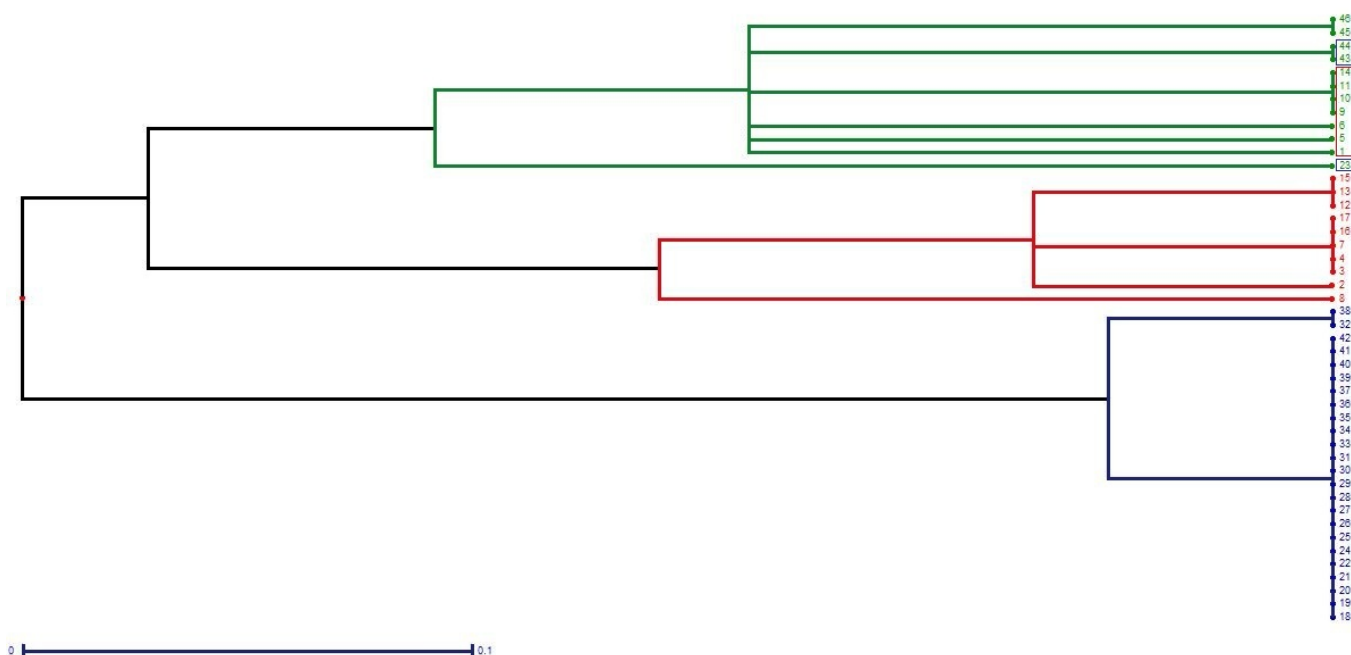
**Figura 1** - Perfil eletroforético dos acessos de *C. arabica* de Camarões para o loco 350. Em vermelho, os acessos etiquetados como ET34, em azul os etiquetados como Java e em verde os acessos identificados como ET19 (controle). **M** – Marcador de peso molecular. As setas indicam as contaminações de ET19 tanto em Et34 como em Java.

No perfil eletroforético para o loco microssatélite 350 observa-se que tanto nos acessos etiquetados como ET34 como nos etiquetados como Java há “contaminações” de ET19, ou seja, os alelos encontrados para o controle são os mesmos encontrados em ambos os genótipos etiquetados de maneira inadequada.

Com as informações obtidas de todos os alelos foi construído um dendograma para a verificação de diversidade entre os acessos analisados. Esperava-se 3 diferentes agrupamentos entre os acessos ET34, Java e ET19, o que foi observado (**Figura 2**). A análise genotípica dos diferentes locos microssatélite indicou quais acessos corresponderiam corretamente a ET34, Java ou ET19, já que este último teve o papel de controle, pois eram as únicas plantas onde não havia erro de identificação.

O dendograma gerado é apresentado na **Figura 2**. De acordo com as análises realizadas, em **verde** estão os acessos ET19, em **vermelho** os acessos ET34 e em **azul** os acessos Java. Observa-se que dos inicialmente 17 acessos

ET34, 7 se agruparam com o controle ET19 e dos 27 acessos inicialmente Java, 3 estão no grupo com ET19. Portanto, dentre os acessos analisados, há somente 10 correspondentes ao genótipo ET34 e 24 correspondentes ao genótipo Java.



**Figura 2** - Estruturação da diversidade genética encontrada em 46 acessos de *C. arabica* proveniente de Camarões, obtida por marcadores microssatélites. No agrupamento verde, correspondente aos acessos ET19, os acessos destacados em azul tinham a classificação de Java; já os destacados em vermelho tinham a classificação de ET34.

O dendograma também revela que muitos acessos, tanto em ET19, ET34 e em Java, podem ser considerados clones de uma mesma planta. Observando a distribuição, tem-se 7 acessos de ET19, 4 acessos de ET34 e apenas 2 acessos de Java. No total, portanto, houve a introdução de 13 novos acessos à coleção da Etiópia do IAPAR, provenientes da coleção da República de Camarões.

De acordo com Mittal e Dubey (2009), a diversidade genética pode ser avaliada com os marcadores microssatélites entre diferentes indivíduos da mesma espécie, como é o caso deste estudo. Assim, foi possível a discriminação dos grupos por este marcador.

A discriminação, ou seja, a distinção de uma cultivar de outra é prática utilizada para proteger os direitos de propriedade intelectual de novas variedades por empresas comerciais (WANG et al., 2009). Isto foi demonstrado por Schuck et al. (2010) com a seleções de uva Goethe, visando atender aos requisitos de denominação de origem e indicação de procedência. No caso dos acessos estudados neste trabalho, não havia a necessidade destes requisitos, porém os marcadores microssatélites fizeram seu papel na distinção e correta discriminação de genótipos de cafeeiro.

#### 4 CONCLUSÕES

Os 8 locos microssatélites utilizados foram suficientes e eficientes para discriminar os acessos de *C. arabica* provenientes de Camarões, entre os seus 3 genótipos.

Um total de 19 alelos foi observado, com uma média de 2,3 alelos por loco microssatélite.

Treze novos acessos, provenientes da coleção da República de Camarões, foram introduzidos na coleção de *C. arabica* da Etiópia alocada no IAPAR.

## CAPÍTULO 2 - Genotipagem de uma coleção de *Coffea arabica* utilizando marcadores microssatélites

### RESUMO

O Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) possui uma coleção de 132 acessos originários da Etiópia (centro de origem) e a avaliação desses acessos com marcadores moleculares constitui uma ferramenta importante para caracterização da diversidade genética. A partir de dados de 292 locos microssatélite analisados anteriormente, foram selecionados os 48 locos mais informativos para a coleção da Etiópia. Para essa seleção foram levados em consideração o seu polimorfismo, sua distribuição ao longo do genoma, sua frequência alélica e seu valor do Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC). Os fragmentos de PCR dos 132 acessos foram separados por eletroforese capilar através do sequenciador automático de DNA. A determinação de alelos foi realizada utilizando-se o software Gene Mapper® ID. A diversidade genética dos acessos de *C. arabica* foi avaliada pelo número médio de alelos por loco ( $\bar{A}$ ) e pela porcentagem de locos polimórficos (P). Além disso, foi realizada a análise de distância genética, a partir da construção de um dendograma, usando o software DARwin 5. Quarenta e três locos microssatélites produziram 256 alelos para a coleção de *C. arabica* do centro de origem. Trinta e oito deles foram considerados polimórficos segundo a análise dos alelos. Um número médio de 6,6 alelos por loco foi encontrado. A porcentagem de locos polimórficos (P) observada foi de 79,16%. Também foi confirmada a transferabilidade de locos desenvolvidos para *C. canephora* para genótipos de *C. arabica*. O dendograma construído a partir dos dados obtidos separou os acessos em 2 grandes grupos, porém não houve a separação geográfica entre leste e oeste do Vale do Rift (Etiópia). A técnica semi-automatizada foi eficiente para a análise da coleção da Etiópia, pois houve uma redução de tempo e trabalho no processo de genotipagem.

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma das commodities agrícolas mais importantes do mundo. O Brasil ocupa posição de destaque, sendo o maior produtor e exportador mundial, e o segundo maior consumidor da bebida. Essa liderança mundial é resultado, em parte, dos esforços da pesquisa brasileira para colocar à disposição dos agricultores cultivares com alta capacidade produtiva. O melhoramento tradicional do cafeeiro tem mostrado resultados expressivos. Entretanto, a base genética das cultivares comerciais de *C. arabica* é bastante limitada e a diversidade molecular observada entre elas é baixa, dificultando os trabalhos de genética e melhoramento.

Para evitar as limitações da estreita base genética utilizada em melhoramento e conseqüentemente da baixa diversidade molecular em *C. arabica*, trabalhos de busca de marcadores podem, alternativamente, explorar a maior diversidade existente em genótipos provenientes do centro primário de diversidade desta espécie.

Os marcadores microssatélites têm fornecido informações em estudos de diversidade genética (MONCADA e MCCOUCH 2004), considerados os marcadores ideais para este fim devido às vantagens que apresentam como alta reprodutibilidade, não requer radioatividade, são conservados entre espécies, apresentam um maior conteúdo informativo por loco, além de serem automatizáveis em sistemas multiplex (AZEVEDO, 2007).

Trabalhos visando a automação da genotipagem com microssatélites vêm sendo desenvolvidos. Silvestrini et al. (2007) utilizaram a técnica de multiplex para caracterização de 115 acessos das espécies de *C. arabica*, *C.*

*eugenioides*, *C. racemosa* e *C. canephora*. Houve, neste caso, a separação dos acessos por origens geográficas, de acordo com o centro de origem de *C. arabica* (Etiópia). Além disso, o estudo mostrou, como esperado, uma baixa diversidade genética entre as plantas cultivadas, porém uma diferença genética significativa entre os acessos da Etiópia não cultivados.

Outro trabalho que utilizou a metodologia multiplex em cafeeiro foi desenvolvido por López-Gartner et al. (2009). Neste estudo, foram utilizados 47 locos microssatélite a fim de avaliar a variabilidade genética e a estrutura populacional de 68 acessos de *C. arabica*, além de três espécies diplóides. Como esperado, três grupos foram formados, referentes às três espécies diplóides, além de um grupo correspondente aos acessos de *C. arabica*. Estes também foram separados de acordo com a origem geográfica.

Um estudo recente com a mesma metodologia utilizou 12 locos microssatélite para avaliar 260 plantas, de 26 populações distintas de cafeeiros da Nicarágua (GELETA et al., 2012). Foram encontrados 8 locos polimórficos para essas plantas, indicando que o nível de diversidade genética de *C. arabica* daquele país é muito baixo.

Visto a utilização com sucesso da metodologia multiplex em muitos estudos com cafeeiro, em especial, com *C. arabica*, foi proposto a implementação desta metodologia no laboratório e estudo da coleção originada da Etiópia encontrada no IAPAR.

Entre os anos de 1964-1965 foram coletados acessos de *C. arabica* do seu centro primário de diversidade na Etiópia (FAO, 1968). As amostras colhidas foram encaminhadas para seis institutos (Índia, Tanzânia, Etiópia, Costa Rica, Peru,

Portugal). Amostras destes acessos foram repassadas por sementes ao IAC que por sua vez forneceu 132 acessos ao IAPAR. De cada acesso original o IAPAR mantém de uma a 12 plantas, com um total de 700 cafeeiros.

Portanto neste trabalho esperamos estabelecer a metodologia de genotipagem multiplex e avaliar a diversidade genotípica dos acessos de *C. arabica* da Etiópia, para posteriormente iniciarmos estudos de estrutura desta coleção.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Foram escolhidos, de acordo com critérios fenotípicos, 132 acessos, isto é, uma planta de cada acesso correspondente. A grande maioria tem origem na região Oeste do Vale do Rift (124 genótipos) e oito acessos são da região leste (províncias de Harar e Sidamo) (**Tabela 1**).

As coletas da coleção foram realizadas no período de agosto a dezembro de 2010, após foi iniciado o processo de extração do material genômico dos genótipos coletados. Todo o material foi macerado em nitrogênio líquido e armazenado em tubos falcon em ultra freezer até a etapa de extração.

**Tabela 1 -** Lista com os 132 acessos de *C. arabica* e suas respectivas origens geográficas em relação ao Leste (L) e oeste (O), do Vale do Rift, na Etiópia.

Acesso	Nº na Coleção	Origem Geográfica	Acesso	Nº na Coleção	Origem Geográfica	Acesso	Nº na Coleção	Origem Geográfica
1	007/87	L	45	Caf075	O	89	022/163	L
2	017/46	L	46	Caf076	O	90	174/164	O
3	123/121	O	47	Caf078	O	91	130/169	O
4	237/171	L	48	Caf079	O	92	494/173	O
5	272/175	O	49	Caf081	O	93	340/179	O
6	332/24	O	50	Caf083	O	94	169/180	O
7	454/107	O	51	Caf085	O	95	486/189	O
8	516/069	O	52	Caf090	O	96	208/193	O
9	565/10	O	53	Caf091	O	97	087/194	O
10	408/001	O	54	Caf093	O	98	370/196	O
11	420/004	O	55	Caf094	O	99	218/199	O
12	344/008	O	56	Caf095	O	100	221/214	O
13	021/011	L	57	Caf096	O	101	338/218	O
14	146/012	O	58	Caf097	O	102	335/219	O
15	190/013	O	59	Caf098	O	103	460/235	O
16	068/014	O	60	Caf099	O	104	481/238	O
17	233/015	O	61	Caf101	O	105	124/245	O
18	152/017	O	62	Caf104	O	106	351/248	O
19	131/018	O	63	Caf106	O	107	148/254	O
20	046/021	O	64	Caf107	O	108	071/258	O
21	209/031	O	65	Caf108	O	109	047/267	O
22	327/032	O	66	Caf111	O	110	442/279	O
23	088/035	O	67	409/114	O	111	331/280	O
24	534/036	O	68	196/117	O	112	254/284	O
25	Caf040	O	69	546/118	O	113	016/298	O
26	Caf041	O	70	189/119	O	114	023/308	O
27	038/043	O	71	044/122	O	115	552/323	O
28	270/044	O	72	326/124	O	116	181/358	O
29	467/045	O	73	466/125	O	117	126/359	O
30	308/049	O	74	061/126	O	118	298/382	O
31	Caf051	O	75	220/127	O	119	089/391	O
32	Caf052	O	76	514/129	O	120	478/408	O
33	Caf054	O	77	386/131	O	121	464/417	O
34	Caf056	O	78	389/133	O	122	039/434	O
35	Caf057	O	79	201/134	O	123	457/477	O
36	Caf058	O	80	404/135	O	124	018/494.1	L
37	Caf059	O	81	012/136	L	125	057/496	O
38	Caf061	O	82	118/137	O	126	490/516	O
39	Caf062	O	83	183/138	O	127	325/522	O
40	Caf064	O	84	621/139	O	128	080/584	O
41	Caf067	O	85	505/140	O	129	368/600	O
42	Caf070	O	86	238/142	L	130	401/643	O
43	Caf072	O	87	320/145	O	131	179/650	O
44	Caf073	O	88	511/157	O	132	055/702	O

## 2.2 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi isolado a partir de folhas de plantas adultas pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990). Aproximadamente 5 g de folhas de cafeeiro foram maceradas em nitrogênio líquido e acondicionadas em tubos falcon de 50 ml. Após a maceração seguiu-se os passos descritos em Brasileiro e Carneiro (1998) com as modificações necessárias para evitar a oxidação do material e para

purificar o DNA obtido, como a adição de 0,4 ml de metabissulfito de sódio 10% ao tampão de extração e purificação com fenol-clorofórmio, respectivamente.

Após a extração, a qualidade e a integridade do DNA extraído foi verificada por gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria.

### 2.3 Amplificação dos microssatélites via PCR

A partir de uma análise prévia de 292 locos microssatélite, foram selecionados os 48 mais informativos (**Tabela 2**) para a coleção, em estudo anterior (FERREIRA, 2010).

As amplificações realizadas no método semi-automático para os locos marcados com fluorescência foram preparadas individualmente, em um volume final de 10  $\mu$ l, contendo 25 ng de DNA genômico, 2  $\mu$ l do tampão 5X (Buffer Go Taq<sup>®</sup> Flexi – Promega), 1,6 mM de dNTPs (dNTP–Solução Mix – Amresco), 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8  $\mu$ M do *primer forward*, 0,1  $\mu$ M do *primer reverse*, 0,1  $\mu$ M do *primer* M13 marcado com fluorescência (6-FAM, NED ou HEX) e 1U de Taq DNA polimerase (Go Taq<sup>®</sup> Flexi – Promega). As amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp<sup>®</sup> - PCR System 9700 (Applied Biosystems), com o seguinte programa: 95°C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos de 95°C por 50 segundos; 50°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os *primers* para amplificação dos locos microssatélites (**Tabela 2**) tiveram sua sequência *forward* acrescida de uma cauda com a sequência do *primer* M13-universal, numa estratégia descrita por Schuelke (2000). Três tipos de fluorescência foram utilizados para a marcação da cauda M13: 6-FAM, NED e HEX.

As diferentes fluorescências permitem a análise de múltiplos locos no mesmo capilar de injeção, tornando o sistema de detecção multiplex.

**Tabela 2** - Locos microssatélites utilizados na genotipagem da coleção de *C. arabica* da Etiópia e suas informações referentes à amplitude, multiplex formados, espécie de origem, tipo de repetição, código no Genbank e laboratório de origem.

Loco	Amplitude do Loco (pb)	Multiplex	Fluoróforos	Espécie	Tipo de repetição	Cod. Internacional	Lab. de Origem
Cma 0179	170 - 210		HEX	<i>Coffea arabica</i> , Bourbon Tekisic	(GA)12		Universidade de Trieste
411	210 - 250	1	FAM	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(TC)9	AM408635	CIRAD-IRD
Cma 0166	370 - 410		NED	<i>Coffea arabica</i> , Bourbon Tekisic	(TG)9		Universidade de Trieste
454	230 - 270		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(AC)8	AM408675	CIRAD-IRD
471	320 - 360	2	FAM	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(CT)12	AM231572	CIRAD-IRD
394	130 - 170		NED	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(TG)9	AM231563	CIRAD-IRD
416	230 - 270		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(T)20(TG)8(GT)9	AM408640	CIRAD-IRD
Cma 0103	190 - 230	3	FAM	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(TG)19		Universidade de Trieste
318	330 - 370		NED	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(AT)10(TG)9	AM408746	CIRAD-IRD
395	130 - 170		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(GT)13	AM231564	CIRAD-IRD
Cma 0127	180 - 220	4	FAM	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(AC)6(TCAC)4(AC)5		Universidade de Trieste
377	240 - 420		NED	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(GT)8	AM408606	CIRAD-IRD
465	155 - 195		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(AC)9	AM408682	CIRAD-IRD
Cma 0105	200 - 240	5	FAM	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(CT)9(CA)2GA(CA)8		Universidade de Trieste
Cma 0109	280 - 320		NED	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	TGTGxxxTGTG		Universidade de Trieste
Cma 0168	190 - 230		HEX	<i>Coffea arabica</i> , Bourbon Tekisic	(TG)14(AG)8		Universidade de Trieste
355	160 - 210	6	FAM	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(TG)15	AM231552	CIRAD-IRD
772	280 - 320		NED	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	8(CT)11(CA)10(CT)	AJ308772	Universidade de Trieste
523	190 - 230		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(TG)8	AM408734	CIRAD-IRD
363	140 - 180	7	FAM	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(AT)6(AC)7	AM408597	CIRAD-IRD
271	210 - 250		NED	<i>Coffea arabica</i>	(GA)8	AY220271	CCMB
356	175 - 215		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(TG)14	AM231553	CIRAD-IRD
270	215 - 255	8	FAM	<i>Coffea arabica</i>	(CA)10(TA)8	AY220270	CCMB
258	110 - 170		NED	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(TG)17	AJ250258	Universidade de Trieste
365	160 - 200		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(TG)8	AM408598	CIRAD-IRD
272	180 - 220	9	FAM	<i>Coffea arabica</i>	(CTC)7	AY220272	CCMB
260	120 - 180		NED	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(CT)9(CA)8(CT)4(CA)5	AJ250260	IRD
462	125 - 165		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(CA)10(TA)7	AM408680	CIRAD-IRD
382	80 - 120	10	FAM	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(CA)9	AM408611	CIRAD-IRD
Cma 0200	220 - 260		NED	<i>Coffea arabica</i> , Bourbon Tekisic	(TG)5		Universidade de Trieste
Cma 0117	170 - 210		HEX	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(GC)4(GT)16		Universidade de Trieste
Cma 0118	70 - 120	11	FAM	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(GT)9GACA(GA)12		Universidade de Trieste
Cma 0209	110 - 150		NED	<i>Coffea arabica</i> , Bourbon Tekisic	(CA)7(TA)8		Universidade de Trieste
Cma 0113	175 - 215		HEX	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(GT)9		Universidade de Trieste
414	120 - 180	12	FAM	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(CA)9	AM408638	CIRAD-IRD
350	430 - 470		NED	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(GT)8	AM231550	CIRAD-IRD
254	165 - 205		HEX	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(CA)15	AJ250254	IRD
314	190 - 230	13	FAM	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(AC)8	AM408742	CIRAD-IRD
327	140 - 180		NED	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(CA)9	AM231546	CIRAD-IRD
Cma 0198	190 - 230		HEX	<i>Coffea arabica</i> , Bourbon Tekisic	(TG)9(AG)18		Universidade de Trieste
Cma 0199	130 - 170	14	FAM	<i>Coffea arabica</i> , Bourbon Tekisic	(CT)11		Universidade de Trieste
766	230 - 270		NED	<i>Coffea arabica</i> , Caturra	(AC)9(TC)9(AC)5	AJ308766	Universidade de Trieste
503	180 - 220		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(AC)9	AM408715	CIRAD-IRD
335	100 - 140	15	FAM	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(CA)8	AM408758	CIRAD-IRD
344	130 - 170		NED	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(AC)9	AM408766	CIRAD-IRD
509	125 - 175		HEX	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(CT)10(CA)15	AM408721	CIRAD-IRD
512	185 - 270	16	FAM	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(AC)11	AM408724	CIRAD-IRD
514	320 - 360		NED	<i>Coffea canephora</i> , clone 126	(AC)8	AM408726	CIRAD-IRD

Os produtos de PCR de cada três locos marcados foram utilizados para a formação de um multiplex, a fim de se analisar simultaneamente três locos microssatélite. Para a separação dos fragmentos, 1,5 µL do multiplex dos produtos de PCR foi adicionado a 9 µL do mix ROX. Este foi composto por formamida e pelo

padrão interno de peso molecular GenScan™ ROX 500™ (Applied Biosystems, USA), misturados numa proporção de 9:1, respectivamente. Em seguida as amostras foram desnaturadas com o objetivo de separar a dupla hélice em fitas simples, a uma temperatura de 95°C, durante 5 minutos, e imediatamente resfriadas em gelo, para impedir o re-anelamento do DNA.

## 2.4 Análise dos dados

Os fragmentos de PCR foram separados por eletroforese capilar através do sequenciador automático de DNA modelo ABI3130 XL (Applied Biosystems, USA). O tamanho dos alelos para os fragmentos separados foi determinado utilizando-se o software Gene Mapper® ID versão 4.1. Nas análises dos locos microssatélite, os alelos foram identificados como picos de eletroferogramas com tamanhos determinados em pares de bases pela comparação automatizada com o padrão interno de fragmentos de DNA de tamanho conhecido.

A diversidade genética dos acessos de *C. arabica* foi avaliada pelo número médio de alelos por loco ( $\hat{A}$ ) e pela porcentagem de locos polimórficos (P).  $\hat{A}$  foi calculado a partir do número total de alelos obtidos pelo número total de locos analisados. Já P foi calculado pelo número de locos polimórficos pelo número total de locos analisados.

Com o total de dados obtidos, ou seja, com todos os alelos para cada loco tabulados, foi realizada a análise de distância genética, a partir da construção de um dendograma, usando o software DARwin 5 (PERRIER et al., 2003).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização dos locos microssatélites

De um total de 48 locos microssatélite utilizados neste trabalho, 38 foram considerados polimórficos para coleção de *C. arabica* da Etiópia. Os locos 394, 382, Cma 0113; 327 e 766 foram considerados monomórficos para as análises com a coleção, pois somente alguns genótipos apresentaram os mesmos picos, ou seja, os mesmos alelos. De fato, foi observado no trabalho de seleção destes microssatélites baixos valores de PIC, como 0.07 para os locos 394 e 382 e 0.29 para o loco Cma 0113 e valores medianos para o loco 327, apresentando PIC 0.47 e o loco 766, com valor de PIC de 0.50.

Houve ainda falhas em 5 locos, dentre os 48 estudados (Cma 0166, Cma 0109, 772, Cma 0200 e 350), e estes foram excluídos das análises.

Quarenta e três pares de *primers* microssatélites produziram um total de 256 alelos, com a variação de um, para os locos monomórficos, a quatro alelos por loco, um número superior ao encontrado por Cubry et al (2008), que obteve dos genótipos de *C. arabica* do centro de origem no máximo 2 alelos por loco. Do total de alelos produzidos, 8 tiveram frequências superiores a 0.6; a grande maioria dos alelos encontrados tiveram frequências inferiores a 0.2 e 56 tiveram frequências entre 0.2 e 0.6 (**Tabela 3**).

O número médio de alelos por loco ( $\bar{A}$ ) foi de 6,6 alelos, distribuídos entre os 132 acessos estudados. Os locos 395 e 254 apresentaram a maior quantidade de alelos diferentes por loco, com 12 e 13 alelos, respectivamente. Os locos 514, 462, 318, 416, Cma 0198, 471, 271, Cma 0209, 344, 363, 365, 272, Cma

0118, 335, 454 e 465 apresentaram um número de alelos inferior ao observado na média ( $\hat{A}$ ) (**Tabela 3**).

A porcentagem de locos polimórficos (P) observada foi de 79, 16%, considerando apenas os locos polimórficos dentre o total de locos analisados na coleção da Etiópia.

**Tabela 3** - Frequência relativa dos alelos de *C. arabica* encontrados para os locos polimórficos, analisados através do software Gene Mapper® ID.

Loco	Nº de Alelos	Frequência Relativa												
		a	b	c	d	e	g	h	i	j	k	l	m	n
514	2	0.33	0.66											
462	2	0.54	0.46											
318	2	0.3	0.7											
416	3	0.48	0.19	0.33										
Cma 0198	3	0.93	0.03	0.03										
471	4	0.4	0.1	0.1	0.4									
271	4	0.03	0.69	0.2	0.12									
Cma 0209	4	0.43	0.14	0.3	0.14									
344	4	0.32	0.23	0.44	0.01									
363	5	0.03	0.36	0.11	0.44	0.06								
365	5	0.57	0.36	0.01	0.04	0.02								
272	5	0.03	0.24	0.19	0.31	0.35								
Cma 0118	5	0.1	0.05	0.1	0.525	0.225								
335	5	0.35	0.54	0.06	0.05	0.005								
454	6	0.06	0.16	0.23	0.004	0.008	0.54							
465	6	0.07	0.42	0.35	0.03	0.04	0.09							
411	7	0.017	0.21	0.06	0.05	0.004	0.64	0.013						
Cma 0103	7	0.16	0.004	0.05	0.16	0.2	0.12	0.29						
Cma 0127	7	0.006	0.14	0.25	0.52	0.036	0.036	0.006						
377	7	0.01	0.525	0.09	0.355	0.005	0.005	0.01						
Cma 0168	7	0.005	0.11	0.41	0.46	0.009	0.005	0.005						
356	7	0.02	0.01	0.02	0.62	0.08	0.18	0.05						
260	7	0.51	0.004	0.004	0.1	0.2	0.02	0.15						
414	7	0.1	0.4	0.02	0.08	0.1	0.1	0.2						
314	7	0.11	0.004	0.44	0.04	0.01	0.004	0.01						
509	7	0.09	0.6	0.22	0.02	0.04	0.02	0.02						
Cma 0179	8	0.007	0.07	0.07	0.08	0.007	0.38	0.38	0.007					
523	8	0.1	0.02	0.009	0.01	0.009	0.009	0.4	0.4					
Cma 0199	8	0.004	0.004	0.07	0.02	0.41	0.004	0.4	0.1					
503	8	0.02	0.01	0.06	0.4	0.2	0.19	0.13	0.005					
355	9	0.09	0.03	0.004	0.004	0.37	0.03	0.41	0.04	0.01				
Cma 0105	10	0.02	0.01	0.05	0.005	0.05	0.04	0.005	0.22	0.6	0.01			
270	10	0.09	0.54	0.19	0.03	0.006	0.02	0.03	0.03	0.02	0.07			
258	10	0.008	0.51	0.004	0.04	0.02	0.04	0.07	0.21	0.04	0.05			
Cma 0117	10	0.03	0.05	0.01	0.2	0.3	0.2	0.1	0.02	0.14	0.02			
512	10	0.27	0.15	0.02	0.02	0.04	0.17	0.03	0.02	0.06	0.2			
395	12	0.006	0.048	0.006	0.036	0.19	0.096	0.078	0.036	0.11	0.11	0.072	0.21	
254	13	0.08	0.09	0.04	0.03	0.006	0.07	0.13	0.12	0.1	0.02	0.2	0.06	0.07

### 3.2 Transferabilidade dos marcadores microssatélites

Foi confirmada a transferabilidade dos marcadores microssatélites dentro do gênero *Coffea*. Os locos desenvolvidos para *C. canephora* apresentaram boa amplificação nos genótipos de *C. arabica* estudados.

Dos 48 locos avaliados, 24 deles foram desenvolvidos para *C. canephora*, e todos eles amplificaram os acessos de *C. arabica*. Três deles foram monomórficos e os demais polimórficos para os acessos de *C. arabica*. Sendo o loco 395 desenvolvido para *C. canephora*, foi dos que apresentou os maiores números de alelos encontrados por loco. A transferência de locos microssatélites entre espécies do gênero *Coffea* já havia sido relatada por Combes et al (2000) e Poncet et al (2004), com sucesso semelhante a este trabalho.

### 3.3 Diversidade genética

Foi construído um dendograma de diversidade genética para os acessos da coleção estudada (**Figura 1**). A relação com o número apresentado no dendograma com seu acesso está na **Tabela 1**.

Pode ser observado a formação de 2 grandes grupos entre os 132 acessos estudados. Um dos acessos, o de número 102, que corresponde ao acesso 335/219, ficou isolado e destacou-se dos demais. Este acesso, segundo análises fenotípicas, também é considerado diferente dos demais da coleção de *C. arabica*. Por esta característica ele foi considerado para a formação de populações de mapeamento, com a finalidade de futuros estudos de genética e melhoramento em *C. arabica* da Etiópia.

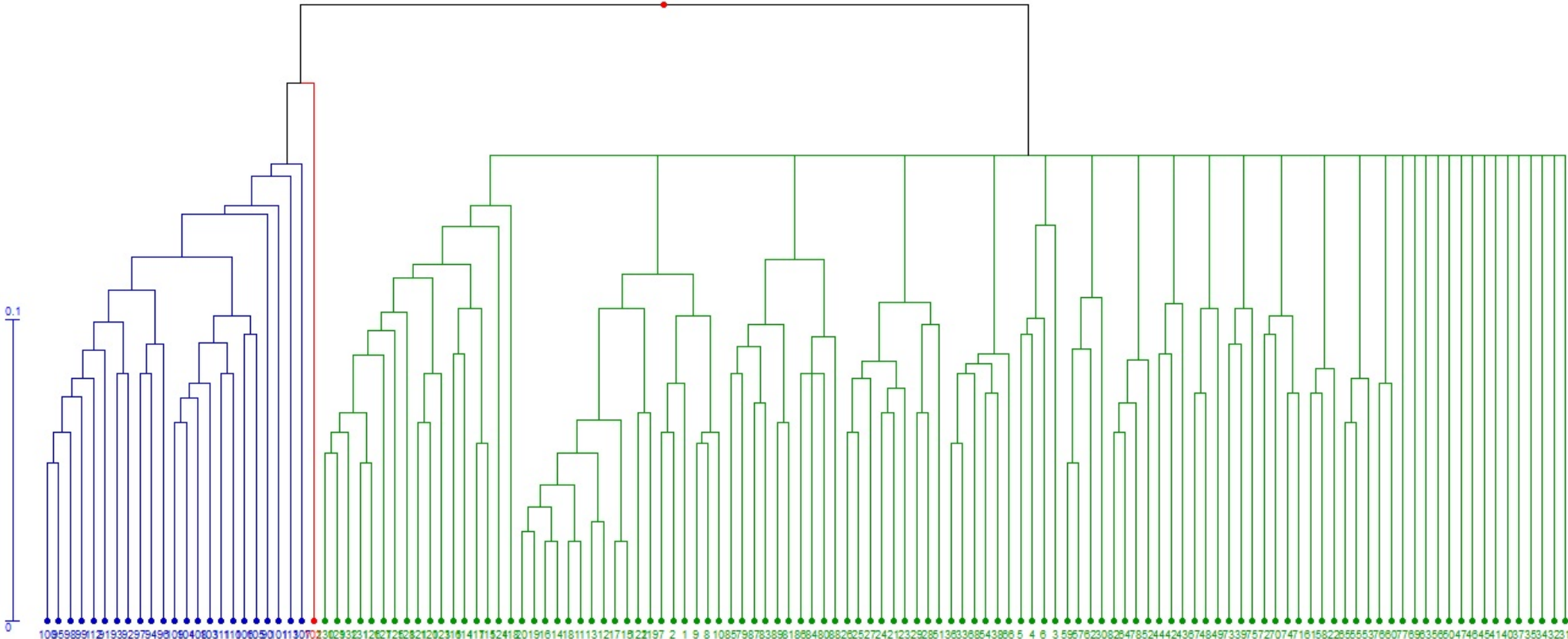
Não houve uma separação significativa dos grupos de acordo com a origem geográfica (MONTAGNON e BOUHARMONT, 1996), como demonstrado no trabalho de Silvestrini et al (2007), que observou, dentre os acessos de *C. arabica*, dois grupos, um com acessos do leste do Vale do Rift e outro com acessos do oeste. No grupo em azul no dendograma apresentado na **Figura 1**, há somente dois acessos do leste do Vale do Rift, o 016/298 (113) e o 338/218 (101), os outros 21 acessos são da região oeste.

Os outros acessos do leste do Vale do Rift ficaram no outro grupo (verde), porém não ficaram no mesmo subgrupo.

Dentro dos dois grupos citados, ainda houve a discriminação de vários subgrupos. Embora a distância genética entre eles seja baixa (0,1) pode-se inferir, baseado também em outros trabalhos, que os acessos de *C. arabica* do centro de origem tem uma diversidade genética maior que outros acessos (ANTHONY et al., 2001; SILVESTRINI et al., 2007), como por exemplo, os acessos comerciais. Apesar deste trabalho não analisar acessos comerciais, o dendograma gerado a partir somente dos acessos de *C. arabica* do centro de origem reforça a sua diversidade. Outros estudos (CUBRY et al., 2008; LÓPEZ-GARTNER et al., 2009) usaram outras espécies e acessos comerciais de *C.arabica* para o estudo de diversidade genética, e também reforçaram o fato que há uma diversidade genética maior nos acessos de *C. arabica* do centro de origem.

Embora apresentando uma discriminação de grupos distintos, entre os acessos do centro de origem, acessos comerciais e outras espécies, todos esses trabalhos demonstram o uso dos marcadores microssatélites com alto poder discriminatório, principalmente dos acessos do centro de origem (Etiópia).

Figura 1: Dendrograma com base nas distâncias genéticas obtidas por microssatélites entre 132 acessos de *C. arabica* da Etiópia.



Apesar de resultados diferentes dos trabalhos anteriores, segundo a classificação geográfica de origem dos acessos de *C. arabica*, os locos microssatélites estudados forneceram informações adicionais sobre a estrutura genética da coleção de *C. arabica* da Etiópia alocada no IAPAR.

Também a técnica de genotipagem automatizada, já utilizada em outros trabalhos (MALUF et al., 2005; SILVESTRINI et al., 2007; CUBRY et al., 2008; LÓPEZ-GARTNER et al., 2009; GELETA et al., 2012), foi eficiente para a genotipagem da coleção da Etiópia, pois houve uma redução de tempo e trabalho no processo.

#### 4 CONCLUSÕES

Quarenta e três locos microssatélites produziram 256 alelos para a coleção de *C. arabica* do centro de origem. Trinta e oito deles foram considerados polimórficos.

Um número médio de 6,6 alelos por loco foi encontrado. A porcentagem de locos polimórficos (P) observada foi de 79, 16%.

Foi observada a transferabilidade de locos desenvolvidos para *C. canephora* para os acessos de *C. arabica* da coleção.

O dendograma construído a partir dos dados obtidos separou os acessos em 2 grandes grupos, porém não relacionados com a origem geográfica, leste e oeste do Vale do Rift (Etiópia).

A técnica de genotipagem semi-automatizada foi eficiente para a genotipagem da coleção da Etiópia e houve uma redução de tempo e trabalho no processo de genotipagem.

## REFERÊNCIAS

- Aerts, R.; Berecha, G.; Gijbels, P.; Hundera, K.; Glabeke, S.V.; Vandepitte, K.; Muys, B.; Roldán-Ruiz, I.; Honnay, O. **Genetic variation and risks of introgression in the wild *Coffea arabica* gene pool in south-western Ethiopian montane rainforests.** *Evolutionary Applications*: 1752-4571, 2012.
- Aga, E.; Bryngelsson, T.; Bekele, E.; Salomon, B. **Genetic diversity of forest *arabica* coffee (*Coffea arabica* L.) in Ethiopia as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis.** *Hereditas* 138:36–46, 2003.
- Aga, E.; Bekele, E.; Bryngelsson, T. **Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia.** *Genetica* 124:213–221, 2005.
- Aggarwal, R.K.; Hendre, P.S.; Varshney, R.K.; Bhat, P.R.; Krishnakumar, V.; Singh, L. **Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species.** *Theor Appl Genet*, 114:359–372, 2006.
- Alvarenga, S.M.; Caixeta, E.T.; Hufnagel, B.; Thiebaut, F.; Maciel-Zambolim, E.; Zambolim, L.; Sakiyama, N.S. **Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem.** *Pesq. agropec. Bras* 46,8: 890-898, 2011.
- Anthony, F.; Bertrand, B.; Quiros, O.; Wilches, A.; Lashermes, P.; Berthaud, J.; Charrier, A. **Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers.** *Euphytica* 118: 53–65, 2001.
- Anthony, F.; Combes, M.C.; Astorga, C.; Bertrand, B.; Graziosi, G.; Lashermes, P. **The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers.** *Theor Appl Genet* 104:894–900, 2002.
- Anzueto, F.; Bertrand, B.; Sarah, J.L.; Eskes, A.B.; Decazy, B. **Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions.** *Euphyta* 118: 1–8, 2001.
- Azevedo, V.C.R. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae.** [Tese de doutorado] Brasília: Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, 2007.
- Baruah, A.; Naik, V.; Hendre, P.S.; Rajkumar, R.; Rajendrakumar, P.; Aggarwal, R.K. **Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea Arabica* L., showing wide cross-species amplifications.** *Molecular Ecology Notes*. 3, 647–650, 2003.
- Bertrand, B.; Etienne, H.; Cilas, C.; Charrier, A.; Baradat, P. ***Coffea arabica* hybrid performance for yield, fertility and bean weight.** *Euphytica*. 141(3): 255-262, 2005.

Bhat, R.P.; Krishnakumar, V.; Hendre, P.S.; Rajendrakumar, P.; Varshney, R.K.; Aggarwal, R.K. **Identification and characterization of expressed sequence tags-derived simple sequence repeats markers from robusta coffee variety 'CxR' (an interspecific hybrid of *Coffea canephora* × *Coffea congensis*)**. *Molecular Ecology Notes*, 5, 80–83, 2005.

Borém, A., Caixeta, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG, 2006.

Bridson, D.M.; Verdcourt, B. **Flora of tropical East Africa: Rubiaceae. (Part 2)**. Cape Town: Iziko Museums of Cape Town, p.415-747, 1988.

Carvalho, A.; Fazuoli, L.C.; Levy, F.A.; Guerreiro-Filho, O.; Mazzafera, P. **Observações sobre características dos frutos de introduções de *Coffea arabica* da Etiópia**. In: Resumos. 10<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Poços de Caldas, MG, pp 90–92, 1983.

Chaparro, A.P.; Cristancho, M.A.; Cortina, H.A.; Gaitán, A.L. **Genetic variability of *Coffea arabica* L. accessions from Ethiopia evaluated with RAPDs**. *Genet Resour Crop Evol* 51:291–297, 2004.

Combes, M.C. et al. **Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species**. *Mol. Ecol.* 9: 1178–1180, 2000.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira Café. Safra 2013, Primeira Estimativa**. Janeiro, 2013.

Cristancho, M.A., Gaitán, A.L. **Isolation, characterization and amplification of simple sequence repeat loci in coffee**. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8: 321-329, 2008.

Cubry, P. et al. **Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding**. *Genome* 51: 50-63, 2008.

Cunha, C.P. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética molecular de acessos de alho (*Allium sativum* L.)**. [Dissertação de Mestrado] Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, 2011.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus* 12: 13-15, 1990.

Faleiro, F.G. **Marcadores genético-moleculares: Aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 102 p., 2007.

FAO. **FAO Coffee Mission to Ethiopia, 1964–65**. FAO, Rome, Italy, 1968.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>a</sup> ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

Ferreira, R.V. **Seleção de marcadores microssatélites polimórficos em *Coffea arabica***. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, 2010.

Geleta, M.; Herrera, I.; Monzon, A.; Bryngelsson, T. **Genetic Diversity of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as Estimated by Simple Sequence Repeat Markers**. The Scientific World Journal, Volume 2012, Article ID 939820, 2012.

Hearne, C. M.; Ghosh, S.; Todd, J. A. **Microsatellites for linkage analysis of genetic-traits**. Trends in Genetics 8, 8: .288-294, 1992.

Hein, L.; Gatzweiler, F. **The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources**. Ecological Economics 60 : 176-185, 2006.

Hendre, P.S.; PhAnindranath, R.; Annapurna, V.; Lalremruata, A.; Aggarwal, R. K. **Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies**. BMC Plant Biology, 8: 51, 2008.

Hoshino, A.A.; Bravo, J.P.; Nobile, P.M.; Morelli, K.A. **Microsatellites as tools for genetic diversity analysis**. In: Mahmut Caliskan. (Org.). Genetic Diversity in Microorganisms. Genetic Diversity in Microorganisms. Rijeka: InTech, 149-170, 2012.

Jarne, P.; Lagoda, P. J. L. **Microsatellites, from molecules to populations and back**. Trends in Ecology & Evolution 11,10: 424-429, 1996.

Krishnan, S.; Ranker, T.A.; Davis, A.P.; Rakotomalala, J.J. **The study of genetic diversity patterns of *Coffea commersoniana*, an endangered coffee species from Madagascar: a model for conservation of other littoral forest species**. Tree Genetics & Genomes, 2012.

Kushalappa, A.C.; Eskes, A.B. **Advances in coffee rust research**. Ann Rev Phytopath 27, 503-531, 1989.

Lamas, N. S. **Desenvolvimento, caracterização e uso de marcadores microssatélites no mapeamento genético de características agronômicas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)**. [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília, 2010.

Lashermes, P.; Trouslot, P.; Anthony, F.; Combes, M.C.; Charrier, A. **Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica***. Euphytica 87:59-64, 1996.

Lashermes, P.; Combes, M.C.; Robert, J.; Trouslot, P.; D'Hont, A.; Anthony, F.; Charrier, A. **Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. Genome**. Mol. Gen. Genet 261: 259-266, 1999.

Levinson, G., Gutman, G.A. **High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12**. Nucleic Acids Res. 15:5323-5338, 1987.

Lit, M.; Luty, J.A. **A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene**. American Journal of Human Genetics 44: 397-401, 1989.

López-Gartner, G.; Cortina, H.; McCouch, S.R.; Moncada, M.D.P. **Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers.** *Tree Genetics & Genomes*, 5:435-446, 2009.

Maluf, M.P. et al. **Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems.** *Scientia Agricola* 62: 366-73, 2005.

Mazzafera, P.; Eskes, A.B.; Parvais, J.; Carvalho A. **Stérilité mâle détectée chez *Coffea arabica* et *C. canéfora* au Brésil.** In: XIII Colloque Scientifique International du Café, vol. 1. Paipa, Colombia, pp466-473, 1990.

Meyer, A.S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes.** [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, 2002

Milach, S.C.K. **Principais tipos de marcadores moleculares e suas características.** In: Milach, S.C.K. *Marcadores moleculares em plantas*. 220p. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

Mishra, M.K. et al. **Genome organization in coffee as revealed by EST PCRFLP, SNPs and SSR analysis.** *Journal of Crop Science and Biotechnology* 14, 1: 25-37, 2011.

Mishra, M.K. et al. **Genetic Diversity Among Indian Coffee Cultivars Determined via Molecular Markers.** *Journal of Crop Improvement* 26, 6: 727-750, 2012.

Missio, R.F. et al. **Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L.** *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9: 361-371, 2009.

Mittal, N.; Dubey, A.K. **Microsatellite markers - A new practice of DNA based markers in molecular genetics.** *Pharmacognosy Reviews* 3, 6: 235-246, 2009.

Moncada, P.; McCouch, S. **Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species.** *Genome* 47: 501-509, 2004.

Montagnon, C.; Bouharmont, P. **Multivariate analysis of phenotypic diversity of *Coffea arabica*.** *Genet Res Crop Evol* 43:221-227, 1996.

Oliveira, E.J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg)** [Tese de Doutorado]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, 2006.

Pereira, G. S. **Desenvolvimento de marcadores SSR, M-AFLP e SNP visando à integração de mapas genético-moleculares de *Passiflora alata* Curtis.** [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, 2010.

Pereira, G.S.; Padilha, L.; Von Pinho, E.V.R.; Teixeira, R.K.S.; Carvalho, C.H.S.; Maluf, M.P.; Carvalho, B.L. **Microsatellite markers in analysis of resistance to coffee leaf miner in Arabica coffee.** *Pesq. agropec. Bras* 46,12: 1650-1656, 2011.

- Perrier, X., Flori, A., Bonnot, F. **Data analys methods. In Genetic diversity of cultivated tropical plants.** Science Publishers, Inc., Enfield, N. H. p. 43-76, 2003.
- Pinto, L.R., Vieira, M.L.C., Souza, A.P., Junior, C.L.S. **Isoenzimas e Microssatélites em Plantas – Aspectos Técnicos e Interpretação Genética.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 20: 16-19, 2001.
- Poncet, V. et al. **SSR cross-amplification and variation within coffee trees (Coffea spp.).** Genome 47: 1071-1081, 2004.
- Queller, D. C.; Strassmann, J. E.; Hughes, C. R. **Microsatellites and kinship.** Trends in Ecology & Evolution 8, 8: 285-&, 1993.
- Ramalho, M.A.P. et al. **Genética na Agropecuária. 5 ed., rev.** Lavras: Ed. UFLA, 2012.
- Romano, E. **Extração de DNA de tecidos vegetais.** In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas.** p 163-177. Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEN, 1998.
- Schlotterer, C.; Tautz, D. **Slippage synthesis of simple sequence DNA.** Nucl. Acids Res. 20(2): 211-215, 1992.
- Schuck, M.R. **Caracterização molecular de variedades de Videira (Vitis spp.) de Santa Catarina por marcadores microssatélites (SSRs).** [Dissertação de Mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- Schuck, M.R; Moreira, F.M.; Voltolini, J.A.; Guerra, M.P.; Grando, M.S.; Silva, A.L. **Identificação molecular da uva ‘Goethe’ de Urussanga-SC por marcadores microssatélites.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 32, n. 3, p. 825-831, 2010.
- Schuelke, M. **An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.** Nature Biotechnology 18: 233-234, 2000.
- Silva, C.M. **Análise da diversidade genética por marcadores RAPD e SSR em Fusarium oxysporum f. sp. cubense no Estado de Santa Catarina.** [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- Silvarolla, M.B.; Mazzafera, P.; Fazuoli, L.C. **Plant biochemistry: a naturally decaffeinated Arabica coffee.** Nature 429, 826–429,2004.
- Silvestrini S., Junqueira M.G., Favarin A.C., Guerreiro-Filho O., Maluf M.P., Silvarolla M.B., Colombo C.A. **Genetic diversity and structure of Ethiopian, Yemen and Brazilian Coffea arabica L. accessions using microsatellites markers.** Genet Resour Crop Evol. DOI 10.1007/s10722-006-9122-4, 2007.
- Steiger, D.L.; Nagai, C.; Moore, P.H.; Morden, C.W.; Osgood, R.V.; Ming, R. **AFLP analysis of genetic diversity within and among Coffea arabica cultivars.** Theor Appl Genet 105: 209–215, 2002.
- Tautz, D. **Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic dna markers.** Nucleic Acids Research 17: 6463-6471, 1989.

Tornincasa, P.; Furlan, M.; Pallavicini, A.; Graziosi, G. **Coffee species and varietal identification**. Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems: 307-313, 2010.

Van der Graaff, N. **Selection of Arabica coffee types resistant to coffee berry disease in Ethiopia**. PhD Thesis Wageningen University, 1981.

Van der Vossen, H.A.M.; Walyaro, D.J. **Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L.** Euphytica 29(3): 777–791, 1980.

Vieira, L.G.E. et al. **Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource**. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18(1): 95-108, 2006.

Vieira, E.S.N. et al. **Development of microsatellite markers for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties**. Genetics and Molecular Biology 33, 3: 507-514, 2010.

Wang, M.L.; Barkley, N.A. & Jenkins, T.M. **Microsatellite Markers in Plants and Insects. Part I: Applications of Biotechnology**. *Genes, Genomes and Genomics*, Vol.3, No.1, pp. 54-67, ISSN 1749-0383, 2009.

Weber, J. L.; May, P. E. **Abundant class of human dna polymorphisms which can be typed using the polymerase chain-reaction**. American Journal of Human Genetics 44, 3: 388-396, 1989.

Yu, Q.; Guyot, R.; Kochko, A.; De Byers, A.; Navajas-Pérez, R.; Langston B, J.; Dubreuil-Tranchant, C. D.; Paterson, A. H.; Poncet, V.; Nagai, C.; Ming, R. **Micro-collinearity and genome evolution in the vicinity of an ethylene receptor gene of cultivated diploid and allotetraploid coffee species (*Coffea*)**. Plant Journal, v. 67, p. 305–317, 2011.

Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J. **Status and Prospects of Association Mapping in Plants**. THE PLANT GENOME 1:5-20, 2008.