

CERTIFICAÇÃO DE CRUZAMENTOS EM *Coffea arabica* POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES¹

Laura Maritza Saavedra Tobar²; Ruane Alice da Silva³; Danúbia Rodrigues Alves⁴; Eveline Teixeira Caixeta⁵; Antonio Carlos Baião de Oliveira⁶; Laércio Zambolim⁷

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, CAPES, CNPq, Fapemig, INCT-Café.

² Estudante, DSc, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, laurasaata@hotmail.com.

³ Estudante, MS, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, ruanealice@ufv.br.

⁴ Estudante, MS, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, danubia.alves@ufv.br.

⁵ Pesquisadora, DSc, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Café, Brasília, DF – Brasil, eveline.caixeta@embrapa.br.

⁶ Pesquisador, DSc, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Café, Brasília, DF – Brasil, baiao.embrapa@gmail.com.

⁷ Professor, PhD, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, zambolim@ufv.br.

RESUMO: O café arábica (*Coffea arabica* L.) é uma das commodities agrícolas mais comercializadas mundialmente. Assim, o melhoramento genético do cafeeiro é indispensável para suprir as necessidades do amplo mercado internacional. No processo de desenvolvimento de novas variedades de *C. arabica* são muitas as limitações que dificultam a seleção de plantas nos programas de melhoramento, como a baixa diversidade genética associada à autogamia, a origem e a domesticação desta espécie. *C. arabica* é uma planta autógama, de base genética estreita, assim a utilização de marcadores morfológicos para certificação de cruzamentos é limitada, devido ao fato de grande parte dos parentais desejáveis em cruzamentos não contrastar para as características morfológicas desejáveis. Nesse contexto, os marcadores moleculares apresentam-se como uma ferramenta promissora para auxiliar na certificação dos cruzamentos em programas de melhoramento genético do cafeeiro. Assim, o objetivo deste trabalho foi certificar por meio de marcadores moleculares microssatélites, a ocorrência de hibridação em doze populações de híbridos originados de cruzamentos entre oito variedades de *C. arabica* com características agrônômicas de interesse. Para tanto, foram extraídos DNA de 144 híbridos F₁ e dos genitores. Posteriormente os indivíduos foram genotipados com 11 marcadores moleculares microssatélites SSR (*Simple Sequence Repeats*). Realizou-se a certificação dos respectivos cruzamentos. Foram identificados indivíduos provenientes de autofecundação e que não pertenciam a nenhum dos parentais. No total, 10 híbridos contaminantes foram retirados do programa de melhoramento. Desse modo, a partir da utilização desses marcadores foi possível identificar as progênies híbridas obtidas de cruzamentos e diferenciá-las dos indivíduos originados de autofecundação. Essa análise proporciona uma grande economia de tempo, mão de obra e recursos financeiros para os programas de melhoramento.

PALAVRAS-CHAVE: diallelo circulante, genotipagem, marcadores moleculares, melhoramento do cafeeiro.

CERTIFICATION OF CROSSINGS IN *Coffea arabica* BY MEANS OF MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT: Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) is one of the most traded agricultural commodities in the world. Thus, the genetic improvement of coffee is indispensable to supply the needs and the large international market. In the process of developing new varieties of *C. arabica*, there are many limitations that hinder plant selection in breeding programs, such as the low genetic diversity associated with autogamy, the origin and domestication of this species. *C. arabica* is an autogenous plant with a narrow genetic base, so the use of morphological markers for cross-certification is limited because most desirable parenting at crosses does not contrast to desirable morphological characteristics. In this context, molecular markers are a promising tool to assist in the certification of crosses in coffee breeding programs. Thus, the objective of this work was to certify by means of microsatellite molecular markers, the occurrence of hybridization in twelve hybrid populations originated from crosses between eight varieties of *C. arabica* with agronomic characteristics of interest. For this, DNA was extracted from 144 F₁ hybrids and parents. Subsequently, the individuals were genotyped with 11 SSR (*Simple Sequence Repeats*) microsatellite molecular markers. Certification of the respective crossings was performed. Individuals from self-fertilization who did not belong to any parent were identified. In total, 10 contaminant hybrids were removed from the breeding program. Thus, from the use of these markers it was possible to identify the hybrid progenies obtained from crosses and differentiate them from individuals originating from self-fertilization. This analysis provides significant savings in time, labor and financial resources for breeding programs.

KEY WORDS: circulating diallel, genotyping, molecular markers, coffee breeding.

INTRODUÇÃO

Os programas de melhoramento de café arábica trabalham intensivamente visando o desenvolvimento de variedades altamente produtivas e com características agrônomicas mais competitivas frente às necessidades do mercado (OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, as principais limitações encontradas são o tempo e o recurso requerido para o desenvolvimento de novas variedades. Isso porque a espécie *Coffea arabica* é perene, de ciclo longo e autógama, sendo necessário aproximadamente 25 anos para o desenvolvimento de um cultivar (SANTOS e ZANETTINI, 2002).

Nos programas de melhoramento de plantas autógamas, como café arábica, para obtenção de plantas híbridas F1, o cruzamento deve ser realizado manualmente e a polinização deve ocorrer quando o estigma está próximo à abertura floral (SAKIYAMA et al., 1999), sendo este um trabalho demorado e cuidadoso. Entretanto, em alguns casos, quando o cruzamento é realizado, a autofecundação já pode ter ocorrido e a progênie resultante não corresponder ao híbrido de interesse. Nesse sentido, a certificação de cruzamentos por meio de marcadores moleculares é uma estratégia eficiente, pois permite a identificação de plantas oriundas de autofecundação, diferenciando as das plantas híbridas (COSTA et al., 2014). Essa estratégia gera grande economia de tempo, mão de obra e recursos financeiros, especialmente importantes para o melhoramento genético de espécies perenes.

Os marcadores moleculares são de grande utilidade para o melhoramento genético, pois permitem o acesso a informações precisas ao nível de DNA (FERRÃO et al., 2015), não são influenciados pelo ambiente e não se alteram durante o ciclo de vida do indivíduo (COLLARD e MACKILL, 2008). Diversos estudos podem ser auxiliados por meio dos marcadores moleculares em café, como de diversidade genética, resistência a doenças, direcionamento de cruzamentos e certificação de cruzamentos de interesse para o melhoramento (CAIXETA et al., 2016). Dentre os diversos tipos de marcadores, os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), destacam-se por sua taxa elevada de polimorfismo, natureza codominante, multialelismo, reprodutibilidade, loco específico, facilidade de automação e custo relativamente baixo (FERRÃO et al., 2015). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi certificar a ocorrência de hibridação em doze populações de híbridos originados de cruzamentos entre oito genitores com características agrônomicas de interesse e pertencentes a variedades de *C. arabica*, por meio de marcadores moleculares microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados em cruzamentos oito genitores correspondentes a cultivares comerciais ou acessos do programa de melhoramento genético do cafeeiro desenvolvido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Café) (Tabela 1). Realizaram-se 12 cruzamentos entre os oito genitores utilizando um modelo de dialelo circulante e originaram 144 indivíduos híbridos F₁, os quais também foram caracterizados. Os cruzamentos se encontram no campo experimental do Departamento de Fitopatologia da UFV (DFT-Fundão) em um delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições e três plantas por parcela. No total foram coletadas 176 amostras foliares para extração de DNA, sendo 32 amostras dos genitores e 144 correspondentes aos híbridos de cada cruzamento.

A extração do DNA genômico das 176 amostras foliares foi realizada no laboratório de biotecnologia do cafeeiro (BioCafé) na UFV. As folhas foram acondicionadas em tubos Falcon devidamente identificados e armazenadas em freezer a -80°C. Posteriormente, foram liofilizadas e após três dias foram maceradas em cadinhos com auxílio de pistilo e armazenadas em microtubos de 2,0 ml. O DNA foi extraído conforme a metodologia descrita por Diniz et al. (2005), com adaptações. A qualidade e quantidade do DNA foram avaliadas usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 - Thermo Scientific. As amostras foram padronizadas em 25 ng µL⁻¹ e armazenadas a -20 °C. Para confirmar as hibridações artificiais realizadas entre os oito genitores e a possível ocorrência de autofecundação realizou-se a genotipagem das 176 amostras. A genotipagem das 12 populações de híbridos e seus respectivos genitores foi realizada por meio de 11 marcadores moleculares microssatélites (SSR) polimórficos selecionados. Os marcadores microssatélites utilizados estão na tabela 2.

Tabela 1. Características dos genitores utilizados nos cruzamentos, provenientes do programa de melhoramento genético do cafeeiro desenvolvido pela EPAMIG/UFV/EMBRAPA.

Genitor	Localização	Origem e Principais Características
Paraíso MG H 419-1	CETP*	Cultivar Catuaí Amarelo IAC 30 x Híbrido de Timor UFRV 445-46. Resistente à <i>H. vastatrix</i> e aos nematoides da espécie <i>M. exigua</i> . Cultivar de porte baixo; frutos amarelos, oblongos com maturação média; alta produtividade e boa qualidade de bebida.
Catiguá MG 2	CETP	Cultivar Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFRV 440-10. Obtida pela progênie da planta H 514-7-16-3. Resistentes às raças prevalentes de <i>H. vastatrix</i> . Porte baixo; frutos vermelhos, alta qualidade bebida, baixa exigência em nutrientes e tolerante a seca.
Oeiras MG 6851	CETP	Caturra Vermelho CIFC 19/1 x Híbrido de Timor CIFC 832/1. Moderadamente resistente às raças de <i>H. vastatrix</i> , que predominam no estado de Minas Gerais. Excelente arquitetura de plantas; porte baixo; frutos vermelhos, graúdos e alongados; possui maturação precoce e uniforme; alta produtividade e boa qualidade de bebida.
H484-2-18-12	CETP	Progênie F ₃ do cruzamento da cultivar Mundo Novo x Híbrido Timor, de elevada produtividade; alto vigor vegetativo e resistente à <i>H. vastatrix</i> .
UFV 311-63	CETP	Planta da geração F ₃ . Originada do cruzamento entre CIFC H227/1 = Caturra Amarelo (CIFC 426/2) x S.333 (CIFC 254/14). portadora do gene <i>S_H3</i> de resistência à <i>H. vastatrix</i> . Possui também os genes SH2 e SH5.
Arara	Procafé	Cultivar do grupo Sarchimor, frutos graúdos e amarelos; elevada produtividade e resistência à <i>H. vastatrix</i> .
Acauã Novo Ensaio 3-45, cova 432	Procafé	Mundo Novo IAC 388-17 x Sarchimor IAC 1668. Apresenta resistência à <i>H. vastatrix</i> , Tolerância à seca e maturação tardia.
Siriema – clone 12	Procafé	Originada do cruzamento e retrocruzamentos entre <i>C. arabica</i> com <i>C. racemosa</i> , resistente ao bicho mineiro; maturação muito precoce; tolerante à seca e resistência parcial à <i>H. vastatrix</i> .

*CETP - Campo Experimental de Três Pontas/Epamig; Procafé - Fazenda Experimental de Varginha/Fundação Procafé.

A reação de PCR, foi realizada utilizando 50 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X da enzima, 1 mM de MgCl₂, 150 μM de cada dNTP (dGTP, dTTP, dCTP, dATP) e 0,1 μM de cada *primer*, completando com água milli-Q para um volume final de 20 μL. As amplificações foram efetuadas em termocicladores PTC-200 (MJ Research) e Veriti (Applied Biosystems).

A reação foi iniciada com desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 10 ciclos de *touchdown* PCR, constituídos de 94°C por 30 segundos (seg), temperatura de anelamento decrescendo 1°C a cada ciclo (de 66°C até 57°C) por 30 seg e extensão de 72°C por 30 seg. Posteriormente, foram realizados mais 30 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 57°C e extensão a 72°C, com 30 seg cada etapa. A extensão final foi realizada a 72°C, por 8 min.

Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Brito et al. (2010). Cada banda resultante nos géis foi tratada como um caráter único, sendo avaliada a presença da banda como 1 (um) e a ausência como 0 (zero). Posteriormente, foi construída uma matriz de 0 e 1.

Tabela 2. Lista de primers SSR utilizados na certificação de cruzamentos, temperatura de fusão (T_m) e tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (pb).

Primer	Sequências dos Primers	T _m (°C)	Tam.
CaEST-002	F: GAAGGGACAAAGACGCCTAA R: CGACAGATGCAGGAATAAACTG	57,3	184
CaEST-006	F: CAGAATTGTTGTGGAGGGAAC R: CGACAGATGCAGGAATAAACTG	57,9	227
CaEST- 029	F: AGGAGATGCCTGTGACGAAC R: GGACGGAAGATTCTGGCTTT	53,7	199
CaEST- 030	F: CCCATGAAGACTTGCCAATA R: GGGAAATACAAGTGTGCTG	54,2	171
CaEST- 045	F: GCATCCTACCGATACATACAA R: TCCATCAACAACAACCGAAG	52,9	259
CaEST- 048	F: TGAGACAAGCTATGGAGGAGGA R: AACCAGATCAACAGGGTAGGG	54,7	151
CaEST- 071	F: ATGGAGAGGAAGACGCAACA R: CCTTATTGAAGACGCCAAA	51,7	155
CaEST- 072	F: TTGCTTGCTCCGCATCCTAC R: ATCGCTTCCAAGAGGCTTTC	53,7	197
CaEST- 089	F: GTGAACCTCCCTTTCCTTG R: ACTGGTCTCTCGTCTGTGAA	59,4	152
CaEST- 102	F: GCTTCCTTACTTCCTTCCCTGA R: GGTTCGTCAAACAAGTCAA	60,3	208
CaEST- 088	F: CGCGTGGGAGATATTGAAGT R: AAGCGGCAGAAATCAGTGG	51,7	226

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A certificação dos cruzamentos permitiu identificar 134 descendências híbridas (93%), confirmando-se a hibridação correspondente aos cruzamentos de interesse realizados pelo programa de melhoramento (Tabela 3). Quatro indivíduos C1-3, C1-6, C1-7 e C1-8, (3%) foram identificados como originados por autofecundação, apresentando apenas a banda do genitor feminino. No melhoramento de *C. arabica*, o processo de hibridação é realizado manualmente, sendo necessária a emasculação das flores que serão utilizadas como genitor feminino, isto porque a planta é uma espécie autógama e apresenta cleistogamia. E, apesar de vários cuidados serem tomados, a autofecundação pode ocorrer antes da realização da emasculação e o cruzamento de interesse. Isto explica a ocorrência da autofecundação nos indivíduos (C1-3, C1-6, C1-7 e C1-8) que apresentaram apenas a banda do genitor feminino.

Os cafeeiros C5-6, C8-6, C9-3, C11-5, C12-11 e C12-12 não corresponderam a nenhum dos cruzamentos realizados, portanto foram classificados como mistura (4%) (Tabela 3). Valencia et al. (2017), objetivando determinar a presença do marcador genético BA-124-Kf associado ao gene *S_H3* em uma população F₁ proveniente de cruzamentos entre café Caturra com os acessos S288/23 e BA-2, identificaram plantas que não apresentaram a banda associada, atribuindo este resultado ao fato de não ter ocorrido a respectiva hibridação. Dessa maneira, ressaltasse a importância da realização da certificação de cruzamentos nos programas para ter a certeza do material genético a ser usado no avanço de gerações.

Os indivíduos que apresentaram marcas diferentes dos seus genitores, possivelmente, foram originados de polinização com pólen externos, misturas de sementes ou um possível erro na identificação na coleta do material vegetal para as análises. Em condições de campo, em um programa de melhoramento podem acontecer misturas de sementes durante o período de colheita devido ao grande número de amostras geralmente utilizadas. Portanto, os marcadores moleculares podem ser usados eficientemente para confirmar a verdadeira identidade de plantas individuais. Yashitola et al. (2002), utilizaram marcadores SSR e STS para confirmar a pureza genética de híbridos no arroz, concluindo que esta prática é consideravelmente mais simples do que os testes padrão de crescimento que envolvem o desenvolvimento da planta até a maturidade e a avaliação das características morfológicas e florais.

Tabela 3. Certificação de cruzamentos de híbridos F₁ de interesse para o melhoramento genético do cafeeiro, utilizando marcadores SSR.

Cruzamento	Nº Híbridos	Autofecundação	Mistura
CIT: Paraíso MG1 (B-P4) x B2 (F1-II-P3)	8	4	-
C2T: Paraíso MG1 x 20 (F6-II-P6)	12	-	-
C3T: Paraíso MG1 x Arara	12	-	-
C4T: Catiguá MG2 x 20 (F6-II-P6)	12	-	-
C5T: Catiguá MG2 x Arara	11	-	1
C6T: Catiguá MG2 x Acaua Novo	12	-	-
C7T: Oeiras x Arara	12	-	-
C8T: Oeiras x Acaua Novo	11	-	1
C9T: Oeiras x Siriema	11	-	1
C10T: B2(F1-II-P3) x Acaua Novo	12	-	-
C11T: B2(F1-II-P3) x Siriema	11	-	1
C12T	10	-	2
Total	134	4	6
%	93%	3%	4%

CONCLUSÕES

1. A certificação de cruzamentos por marcadores moleculares é uma ferramenta útil para auxiliar os programas de melhoramento genético de *C. arabica*, por fornecer maior certeza dos genótipos que estão sendo levados para os próximos ciclos de seleção, não comprometendo os ganhos nas próximas gerações. Além disso, auxilia na redução de tempo, mão de obra e recurso financeiro.
2. Diante disso, 10 plantas consideradas contaminantes foram eliminadas e desconsideradas neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRITO, G.G.; CAIXETA, E.T.; GALLINA, A.P.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M.E. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica* 173:255–264. (2010).
- CAIXETA, E.T. et al. Tipos de marcadores moleculares. *Marcadores Moleculares*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 9–93. (2016).
- COLLARD, B.C.Y.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* v. 363, n. 1491, p. 557–572, 12 fev. (2008).
- COSTA, P.M.A. et al. Selfing confirmation in sugarcane by using simple sequence repeat markers: an individual reciprocal recurrent selection scheme. *Genetics and Molecular Research* v. 13, n. 4, p. 8962–8970. (2014).
- DINIZ, L.E.C.; SAKIYAMA, N.S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; ZAMBOLIM, E.M.; LOUREIRO, M.E.; PEREIRA, A.A.; ZAMBOLIM, L. Analysis of AFLP markers to the Mex-1 resistance locos in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5: 387-393. (2005).
- FERRÃO, L. F.V.; CAIXETA, E.T.; PENA, G.; et al. New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. *Molecular Breeding*, v. 35, n. 1, p. 31. (2015).
- OLIVEIRA, A.C.B.D.; PEREIRA, A.A.; SILVA, F.L.D.; REZENDE, J.C.D. et al. Prediction of genetic gains from selection in Arabica coffee progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11, 106–113. (2011).
- SAKIYAMA, N.S.; PEREIRA, T.N.S; PEREIRA, A. Hibridação em Café. In: A. BORÉM (Org). Hibridação artificial de plantas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 175–189. (1999).
- SANTOS, E.K.; ZANETTINI, M.H.B. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. *Ciência Rural* v. 32, n. 1. (2002).
- VALENCIA, A. et al. Introgression of the SH3 gene resistant to rust (*Hemileia vastatrix*) in improved lines of CASTILLO® variety (*Coffea arabica* L.). *Journal of Plant Breeding and Crop Science* v. 9, n. August, p. 130–138. (2017).
- YASHITOLA, J.T.; THIRUMURUGAN, R.M.; SUNDARAM, M.K.; NASEERULLAH, M.S.; RAMESHA, N.P. SARMA; SONTI, R.V. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. *Crop Sci.* 42:1369–1373. (2002).