

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE *Coffea canephora* COM O USO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Shayenne Hevelyn Farias Fernandes
Universidade Federal do Amazonas
shayenne.fernandes@ufam.edu.br

Santiago Linorio Ferreyra Ramos
Universidade Federal do Amazonas
slfr@ufam.edu.br

Ricardo Lopes
Embrapa Amazônica Ocidental
ricardo.lopes@embrapa.br

Fábio Medeiros Ferreira
Universidade Federal do Amazonas
ferreirafmt@ufam.edu.br

Marcelo Curitiba Espindula
Embrapa Café
Marcelo.espindula@embrapa.br

Maria Teresa Gomes Lopes
Universidade Federal do Amazonas
mtglopes@ufam.edu.br

RESUMO

A cafeicultura na Amazônia Ocidental é realizada principalmente com cultivares de café da espécie *Coffea canephora*. A produção de café no Amazonas tem aumentado em volume e em qualidade. A UFAM e Embrapa Rondônia realizam pesquisas com clones de *Coffea canephora*, visando identificar os genótipos melhor adaptados ao Amazonas, contribuindo assim para o desenvolvimento sustentável da atividade. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a diversidade genética de genótipos de *C. canephora* do programa de melhoramento da Embrapa Rondônia utilizando marcadores microssatélites. Amostras de folhas de 44 genótipos foram coletadas para obter DNA genômico e quatro primers microssatélites usados para a análise de diversidade. A genotipagem por eletroforese capilar foi realizada em Analisador automático de DNA. A partir das genotipagens foi analisada a estrutura genética das amostras e estimados parâmetros de diversidade genética. Os agrupamentos de progênies, apresentou em média uma H_o (0,64) que foi superior à H_E (0,53). A média de f nos locos apresentou valores inferiores à zero ($f = -0.19$) o que mostra excesso de heterozigotos. Estes resultados mostram a existência de diferenciação ou estrutura genética nas progênies avaliadas e podem auxiliar na escolha de genótipos e cruzamentos no desenvolvimento de novas cultivares.

Palavras-Chave: Café robusta; Café conilon; banco de germoplasma; parâmetros genéticos; Amazonia.



1. INTRODUÇÃO

As cultivares da espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, devido a boa adaptação as condições ambientais locais, tem contribuído para o desenvolvimento da cafeicultura na Amazônia Ocidental, com expressivo aumento no volume e na qualidade do café produzido na região. Em 2022, Rondônia foi responsável por 15% (2,8 milhões de sacas) da produção brasileira do café conilon e no Amazonas foram produzidas 75.300 sacas (Conab, 2022). Os dados de produção indicam que a cafeicultura tem relevante importância econômica e social na região norte do Brasil. O sistema de produção intensivo em mão-de-obra e de perfil familiar predomina na maior parte das áreas produtoras de café, principalmente na etapa da colheita. O cultivo de cafeeiros de *C. canephora* são excelente opção de geração de renda para pequenos agricultores e uma opção interessante para conversão de áreas degradadas da Amazônia em sistemas produtivos sustentáveis e financeiramente lucrativos. Cultivares mais adaptadas e produtivas contribuem para o aumento da produção com menor uso de área de cultivo, o que reduz a pressão sobre a floresta.

A Embrapa Rondônia iniciou a seleção de genótipos adaptados as condições da Amazônia Ocidental na década de 1980 e, em 2016, foi estabelecida uma parceria com a Universidade Federal do Amazonas (UFAM) para avaliação de clones selecionados de *C. canephora* em quatro municípios do Amazonas: Humaitá, Manaus, Silves e Itacoatiara, visando identificar genótipos melhor adaptados as condições locais. Os genótipos introduzidos são clones resultantes do programa de melhoramento genético da Embrapa originados de hibridações controladas entre plantas do grupo 'Conilon' e 'Robusta' iniciadas em 2004. Estes genótipos representam avanço em relação a variedade Conilon - BRS Ouro Preto recomendada até então para região, pois os clones híbridos intraespecíficos apresentam alto vigor vegetativo, alta produtividade e tolerância as principais doenças do cafeeiro, tais como a ferrugem alaranjada e a cercosporiose.

Para que o progresso do programa de melhoramento genético seja contínuo é necessário explorar de forma eficiente o germoplasma disponível e uma das bases para isso é conhecer a variabilidade genética deste germoplasma. Informações sobre divergência genética, combinada com o conhecimento do comportamento produtivo dos genitores possibilita escolha de cruzamentos com maior potencial para manifestação de heterose. Além disso, as medidas de distância genética têm sido úteis na conservação de germoplasma, no estabelecimento das relações entre a diversidade genética e geográfica, e para evitar a vulnerabilidade genética das culturas. Os marcadores moleculares possibilitam de forma rápida e eficaz obter informações sobre a variabilidade genética no germoplasma de interesse, por isso, tem sido amplamente utilizado na caracterização e no melhoramento genético de plantas (Faleiro, 2007). Marcadores microssatélites são altamente polimórficos e robustos e estão disponíveis para o cafeeiro (Alekevetch *et al.*, 2013), assim, podem contribuir significativamente para melhor conhecer e explorar a variabilidade genética do germoplasma de *C. canephora* usado pelo programa de melhoramento desenvolvido pela Embrapa Rondônia.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar a diversidade genética de genótipos de *Coffea canephora* do programa de melhoramento genético da Embrapa Rondônia com o uso de marcadores microssatélites.

3. METODOLOGIA





Material vegetal.

No estudo foram utilizados 44 genótipos de *C. canephora* do programa de melhoramento genético de cafeeiro da Embrapa Rondônia, os quais foram obtidos por hibridações interespecíficas ao longo do desenvolvimento do programa. Os genótipos são mantidos nesta cede da EMBRAPA.

Coleta de material vegetal

De cada um genótipo foram coletadas no mínimo duas folhas, as quais foram armazenadas em um saco plástico tipo *zip lock* com a devida identificação da amostra e contendo sílica gel até serem armazenadas a -20°C em conduções de laboratório na Embrapa Rondônia. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e enviadas para o Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM, Manaus, Amazonas.

Extração e quantificação do DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o protocolo do detergente catiônico CTAB 2X (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) descrito por Doyle e Doyle (1990).

Amplificação dos locos microssatélites e detecção de polimorfismos

Na caracterização genética dos genótipos com marcadores microssatélites foram utilizados quatro pares de iniciadores desenvolvidos para *Coffea canephora* (Me_13; Mg_257; Mg_753; Mg_501). As amplificações foram realizadas conforme protocolo descrito por Alekcevetch *et al.* (2013). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese capilar em Analisador automático de DNA.

Análises de Diversidade Genética

Os dados da genotipagem foram utilizados para Análise Discriminante de Componentes Principais (DACP) (Jombart *et al.*, 2010) realizada na plataforma R (R Core Team, 2022). As progênies foram agrupadas pelo número de agrupamentos detectados na DACP. Os agrupamentos foram numerados e analisados os parâmetros de diversidade genética, tais como número de alelos totais (A_T), número de alelos/locos (A), número de alelos privados (A_p), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_E), índice de fixação (f), equilíbrio de Hardy – Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação (LD), dentro da plataforma R (R Core Team, 2022).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversidade Genética

A análise DACP indicou que os genótipos estudados podem ser divididos em três grupos geneticamente homogêneos (Tabela 1). Os dois autovalores obtidos na Análise Discriminante (52,67% e 45,33%) explicam 98%, da variação genética entre as progênies, indicando que a análise representa de maneira eficiente a variação genética observada no germoplasma estudado.

Os três grupos formados apresentam altos níveis de diversidade genética para os quatro locos analisados. No total, 33 alelos foram observados a partir dos quatro locos, com média de 3,28 alelos por loco. Valores elevados foram observados para as estimativas dos parâmetros H_o e H_E para todos os grupos de genótipos. As estimativas de H_o apresentaram valores maiores para os grupos um (01) e três (03) em relação as obtidas para H_E . O grupo dois (02) foi o único que apresentou menor valor para estimativa de H_o do que para H_E . A média das estimativas de H_o dos grupos (0,64) também foi superior à estimativa média para H_E (0,53). A média das estimativas de f foi inferior à zero ($f = -0,19$) o que indica excesso de heterozigotos (Tabela 1). Os valores negativos para os índices de fixação (f) e os coeficientes de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_E), indicam elevada diversidade genética, confirmada pelo excesso de heterozigotos nos três grupos. Os baixos valores observados para as estimativas de f e altos para H_o são esperados em espécies alógamas (Ramos *et*



al., 2011).

A diversidade genética observada com marcadores microssatélites sugere possibilidade para cruzamentos e obtenção de progênies híbridas com maior potencial de manifestar heterose. Contudo, também é importante considerar caracteres como produção e resistência genética dos genótipos a doenças importantes na região. O uso conjunto de dados moleculares e fenotípicos aumenta a possibilidade de geração de progênies segregantes que proporcionaram maiores ganhos genéticos para as características de interesse. Os dados moleculares contribuem também para definir as estratégias de conservação do germoplasma disponível.

Tabela 1. Índices de diversidade genética de três grupos de genótipos de *Coffea canephora* do programa de melhoramento genético da Embrapa Rondônia caracterizados com quatro locos de marcadores moleculares microssatélites.

Agrupamentos DACP	<i>n</i>	<i>A_T</i>	<i>A</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>f</i>
01	23,5	21	3,09	0,61	0,48	-0,264
02	10,75	22	3,44	0,48	0,51	0,05
03	6,0	16	3,3	0,83	0,61	-0,356
Média	13,42	19,67	3,28	0,64	0,53	-0,19

n = Média do número de indivíduos analisados por locos; *A_T* = número total de alelos identificados na população; *A* = média do número de alelos por loco; *H_O* = Heterozigosidade observada; *H_E* = Heterozigosidade esperada; *f* = coeficiente de endogamia.

5. CONCLUSÕES

As progênies apresentam alta diversidade genética e são agrupadas em três grupos divergentes os quais podem ser explorados em hibridações para obter progênies com maior potencial para apresentar heterose.

REFERÊNCIAS

- FALEIRO, F. G. **Marcadores genéticos - moleculares aplicados a programas de conservação e uso dos recursos genéticos**. Planaltina-DF: EMBRAPA Cerrados, 2007. 102p.
- RAMOS, S.L.F.; LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; CUNHA, R.N.V. da; MACÊDO, J.L.V. de; CONTIM, L.A.S.; CLEMENT, C.R.; RODRIGUES, D.P.; BERNARDES, L.G. Determination of the mating system of Tucumã palm using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Brasília, v. 11, p. 181–185, Sep. 2011.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13–15, Jan. 1990.
- ALEKCEVETCH, J.C.; CARNEIRO, F.D.A.; RÊGO, E.C.D.S.; GUERRA, A.F.; BARTHOLO, G.F.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECAS, A.F.A.D.; MARRACCINIS, P.; ANDRADE, A.C. **Estudo da diversidade genética de uma população de Coffea canephora var. Conilon por meio de marcadores moleculares do tipo ssr**. **Anais 2013, 5p**. VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2013, Salvador – BA.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genet.**, London, v. 11, p. 94. Nov. 2010.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2022. <http://www.R-project.org/>. Acesso 25 de abril 2022.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelas bolsas de Iniciação científica de SHFF e as de pesquisa de MTGL (CNPq 310307/2018-0) e SLFR (CNPq 305280/2022-8).

