

ESTRUTURA POPULACIONAL EM CAFÉ CANÉFORA COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES

Flávio de França Souza¹, Eveline Teixeira Caixeta², Eunize Maciel Zambolim³, Luis Felipe Ventorim Ferrão⁴, Guilherme Ferreira Pena⁵, Laércio Zambolim⁶, Ney Sussumu Sakiyama⁷

Resumo

Este trabalho objetivou estudar a estrutura genética em populações de *C. canephora*, usando marcadores microssatélites. Avaliaram-se 130 acessos, conservados na Estação Experimental da Embrapa Rondônia, em Ouro Preto do Oeste-RO, provenientes dos Bancos de Germoplasma do IAC, EPAMIG/UFV, INCAPER e de coletas no Estado de Rondônia. Foram utilizados 22 pares de *primer* desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia do Café da Universidade Federal de Viçosa (Biocafé-UFV). A população do IAC apresentou maior número de alelos/locos, maior diversidade genotípica, maior riqueza alélica e maior proporção de alelos raros. Observou-se déficit de heterozigotos, em todas as populações e as diferenças genéticas dentro das populações contribuíram mais para a diversidade total do que as diferenças entre cada uma. Os acessos formaram três grupos, representados pelas populações do [INCAPER], da [Embrapa Rondônia] e [IAC + EPAMIG/UFV], respectivamente.

Introdução

O café canéfora (*Coffea canephora*) originou-se no centro-oeste africano e é uma espécie diplóide ($2n=22$), alógama, auto-incompatível, que consiste de arvoretas rústicas, com vasta ramificação ortotrópica. Os grãos dessa espécie produzem uma bebida de sabor e aroma neutros, com maior teor de cafeína e sólidos solúveis, em comparação com o café arábica (*Coffea arabica*). Por esse motivo, é utilizado no preparo dos cafés solúveis e na composição de misturas com café arábica torrado e moído (CHARRIER & BERTHAUD, 1988). Atualmente, é cultivado na África, Ásia e América do Sul, sendo Vietnã e Brasil os principais países produtores, responsáveis por 37% e 24% da produção mundial, respectivamente (USDA, 2009).

Os programas brasileiros de melhoramento genético de *C. canephora* são bem supridos por um importante *pool* gênico conservado nos Bancos de Germoplasma (BAGs) do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em São Paulo; do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), no Espírito Santo; da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)/Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Minas Gerais e da Embrapa, em Rondônia. A coleção de germoplasma da Embrapa Rondônia possui 719 acessos de *C. canephora*, sendo 25 progênies introduzidas por meio de sementes a partir dos BAGs do IAC e da EPAMIG/UFV e 29 clones introduzidos do BAG do INCAPER. Os demais acessos compreendem clones de plantas coletadas em áreas tradicionais de cultivo no Estado de Rondônia (SOUZA *et al.*, 2003).

Embora muitos acessos dessas coleções tenham sido avaliados por meio de caracteres fenotípicos (SOUZA *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2006; IVOGLO *et al.*, 2008) e marcadores RAPD (FERRÃO *et al.*, 2007; SILVESTRINI *et al.*, 2008), é premente a necessidade de mais informações sobre a diversidade e a estrutura genética desse germoplasma. Essas informações poderão contribuir para melhor conservação e uso desses acessos, aumentando a eficiência dos BAGs e dos programas de melhoramento genético.

Os microssatélites, por apresentarem alta reprodutibilidade, multialelismo, herança co-dominante, alto grau de polimorfismo, relativa abundância e boa cobertura do genoma (POWELL *et al.*, 1996),

¹Pesquisador, M.Sc., Embrapa Rondônia/Doutorando em Genética e Melhoramento, UFV, Viçosa-MG, flaviofs@cpafro.embrapa.br

²Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café, Brasília-DF, eveline@embrapa.br, autora para correspondência

³Pesquisadora, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, eunize@ufv.br

⁴Estudante de Biologia, UFV, Viçosa-MG, felipeventorim@hotmail.com

⁵Bolsista, Biólogo, UFV, Viçosa-MG, penabio@yahoo.com.br

⁶Professor, D.Sc., UFV, Viçosa-MG, zambolim@ufv.br

⁷Professor, D.Sc., UFV, Viçosa-MG, sakiyama@ufv.br

são os marcadores mais adequados para o estudo simultâneo da diversidade e da estrutura genética de populações. Apesar dessas vantagens, ainda são escassos os estudos de diversidade no germoplasma brasileiro de *C. canephora* utilizando microssatélites. Desse modo, esse trabalho objetivou avaliar a diversidade e a estrutura genética do germoplasma de *C. canephora* oriundo de diferentes instituições de pesquisa, usando marcadores microssatélites.

Material e métodos

Foram avaliados 130 acessos mantidos na Coleção de Germoplasma de Café da Embrapa Rondônia, em Ouro Preto do Oeste-RO, oriundos das seguintes coleções de germoplasma: IAC (43 acessos), EPAMIG/UFV (11 acessos) e INCAPER (40 acessos), além de acessos coletados em lavouras do Estado de Rondônia (36 acessos).

O DNA genômico foi extraído de folhas liofilizadas, conforme descrito por Diniz *et al.* (2005). Foram utilizados 22 marcadores microssatélites desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia do Café da Universidade Federal de Viçosa (Biocafé-UFV), a partir de sequências EST (*Expressed Sequence Tags*) não redundantes do Projeto Brasileiro do Genoma do Café. A reação para amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada em um volume total de 20µl contendo 50ng de DNA, 0,6 unidades de *Taq* DNA polimerase, tampão 1x, 1mM de MgCl₂, 150µM de cada dNTP e 0,1µM de cada *primer*. Utilizou-se o procedimento *touchdown*-PCR, que consistiu na desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 13 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 67°C até 55°C por 30 segundos, reduzindo-se 1°C a cada ciclo, e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 13 ciclos, realizaram-se mais 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Incluiu-se uma última etapa de extensão a 72°C por 8 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e os fragmentos amplificados foram visualizados por meio de coloração com prata.

Para cada loco, indivíduos com uma e duas bandas foram classificados como homozigotos e heterozigotos, respectivamente e calcularam-se: número médio de alelos; percentagem de locos polimórficos e heterosigotidade média. Para cada população, foram calculados: estatística Fis de Wright (WEIR & COCKERHAM, 1984); riqueza alélica; proporção de alelos raros; e riqueza genotípica (índice de Shannon-Wiener). As distâncias entre pares de acessos foram estimadas por meio da análise fatorial de correspondência, usando o software Darwin 5.0 (PERRIER *et al.*, 2003) e a estrutura genética das populações foi analisada por meio da AMOVA (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Os parâmetros de diversidade foram estimados com o software Genetix 4.02 (BELKHIR, 2001).

Resultados e Discussão

Para a análise da estrutura genética, os acessos foram divididos em quatro populações. A população do IAC, composta por 43 indivíduos, apresentou maior número médio de alelos por loco (5,0 alelos), maior diversidade genotípica ($H' = 1,805$) e maior riqueza alélica ($rA = 3,56$). Por outro lado, a população do INCAPER, composta por 40 acessos, apresentou menor diversidade para a maioria dos parâmetros considerados. Além disso, apenas 75% dos locos foram polimórficos nesse grupo (Tabela 1). A maior diversidade entre os genótipos do IAC pode ser atribuída ao fato desta coleção ter sido composta por introduções sucessivas de acessos de *C. canephora* de diferentes origens (FAZUOLI, 1986). Já no caso do INCAPER, a maioria dos acessos constitui-se de clones de plantas selecionadas em lavouras do tipo varietal Conilon, introduzido no Espírito Santo, no início do século passado (FERRÃO *et al.* 2007). A população da EPAMIG/UFV, com 11 acessos, apresentou maior riqueza de alelos privados ($rAP = 0,38$) e a da Embrapa Rondônia apresentou maior frequência de alelos raros ($rR = 31,03\%$) (Tabela 1), o que sugere a existência de importante variabilidade nessas coleções.

As comparações entre a heterozigosidade observada (H_o) e o índice de diversidade (H_s) (Tabela 1) em cada população revelaram déficit de heterozigotos, que foi maior na população da Embrapa Rondônia. A média do índice de diversidade (0,519) foi alta em relação à diversidade total ($H_t = 0,651$), o que sugere que as diferenças genéticas dentro das populações contribuíram mais para a diversidade total do que as diferenças entre as populações. Esse resultado também foi observado na AMOVA, na

qual se verificou que 36% e 64% da variância molecular total foram devidos às diferenças entre e dentro das populações, respectivamente. O coeficiente de endogamia, representado pela estatística Fis de Wright, também foi estimado para cada coleção (Tabela 1). Maior Fis foi observado na população da Embrapa Rondônia, o que é reflexo do déficit de heterozigotos mencionado anteriormente e pode indicar a ocorrência de fixação de alelos nessa população.

Com base na análise fatorial de correspondências entre pares de acessos (Figura 1), verificou-se a formação de três grupos, sendo que dois apresentaram-se mais coesos e foram compostos principalmente por acessos da coleção do INCAPER e da Embrapa Rondônia, respectivamente. O terceiro, mais disperso, foi constituído de acessos das coleções do IAC e EPAMIG/UFV, sugerindo tratar-se de uma mesma população. De fato, parte do BAG da EPAMIG/UFV foi estabelecida com progênies de acessos do IAC (Antônio Carlos Baião de Oliveira, comunicação pessoal), o que explica a similaridade entre as amostras dos dois BAGs.

Conclusões

Os microssatélites utilizados apresentaram elevado grau de polimorfismo, o que possibilitou uma satisfatória compreensão da estrutura das populações avaliadas. Maior diversidade foi observada na população do IAC. Verificou-se déficit de heterozigotos em todas as populações. Além disso, as diferenças genéticas dentro das populações contribuíram mais para a diversidade total do que as diferenças entre elas. Os acessos formaram três grupos, representados pelas populações do [INCAPER], da [Embrapa Rondônia] e [IAC + EPAMIG/UFV], respectivamente.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café pelo apoio financeiro à realização desta pesquisa.

Referências

- BELKHIR, K. *GENETIX*, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France). 2001.
- CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Principles and Methods in Coffee Plant Breeding: *Coffea canephora* Pierre. In: R.J. Clarke e R. Macrae. *Coffee: Agronomy*. London, 1988. v.4, cap.5, p. 167-197.
- 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 associated to the Mex-1 resistance locus in ICATU PROGENIES. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Londrina-PR, v. 5, p. 387-393, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50. 2005.
- FAZUOLI, L.C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A.B.; MALAVOLTA, E.; YAMADA, J. (eds) *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro*. Piracicaba, pp. 87-113. 1986.
- FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G.; OLIVEIRA, M.A.; BARBOSA, W.M.; D'ISEP, M.S.P.; BARBOSA, R.P. Técnicas moleculares e biotecnológicas aplicadas ao café. In: Ferrão RG, Fonseca AFA, Bragança SM, Ferrão MAG, De Muner LH (eds) *Café conilon*. Vitória, pp. 175-201. 2007.
- FONSECA, A.F.A.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D.; SAKIYAMA, N.S.; FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; BRAGANÇA, S.M. Divergência genética em café conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(4):599–605. 2006.
- IVOGLO, M.G.; FAZUOLI, L.C.; OLIVEIRA, A.C.B.; GALLO, P.B.; MISTRO, J.C.; SILVAROLLA, M.B.; TOMA-BRAGHINI, M. (2008) Divergência genética entre progênies de café robusta. *Bragantia* 67(4):823–831

PERRIER, X.; FLORI, A.; BONNOT, F. (2003) Data analysis methods. In: HAMON, P.; SEGUIN, M.; PERRIER, X.; GLAZMANN, J.C. (eds) *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Enfield, Montpellier, pp 43–76

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Science*, v.1, p.215-222, 1996.

SILVESTRINI, M.; MALUF, M.P.; SILVAROLLA, M.B.; GUERREIRO-FILHO, O.; MEDINA-FILHO, H.P.; VANINI, M.M.T.; OLIVEIRA, A.S.; GASPARI-PEZZOPANE, C.; FAZUOLI, L.C. (2008) Genetic diversity of a *Coffea* germplasm collection assessed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:901-910.

SOUZA, F.F.; VENEZIANO, W.; SANTOS, M.M. Manejo de germoplasma de café em Rondônia. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2003, Porto Seguro. *Resumos*. Brasília: Embrapa, 2003.

USDA. *Production, Supply and Distribution Online Database*. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline> acesso em 27 de abr. 2009.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370. 1984.

Tabela 1. Parâmetros de diversidade estimados em quatro populações de *Coffea canephora* de diferentes coleções de germoplasma no Brasil, por meio de 20 marcadores microssatélites.

População	N	a	P	H'	rA	rAP	aR (%)	Ho	Hs	Ht	Fis
IAC	43	5,0	100	1,805	3,56	0,250	19,00	0,501	0,618		0,187
EPAMIG/UFV	11	3,9	90	1,457	3,36	0,380	10,39	0,516	0,585		0,096
Embrapa Rondônia	36	4,4	100	1,332	3,00	0,190	31,03				0,293
INCAPER	40	3,3	75	0,959	2,36	0,190	27,69	0,296	0,372		0,193
Média								0,412	0,519	0,651	

Número de acessos (N); média do número efetivo de alelos por loco (a); percentual de locos polimórficos (95%) (P); índice genotípico de Shannon-Wiener (H'); riqueza alélica r(A); riqueza de alelos privados r(AP); percentual de alelos raros (aR%) heterozigiosidade observada (Ho); índice de diversidade gênica dentro da população (Hs); diversidade gênica total (Ht); coeficiente de endogamia (Fis).

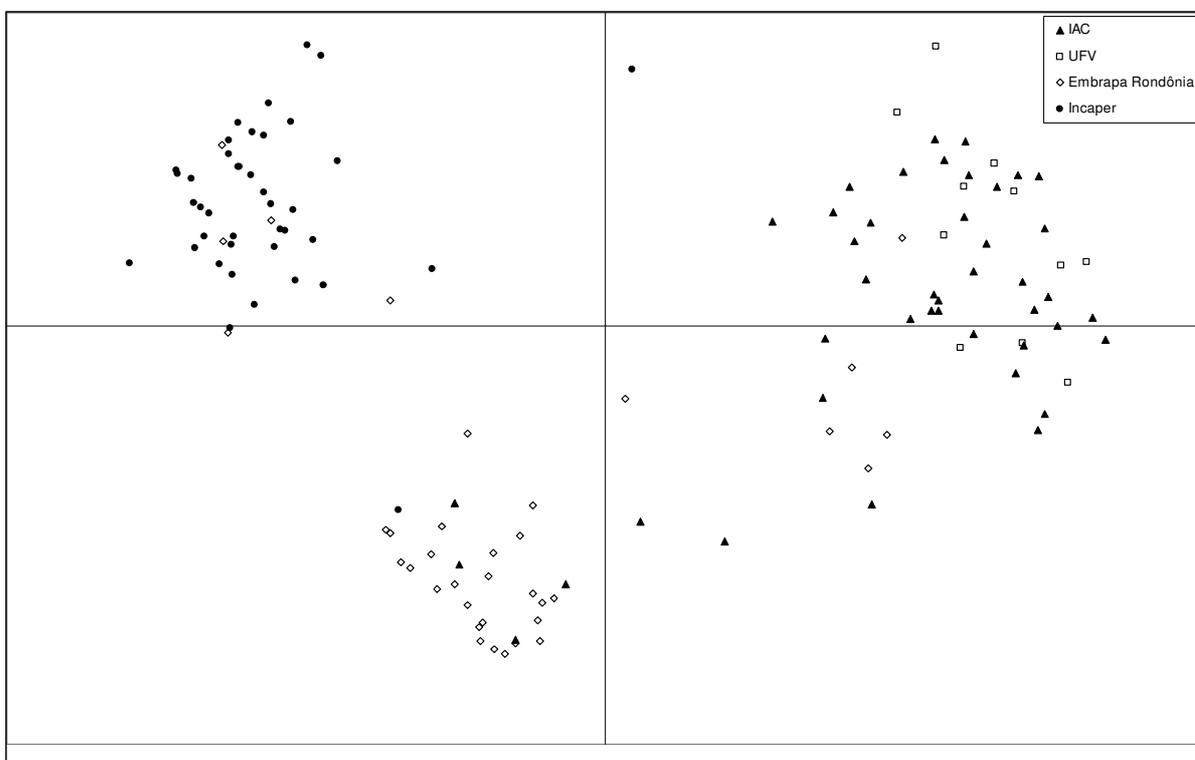


Figura 1. Análise Fatorial de Correspondências de 130 acessos de *Coffea canephora*. Pontos de diferentes formatos representam a origem dos acessos: Embrapa Rondônia (losango); Incaper (círculo); IAC (triângulo); e EPAMIG/UFV (quadrado)