

DIVERSIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE *Coffea arabica* L. AVALIADA POR MARCADORES MICROSSATÉLITES.

Milene SILVESTRINI¹, Michele G. JUNQUEIRA², Andréa C. FAVARIN², Oliveiro GUERREIRO-FILHO¹, Mirian P. MALUF, Maria B. SILVAROLLA¹ e Carlos COLOMBO² E-mail: ccolombo@iac.sp.gov.br.

¹ Centro de Café – IAC, Campinas, SP, ² Centro de Recursos Genéticos Vegetais – IAC, Campinas, SP.

Resumo:

Neste trabalho foi avaliada a diversidade e estrutura genética da espécie *Coffea arabica* por meio de marcadores microssatélites. No total, 115 acessos do Banco Ativo de Germoplasma do IAC foram avaliados, sendo 100 acessos de *C. arabica*, 5 acessos de *C. eugenioides*, 4 acessos de *C. racemosa* e 6 acessos de *C. canephora*. Entre os acessos de *C. arabica*, 13 foram cultivares comerciais desenvolvidas pelo IAC, 13 acessos provenientes do Iêmen e 74 acessos de ocorrência espontânea e subespontânea em diferentes regiões da Etiópia e Eritreia, consideradas centros de origem e diversificação da espécie. A análise de agrupamento baseada nas distâncias genéticas de Jaccard evidenciou a estruturação genética dos acessos de *C. arabica* em dois grandes grupos: o material cultivado do Brasil e Iêmen e os acessos provenientes da Etiópia e Eritreia. As espécies diplóides formaram grupos à parte. O grupo dos materiais cultivados apresentou baixa diversidade genética e foi subdividido entre os acessos provenientes do Iêmen e as cultivares do IAC. Estes resultados estão de acordo com a já constatada estreita base genética do material cultivado e com a história evolutiva de *C. arabica*. O estudo revelou também uma considerável diversidade genética nos acessos de ocorrência espontânea e subespontânea presentes no BAG, principalmente Kaffa e Illubabor, indicando a importância desse material como fonte de variabilidade genética para fins de melhoramento do cafeeiro.

Palavras-chave: diversidade genética, evolução, microssatélites, *Coffea arabica*

GENETIC DIVERSITY OF *Coffea arabica* ASSESSED BY MICROSATELLITES MARKERS.

Abstract:

Genetic diversity among 115 coffee accessions from Bank Active of Germplasm of IAC was studied using SSR markers. These germplasm represents 74 accessions of *C. arabica* derived from spontaneous and subspontaneous trees in Ethiopia and Eritrea, the primary center of the species diversity, 13 commercial cultivars of *C. arabica* developed by the IAC, 13 accessions of *C. arabica* from Yemen, 5 accessions of *C. eugenioides*, 4 accessions of *C. racemosa* and 6 accessions of *C. canephora*. All studied species were separated by a cluster analysis based on Jaccard's coefficient. Differentiation between the cultivated plants of *C. arabica* and accessions derived from spontaneous and subspontaneous trees was verified. Cultivated plants showed a low genetic diversity with a subdivision in two groups: accessions from Yemen and brazilian commercial cultivars. These results agreed with the well-described narrow genetic basis of *C. arabica* and supported evolutionary history of the species. The study also showed a significant genetic diversity of accessions from Ethiopia and Eritrea included in the BAG of IAC indicating its importance as source of genetic variability for coffee improvement.

Key words: genetic diversity, microsatellites, evolution, *Coffea arabica*

Introdução

O café (*Coffea* sp) é um dos principais produtos agrícolas no mundo, sendo o Brasil o maior produtor e exportador mundial. *C. arabica* e *C. canephora* são as duas únicas espécies que produzem bebida com valor comercial do gênero, representado por aproximadamente 100 distintas taxa, sendo que a primeira contribui com 70% da produção do país (CONAB, 2005). *C. arabica* é autocompatível e a única espécie tetraplóide ($2n = 4x = 44$) do gênero, enquanto as demais são diplóides ($2n = 2x = 22$) e geralmente autoincompatíveis (Krug & Carvalho, 1951). É endêmica de terras de altitude do sudoeste da Etiópia (Sylvain, 1955), mas também há registros de ocorrência da espécie no Sudão (Thomas, 1942) e Quênia (Berthaud & Charrier 1988).

O início do cultivo do café arábica deu-se no Iêmen há cerca de quinhentos anos. No início no século 18, progênies de uma única planta foram levadas da Indonésia para a Europa e depois para o continente Americano, constituindo-se na base genética das principais cultivares plantadas tanto no Brasil, como em outros países (Chevalier & Dagrón, 1928; Carvalho, 1945). Com o objetivo de conservação dos recursos genéticos de *C. arabica*, a FAO organizou nos anos 1964-1965 uma expedição de coleta de germoplasma cafeeiro de ocorrência espontânea e subespontânea nas regiões de ocorrência natural da espécie, tendo sido coletadas 621 amostras de sementes da espécie (FAO, 1968), sendo que destas, 308 encontram-se em coleções vivas do IAC. Embora este material já tenha sido avaliado quanto às principais características agrônomicas (Carvalho et al., 1962; Carvalho et al., 1983; Silvarolla et al., 2000), pouco se sabe sobre a sua

diversidade ou estrutura genética em função dos diferentes locais onde as coletas foram realizadas. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo principal avaliar a diversidade e estrutura genética de acessos de *C. arabica* presentes no Banco Ativo de Germoplasma do IAC por meio de microssatélites.

Material e Métodos

No total foram avaliados 115 genótipos presentes no Banco Ativo de Germoplasma do IAC: 100 acessos de *C. arabica*, sendo 74 de ocorrência espontânea e subespontânea nas regiões da Etiópia e Eritreia, 13 cultivares comerciais desenvolvidas pelo programa de melhoramento do IAC e 13 acessos provenientes de material cultivado no Iêmen (Tabela 1 e Figura 1). A amostragem dos acessos provenientes de diferentes locais de coleta da Etiópia e Eritreia foi proporcional à representatividade dos mesmos no BAG. Também foram incluídos 5 acessos de *C. eugenioides*, 4 acessos de *C. racemosa* e

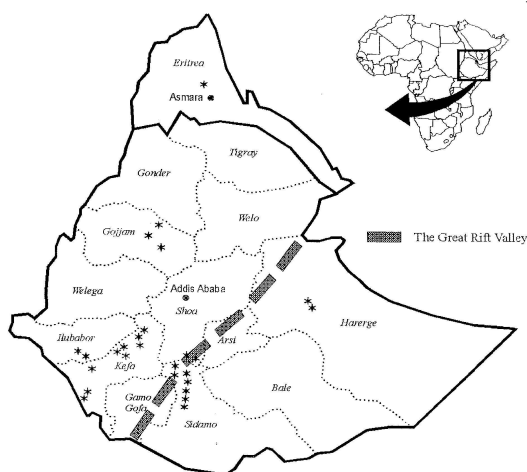


Figura 1. Locais de coleta das formas espontâneas e sub-espontâneas dos acessos de *C. arabica* presentes no banco ativo de germoplasma do IAC.

Fonte: Anthony et al. (2001).

6 acessos de *C. canephora* por serem espécies importantes na história evolutiva do café e por possuírem genes de interesse para o melhoramento do cafeeiro.

O DNA total foi extraído de folhas jovens, de acordo com o método desenvolvido por Stewart Jr. & Via (1993), baseado no uso de CTAB.

Dezesseis locos SSR foram utilizados neste estudo em função do maior grau de polimorfismo detectado em linhagens comerciais de *C. arabica* (Maluf et al. 2005). As condições de amplificação foram: 40 ng de DNA genômico, 1 mM de tampão, 0,2 mM de dNTP, 2mM de MgCl₂, 5 pmoles de cada primer e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase em 25 µL de reação. O ciclo total de amplificação foi de 5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 min. de desnaturação a 95°C, 1 min. de anelamento dos *primers* a 60°C e 1 min. de alongação a 72°C e, ao final, 5 min. de alongação a 72°C. Os primers foram marcados com fluorescência e os fragmentos amplificados foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (5%), sob condições denaturantes, no seqüenciador automático (ABI 377). A análise dos produtos amplificados foi realizada através dos programas GENESCAN e GENOTYPER (Applied Biosystem).

Os acessos foram caracterizados pela presença (1) ou ausência (0) de bandas ou alelos. A distância genética entre todos os acessos foi estimada como o complemento do coeficiente de Jaccard (Link et al. 1995) que por sua vez foi utilizada para realização da análise de agrupamento (UPGMA), seguida da análise de consistência da árvore pelo método “bootstrap” para 1000 re-amostragens (Felsenstein 1985). As análises foram realizadas com o programa Treecon (Van de Peer & Watcher 1994).

Tabela 1: Acessos de *Coffea* avaliados.

Grupos ou espécies	Número de acessos
Eritreia (ER)	1
Geisha (GE)	1
Sidamo (SI)	6
Harar (HA)	2
Shoa (SH)	3
Kafa (KA)	34
Illubabor (IL)	16
Gojjan (GO)	11
Iêmen (IE)	13
<i>C. eugenioides</i>	5
<i>C. canephora</i>	6
<i>C. racemosa</i>	4
Cultivares comerciais	13
TOTAL	115

Resultados e Discussão

Os 16 pares de primers utilizados amplificaram um total de 121 fragmentos ou alelos. Apesar de o marcador utilizado apresentar expressão co-dominante, a caracterização molecular foi realizada considerando-se a presença ou ausência de bandas, não sendo possível identificar indivíduos heterozigotos ou homozigotos devido à natureza poliplóide da espécie *C. arabica*.

A análise de agrupamento apresentada na Figura 2 mostrou claramente a separação entre as espécies estudadas, sendo *C. canephora* geneticamente mais próxima de *C. arabica*, seguido de *C. eugenioides*. Este resultado é coerente com uma das hipóteses sobre a origem botânica da espécie *C. arabica*, que seria um híbrido natural de *C. canephora* e *C. eugenioides* (Lashermes et al., 1999). No entanto, estudos realizados por Lashermes et al. (1993), Ruas et al. (2000) e Silvestrini et al. (em preparação) mostraram maior proximidade genética de *C. eugenioides* com *C. arabica* do que com *C. canephora*. Estes resultados contrastantes podem estar relacionados com o diferente marcador utilizado nestes estudos (RAPD) e/ou com os diferentes critérios de amostragem do material avaliado. Conforme também observado nestes trabalhos, *C. racemosa* foi a espécie mais distante geneticamente de *C. arabica* e das demais espécies do gênero *Coffea*.

Com relação à avaliação da diversidade dentro de *C. arabica*, dois grupos principais foram identificados. O primeiro formado pelo material cultivado do Brasil e Iêmen, e o segundo pelos acessos de ocorrência espontânea ou subespontânea. Este último grupo apresentou considerável diversidade genética quando comparado ao material cultivado, principalmente os acessos de Kaffa e Illubabor. Houve uma tendência de separação dos acessos de Sidamo em relação aos oriundos do outro lado do *Great Rift Valley*: Kaffa, Gojjam, Illubabor, Eritreia (Figuras 1 e 2). No entanto, não foi verificada uma estruturação consistente entre os grupos, como nos trabalhos de Lashermes et al. (1996) e Anthony et al. (2001). Este resultado indica a origem comum dos acessos das diferentes regiões, confirmando a hipótese de que as plantas de *C. arabica* do sudeste da Etiópia foram introduzidas pelo homem a partir de plantas existentes na região sudoeste (Anthony et al. 2001).

Dentro do grupo dos cultivados observou-se nítida estrutura genética, com os acessos do Iêmen divergindo das cultivares comerciais, ambos os grupos com baixa diversidade genética. Estes resultados estão de acordo com a já constatada estreita base genética do material cultivado (Lashermes et al., 1996; Anthony et al. 2001; Maluf et al. 2005) e com a história evolutiva de *C. arabica*, ou seja, os cafeeiros atuais originaram-se de poucas plantas introduzidas no país no início século XVIII, que por sua vez são provenientes dos primeiros cultivos da espécie no Iêmen no século XVI (Chevalier & Dargon, 1928; Carvalho, 1945).

De um modo geral, os dados moleculares revelados pelos marcadores microsatélites confirmaram as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Coffea* estudadas, bem como foram eficientes para estruturar e quantificar a variabilidade genética dentro de *C. arabica*. Os acessos espontâneos e subespontâneos de *C. arabica* presentes no Banco Ativo de Germoplasma do IAC representam uma considerável fonte de variabilidade genética para fins de melhoramento.

Referências bibliográficas

- Anthony, F.; Bertrand, B.; Quiros, O.; Wilches, A.; Lashermes, P.; Berthaud, J. & A. Charrier (2001). Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica*, 118:53-65.
- Berthaud, J. & A. Charrier (1988). Genetics resources of *Coffea*. In: Clarke R.J. & R. Macrae (Eds.) *Coffee vol 4: Agronomy*. Elsevier Applied Science, London. pp. 1-42.
- Carvalho, A. (1945). Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie *Arabica*. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café*, 21:174-180.
- Carvalho, A.; Mônaco, L.C. & H.J. Scaranari (1962). Variação na produtividade de cafeeiros importados, com referência especial ao material da Etiópia e Sudão. *Bragantia*, 21(13): 215-239.
- Carvalho, A.; Fazuoli, L.C.; Levy F.A.; Guerreiro Filho, O. & P. Mazzafera (1983). Observações sobre características dos frutos de introduções de *Coffea arabica* da Etiópia. Resumos. *10º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, Poços de Caldas, MG. pp. 90-92.
- Chevalier, A. & M. Dargon (1928). *Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique*. Communications et Actes de l'Académie des Sciences Coloniales, Paris.
- CONAB (2005). Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. www.conab.gov.br.
- FAO (1968). *FAO Coffee mission to Ethiopia 1964-1965*. FAO, Rome. 200p.

- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Krug, C.A. & A. Carvalho (1951). The genetics of *Coffea*. In: Demerec, M. (Ed.) *Advances in Genetics*. Academic Press, New York. v. 4, p. 127-158.
- Link, W.; Dixkens, C.; Singh M.; Schwall, M. & A. E. Melchinger (1995). Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 27-32.
- Lashermes, P.; Cros, J.; Marmey, P. & A. Charrier (1993). Use of random amplified DNA markers to analyze genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 40: 91-93.
- Lashermes, P.; Trouslot, P.; Anthony, F.; Combes, M.C. & A. Charrier (1996). Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica*, 87: 59-64.
- Lashermes, P.; Combes, M.C.; Robert, J.; Trouslot, P.; D'Hont, A.; Anthony, F. & A. Charrier (1999). Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular Genetics and Genomics*, 261: 259-266.
- Maluf, M.P.; Silvestrini, M.; Ruggiero, L.M.C.; Guerreiro Filho, O. & C. Colombo (2005). Genetic diversity of cultivated *Coffea* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. *Scientia Agricola* (no prelo).
- Ruas, P.M.; Diniz, L.E.C.; Ruas, C.F. & T. Sera (2000). Genetic polymorphism in species and hybrids of *Coffea* revealed by RAPD. In: Sera, T.; Soccol, C. R.; Pandey, A.; Roussos, S. (Ed.). *Coffee Biotechnology and Quality. Proc. of the 3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry, Londrina, Brazil*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 187-195.
- Silvarolla, M.B.; Mazzafera, P. & M.M.A. Lima. (2000). Caffeine content of Ethiopian *Coffea arabica* beans. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1): 213-215.
- Silvestrini, M.; Maluf, M.P. & O. Guerreiro Filho. Genetic diversity of *Coffea* Active Bank Germplasm of IAC assessed by RAPD marker. (Em preparação).
- Stewart Jr, C.N. & L.E. Via. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 14 (5): 748-750.
- Sylvain, P.G. (1955). Some observations on *Coffea arabica* L. in Ethiopia. *Turrialba*, 5: 37-53.
- Thomas, A.S. (1942). The wild arabica coffee on the Boma Plateau, Anglo-Egyptean Sudan. *Empire Journal of Experimental Agriculture*, 10: 207-212.
- Van de Peer, Y. & R. Wachter (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*, 10: 569-570.

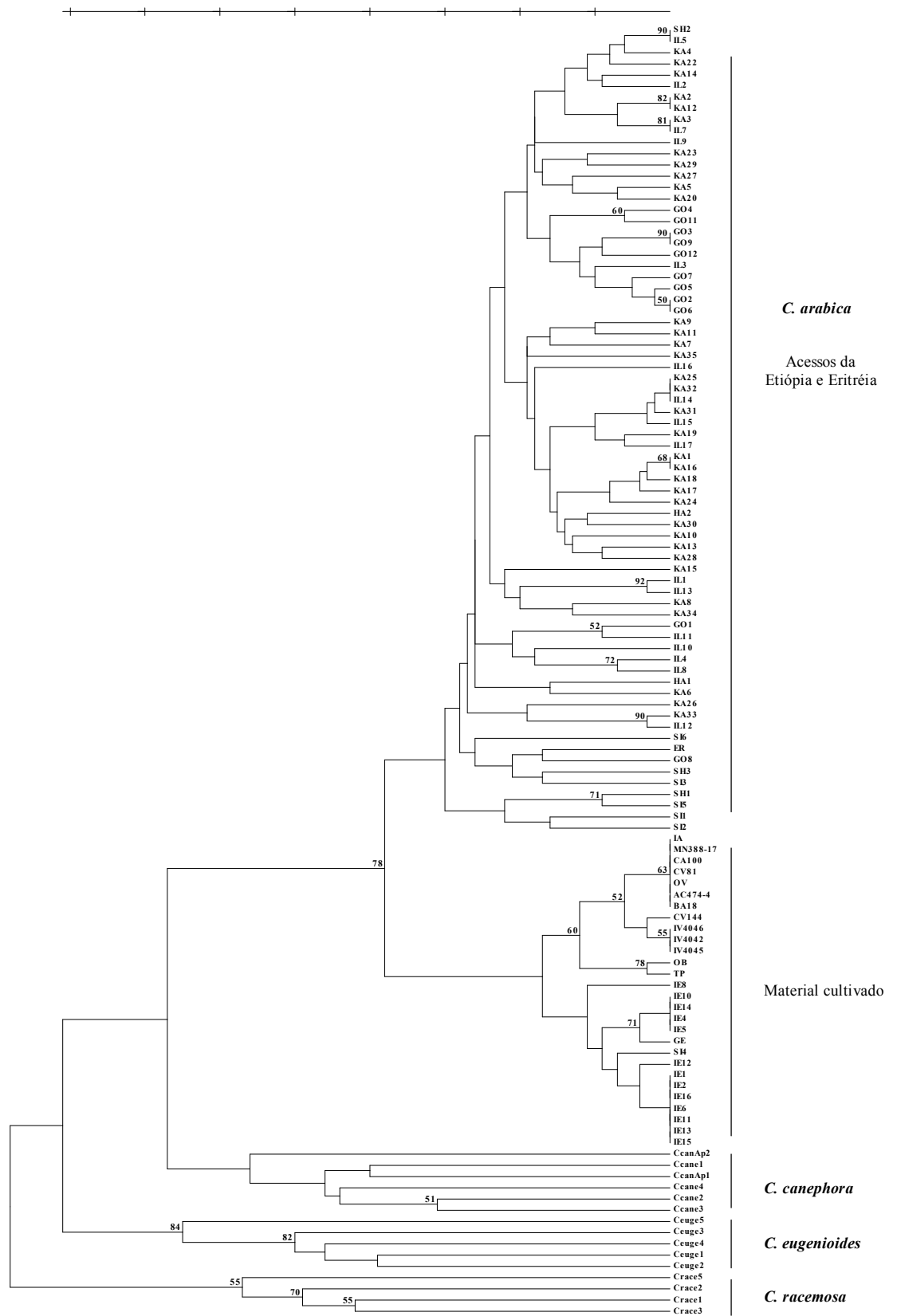


Figura 2 – Dendrograma com 115 acessos de *Coffea* baseado nas distâncias genéticas de Jaccard obtidas por marcadores microsatélites, utilizando-se o método UPGMA. Números nos ramos correspondem aos valores de “bootstrap” acima de 50% (1000 re-amostragens).