

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DE CAFEIROS BOURBON¹

Rosa Karla Nogueira Pestana²; Eveline Teixeira Caixeta³; Antonio Carlos Baião de Oliveira⁴; Antonio Alves Pereira⁵; Karoliny Ferreira Moreira⁶; Eunize Maciel Zambolim⁷; Laércio Zambolim⁸; Ney Sussumu Sakiyama⁹

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa & Desenvolvimento/Café, INCT Café, CNPq e Fapemig.

²Doutora em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa-UFV, karlapestana6@yahoo.com.br.

³Pesquisadora, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, eveline.caixeta@embrapa.br; autor correspondência.

⁴Pesquisador, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, baião.embrapa@gmail.com.

⁵Pesquisador, DSc, Epamig, Viçosa, pereira@epamig.br.

⁶Graduanda de agronomia, UFV, karoliny.moreira@ufv.br.

⁷Pesquisadora, DSc, Bioagro, UFV, Viçosa, eunize@ufv.br.

⁸Professor, PhD, Departamento Fitopatologia, UFV, Viçosa, zambolim@ufv.br.

⁹Professor, DSc, Departamento Fitotecnia, UFV, Viçosa, sakiyama@ufv.br.

RESUMO: A caracterização molecular tem sido realizada em Bancos de Germoplasma para conhecer a diversidade genética entre e dentro dos acessos, o que é crucial para o manejo eficiente e utilização dessas coleções. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar os acessos de Bourbon do Banco de Germoplasma de café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), por meio de marcadores moleculares AFLP e SSR. Foram utilizados 439 cafeeiros do grupo Bourbon, além de acessos de outros grupos como Típica, Sumatra, Mundo Novo, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Caturra Vermelho, Caturra Amarelo e Amarelo de Botucatu, que apresentam características de interesse para os programas de melhoramento do cafeeiro. Para conhecer a diversidade genética e a relação dos acessos foram realizadas análises de agrupamento usando 64 marcas SSR e AFLP. Os marcadores moleculares utilizados discriminaram a maioria dos cafeeiros analisados. Uma ampla variabilidade foi observada, sendo encontrados acessos de Bourbon geneticamente relacionados com cafeeiros dos diferentes grupos, incluindo as cultivares mais plantadas no Brasil. Os dados moleculares sugerem que, apesar da reconhecida base genética estreita de *C. arabica*, o germoplasma de Bourbon pertencente a Epamig apresenta relativa diversidade genética que pode ser explorada nos programas de melhoramento do cafeeiro.

PALAVRAS-CHAVES: *Coffea spp.*, variabilidade genética, SSR, AFLP

GENETIC DIVERSITY IN A COFFEE BOURBON GERMPLASM COLLECTION

ABSTRACT: Molecular characterization of germplasm bank has been carried out in order to know the genetic diversity within and between accessions. This characterization is crucial for the efficient utilization and management of the germplasm. Thus, the objective of this work was to characterize the Bourbon accession from Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) germplasm bank using AFLP and SSR molecular markers. For this, 439 Bourbon accessions were analyzed together with other coffee groups as Típica, Sumatra, Mundo Novo, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Caturra Vermelho, Caturra Amarelo and Amarelo de Botucatu. Cluster analysis were performed using 64 marker SSR and AFLP. These molecular markers discriminated most of the analyzed coffee. A relative variability was observed, and Bourbon accessions were genetically related to coffee of different groups, including the most planted cultivars in Brazil. These molecular data suggest that, despite the known narrow genetic base of *C. arabica*, the germplasm of Bourbon belongs to Epamig have genetic diversity that can be explored in coffee breeding programs.

KEYWORDS: *Coffea spp.*, genetic variability, SSR, AFLP

INTRODUÇÃO

Apesar de os recursos genéticos serem a base para o melhoramento, a variabilidade genética presente nos Bancos de Germoplasma permanece pouco explorada. Um dos principais motivos do uso incipiente da variabilidade genética disponível nos bancos é a dificuldade de se obter informações de interesse acerca dos acessos conservados (VALLS, 2007). Este fato evidencia a importância de atividades relacionadas à caracterização de germoplasma, principalmente para incentivar a utilização destes recursos em programas de melhoramento.

A caracterização molecular tem sido realizada em Bancos de Germoplasma para conhecer a diversidade genética entre e dentro dos acessos, o que é crucial para o manejo eficiente e utilização dessas coleções. Dessa forma, marcadores moleculares têm sido comumente utilizados para identificar redundâncias nas coleções de germoplasma o que tem ajudado a resolver problemas de gerenciamento nos bancos (CRUZ et al., 2013). Além disso, são utilizados para

analisar a representatividade e a riqueza alélica da coleção, similaridade genética dos acessos, determinar as relações entre acessos, elucidar as relações evolutivas e auxiliar na identificação de cultivares (CIDADE et al., 2013).

De modo geral, a caracterização molecular permite o melhor manejo dos acessos e fornece subsídios para a conservação do germoplasma, bem como para a utilização em programas de melhoramento, como escolha eficiente dos parentais e definição das estratégias mais adequadas de melhoramento (DANTAS et al., 2012).

O Banco de Germoplasma de *Coffea spp.* da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) é considerado um dos mais importantes bancos de café do Brasil. A coleção conta, atualmente, com 1594 acessos. Destes, aproximadamente 140 acessos correspondem a genótipos de *C. arabica* do grupo Bourbon. Os cafeeiros Bourbons são reconhecidos internacionalmente por apresentarem elevado potencial na produção de cafés de qualidade superior de bebida. Esta é uma característica muito valorizada nos mercados de cafés especiais (GIOMO & BORÉM, 2011).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar os acessos de Bourbon do Banco de Germoplasma de café da Epamig, por meio de marcadores moleculares AFLP e SSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Um total de 439 cafeeiros do grupo Bourbon, pertencentes a 79 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Epamig, localizado na Fazenda experimental de Patrocínio, em Patrocínio, MG, foram analisados. Além dos Bourbons, foram analisados acessos de Típica, Sumatra, Mundo Novo, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Caturra Vermelho, Caturra Amarelo e Amarelo de Botucatu, que apresentam características de interesse para os programas de melhoramento do cafeeiro.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens liofilizadas, utilizando o método descrito por Diniz et al. (2005). A avaliação da qualidade do DNA foi realizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e sua concentração verificada em espectrofotômetro NanoDrop, da Thermo Scientific.

Marcador SSR

Inicialmente, foram testados 67 pares de *primers* SSR de cafeeiro. Os dez pares de *primers* que apresentaram polimorfismo foram selecionados para genotipagem. As reações de amplificação foram realizadas conforme metodologia descrita por Missio et al. (2009) e a detecção do polimorfismo dos marcadores realizada em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e corado com nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito por Brito et al. (2010). Neste estudo, o marcador SSR foi tratado como dominante devido ao nível de ploidia dos acessos. Conseqüentemente, a genotipagem dos acessos foi feita com base na ausência (0) e presença (1) de bandas.

Marcador AFLP

A técnica de AFLP foi realizada conforme metodologia descrita por Brito et al. (2010). Dez combinações de *primers* seletivos de EcoRI e MseI (E-CGA/M-AGC, E-CGC/M-ATA, E-CTT/M-AGC, E-CCT/M-ATA, E-CAT/M-AGC, E-CGT/M-AGT, E-CCC/M-ACG, E-CGA/M-AAG, E-CCA/M-AGA e E-CCC-M/AGA) foram utilizadas. O polimorfismo foi observado em gel de poliacrilamida desnaturante (6%), corado com prata. Os fragmentos amplificados foram avaliados como ausência (0) e presença (1) de bandas.

A fim de confirmar a repetibilidade do marcador AFLP, dez acessos de Bourbon foram selecionados e utilizados como repetição. Para tal, as etapas de extração, digestão, ligação e amplificação do DNA dos genótipos selecionados foram repetidas para verificar a eficiência da técnica. A partir dessa repetição, foram selecionadas as marcas nítidas para a análise dos dados.

Análise dos dados

A dissimilaridade genética entre os acessos foi calculada a partir do coeficiente de Nei e Li e, a matriz obtida foi utilizada para fazer o agrupamento dos acessos pelo método *Neighbor joining* (NJ), usando o *software* Mega v6.0 (TAMURA, et al., 2013). O dendograma foi editado com o *software* FigTree v1.4.0 (RAMBAUT, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A genotipagem dos 439 cafeeiros Bourbon, utilizando 10 *primers* SSR e 10 combinações de *primers* AFLP, permitiu a identificação de 64 alelos polimórficos, sendo 27 alelos detectados pelo marcador SSR e os outros 37 restantes pelo marcador AFLP. O número de alelos por loco variou de dois (EST-SSR02, EST-SSR23, SSRCa18, SSRCa45, SSR67,

SSR122 e SSR133) a seis (SSRCa80) com uma média de 2,7 alelos, no marcador SSR. Enquanto que, no AFLP variou de um (E-CTT/M-AGC) a seis (E-CGC/ M-ATA e E-CGT/M-AGT), com média de 3,7 alelos polimórficos por loco (Tabela 1). Para esse marcador, apenas as bandas nítidas presentes nas duas repetições foram consideradas.

Tabela 1. Locos SSR e AFLP analisados, com seus respectivos números de alelos por loco(Na).

Loco SSR	Na	Loco AFLP	Na*
EST-SSR 002	2	E-CGA/M-AGC	3
EST-SSR 023	2	E-CGC/M-ATA	6
SSR 018	3	E-CTT/M-AGC	1
SSR 067	2	E-CCT/M-ATA	3
SSR 095	4	E-CAT/M-AGC	3
SSR 122	2	E-CGT/M-AGT	6
SSR 133	2	E-CCC/M-ACG	4
SSRCa 018	2	E-CGA/M-AAG	4
SSRCa 045	2	E-CCA/M-AGA	3
SSRCa 080	6	E-CCC/M-AGA	4
Média	2,7		3,7

* Para AFLP foi considerado o número de alelos polimórficos por loco

Para conhecer a diversidade genética e a relação dos cafeeiros Bourbon do BAG da Epamig foram realizadas análises de agrupamento. O conjunto de dados obtido com os marcadores SSR e AFLP foi analisado em três etapas distintas. Na primeira etapa, foram analisados os acessos pertencentes aos diferentes grupos de cafeeiros. Esses grupos correspondem a diferentes introduções que ocorreram no Brasil (Típica, Bourbon e Sumatra), mutações encontradas e incorporadas no melhoramento genético (Caturra Vermelho, Caturra Amarelo e Amarelo de Botucatu) e as principais cultivares plantadas no país (Mundo Novo, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo). Foram analisados apenas nove acessos de Bourbon Vermelho e nove de Bourbon Amarelo. Esses Bourbons correspondem a plantas antigas, com mais de 100 anos de idade. O agrupamento desses cafeeiros permitiu a formação de três grupos (Figura 1).

No primeiro grupo ficaram todos os acessos de Típica e Bourbon Amarelo e dois Caturra Amarelo. Os cafeeiros Típica correspondem a introduções antigas que foram mantidas no IAC, na UFV e na Epamig. Os acessos de Bourbon Amarelo foram originados do cruzamento natural entre Bourbon Vermelho e Amarelo de Botucatu (CARVALHO, 1993) e mantidos pelo IAC desde que encontrados. Esses acessos ficaram alocados separadamente dos demais, provavelmente, por constituírem materiais mais antigos, mantido no Germoplasma, e por não terem sido utilizados nos programas de melhoramento para a obtenção dos demais grupos de cafeeiros avaliados. Além disso, o Bourbon Amarelo tem como um dos seus prováveis parentais o Amarelo de Botucatu, que é originado de uma mutação da cultivar Típica (CARVALHO, 1993), justificando o agrupamento com os acessos de Típica.

Devido a esse parentesco do Amarelo de Botucatu e Bourbon Amarelo, esperava-se que os acessos desses cafeeiros ficassem agrupados, no entanto, não foi o observado (Figura 1). Provavelmente, os acessos de Amarelo de Botucatu estudados que pertencem ao BAG não são próximos geneticamente do genótipo que deu origem ao Bourbon Amarelo.

O segundo grupo foi formado pelos acessos de Sumatra, Mundo Novo, Catuaí e Bourbon Vermelho. O Sumatra corresponde a uma introdução no Brasil, proveniente da Ilha de Sumatra (CARVALHO, 1993). O Mundo Novo foi originado de um cruzamento natural entre Sumatra e Bourbon Vermelho (CARVALHO, 1993). Portanto, a alocação desses cafeeiros nesse grupo era esperado. Dos acessos de Bourbon estudados, o BV57 foi o que ficou nesse grupo, sugerindo que esse seja o mais similar com aquele que deu origem ao Mundo Novo. A alocação do Catuaí deve-se ao fato de ter sido originado de um cruzamento artificial entre Mundo Novo e Caturra Amarelo (CARVALHO, 1993).

Os outros acessos de Bourbon Vermelho ficaram agrupados com os Caturras no terceiro grupo. A provável justificativa para o agrupamento é que tais acessos devem ser mais semelhantes com aqueles que originaram o Caturra Vermelho. O Bourbon Vermelho é originado da Ilha de Reunião e foi introduzido no Brasil com intuito de aumentar a produtividade na cafeicultura brasileira. Esta cultivar deu origem à maioria das cultivares de café, como por exemplo, o Caturra Vermelho que se originou de uma mutação no Bourbon Vermelho. Por outro lado, mutações no Caturra Vermelho deram origem ao Caturra Amarelo (CARVALHO, 1993).

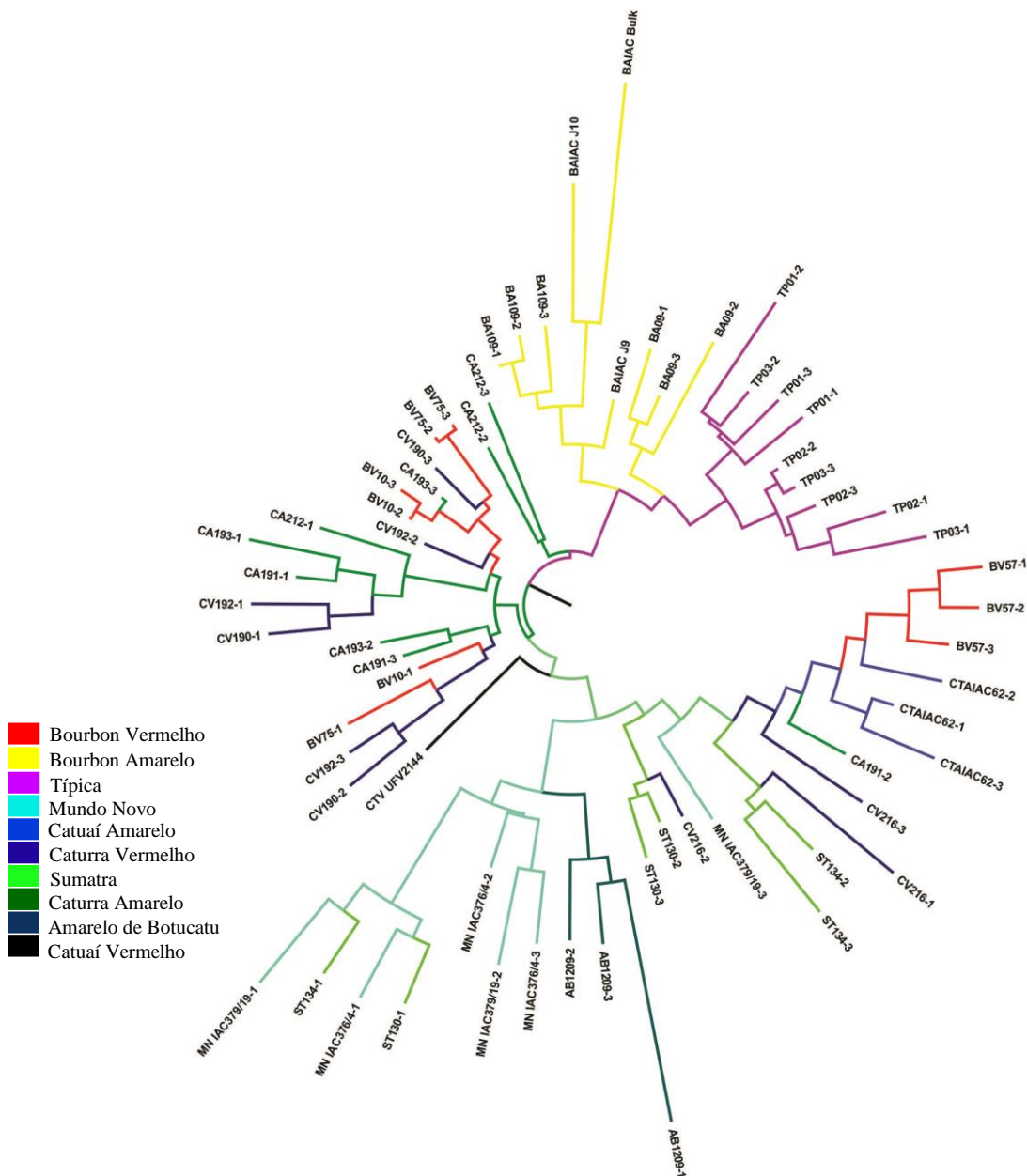


Figura 1. Dendrograma *Neighbor Joining* (NJ) dos diferentes grupos de cafeeiros do Banco de Germoplasma de *Coffea* spp. da Epamig.

Para a segunda etapa da caracterização do germoplasma, foi realizado um segundo agrupamento, considerando os diferentes grupos de cafeeiros (Típica, Sumatra, Caturra Vermelho, Caturra Amarelo, Amarelo de Botucatu, Mundo Novo, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo e Bourbon Amarelo) e os acessos de Bourbon Vermelho do BAG (Figura 2). Uma ampla variabilidade foi observada, sendo encontrados acessos de Bourbon Vermelho geneticamente relacionados com cafeeiros dos diferentes grupos.

Os resultados apresentados no dendrograma mostram que alguns acessos de Bourbon Vermelho são muito próximos da cultivar Mundo Novo. Observou-se também, acessos mais similares com a outra cultivar mais plantada no Brasil, a cultivar Catuaí. Esses resultados sugerem a possibilidade de ocorrência de híbridos ou misturas entre os acessos analisados.

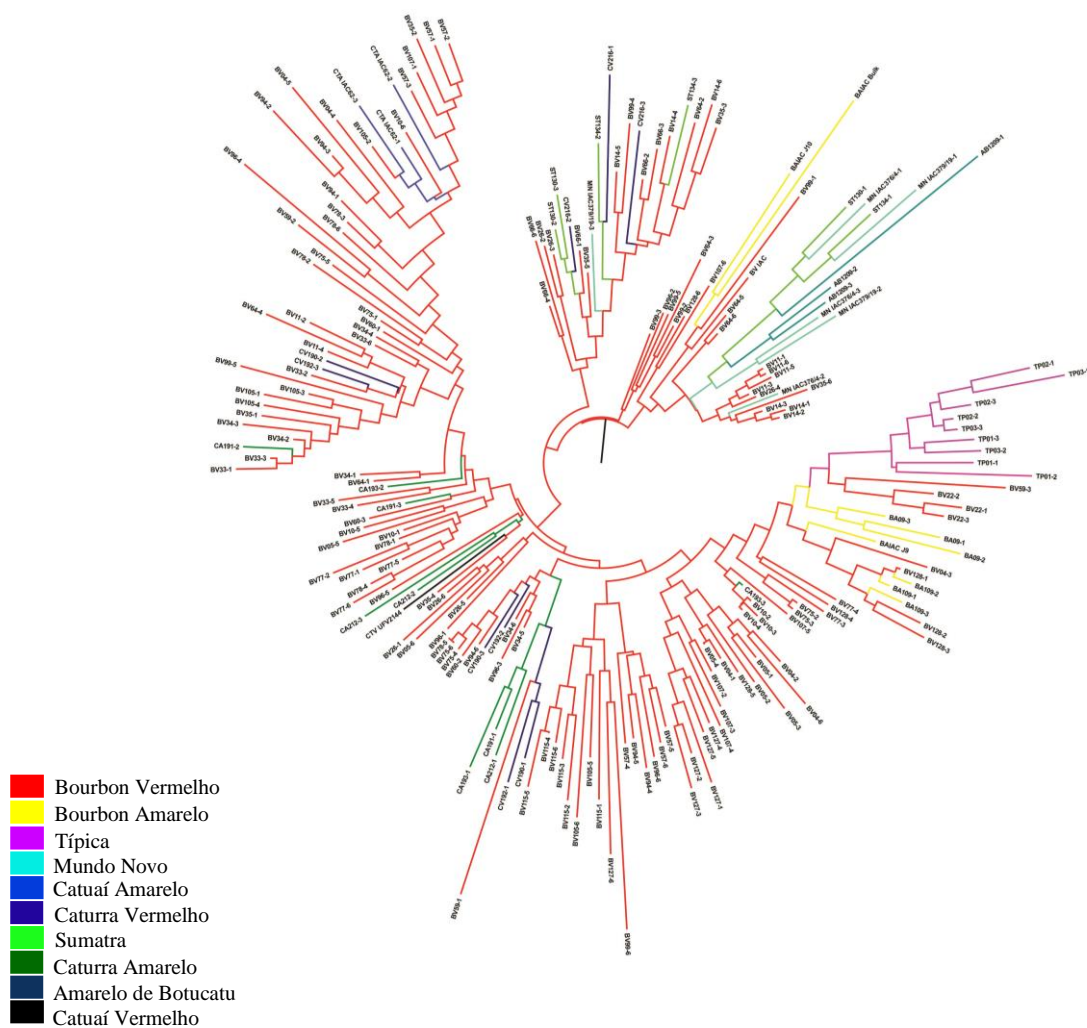


Figura 2. Dendrograma *Neighbor Joining* (NJ) de acessos de Bourbon Vermelho do Banco de Germoplasma de *Coffea* spp. da Epamig.

Na terceira etapa da caracterização molecular foi realizado o agrupamento considerando os diferentes grupos de cafeeiros (Típica, Bourbon Vermelho, Sumatra, Caturra Vermelho, Caturra Amarelo, Amarelo de Botucatu, Mundo Novo, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo) e os acessos de Bourbon Amarelo do BAG (Figura 3).

Assim como no agrupamento anterior, também foi observada variabilidade genética entre os acessos de Bourbon Amarelo. Os agrupamentos mostraram acessos de Bourbon Amarelo mais próximos de Mundo Novo e Catuaí. Dos acessos de Bourbon Amarelo mais semelhantes com o Catuaí, destaca-se o BA103. Em campo, foi observado que as plantas desse acesso apresentam porte baixo, que é fenótipo típico das cultivares de Catuaí. O porte baixo sugere que as plantas desse acesso correspondem a Catuaí ou híbridos com essa cultivar. No melhoramento genético o uso desses híbridos pode resultar em ganhos genéticos, sobretudo em programas que buscam o desenvolvimento de cultivares produtivas, com porte reduzido e qualidade superior de bebida.

De modo geral, os marcadores utilizados permitiram discriminar a maioria dos cafeeiros analisados. Esses dados moleculares sugerem que, apesar da reconhecida base genética estreita de *C. arabica*, o germoplasma de Bourbon pertencente a Epamig apresenta relativa variabilidade genética que pode ser explorada nos programas de melhoramento. Além disso, os dados fornecem informações de relações genéticas dos acessos de Bourbon, demonstrando aqueles que estão mais próximos e mais distantes das cultivares mais plantadas no Brasil. Estas informações devem auxiliar os melhoristas na escolha de genitores para possíveis hibridações em programas de melhoramento que buscam o desenvolvimento de cultivares com potencial para qualidade de bebida.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a coleta e conservação do germoplasma de Bourbon foram realizadas de forma eficiente visto a ampla variabilidade genética encontrada, a qual pode ser utilizada nos programas de melhoramento do cafeeiro.

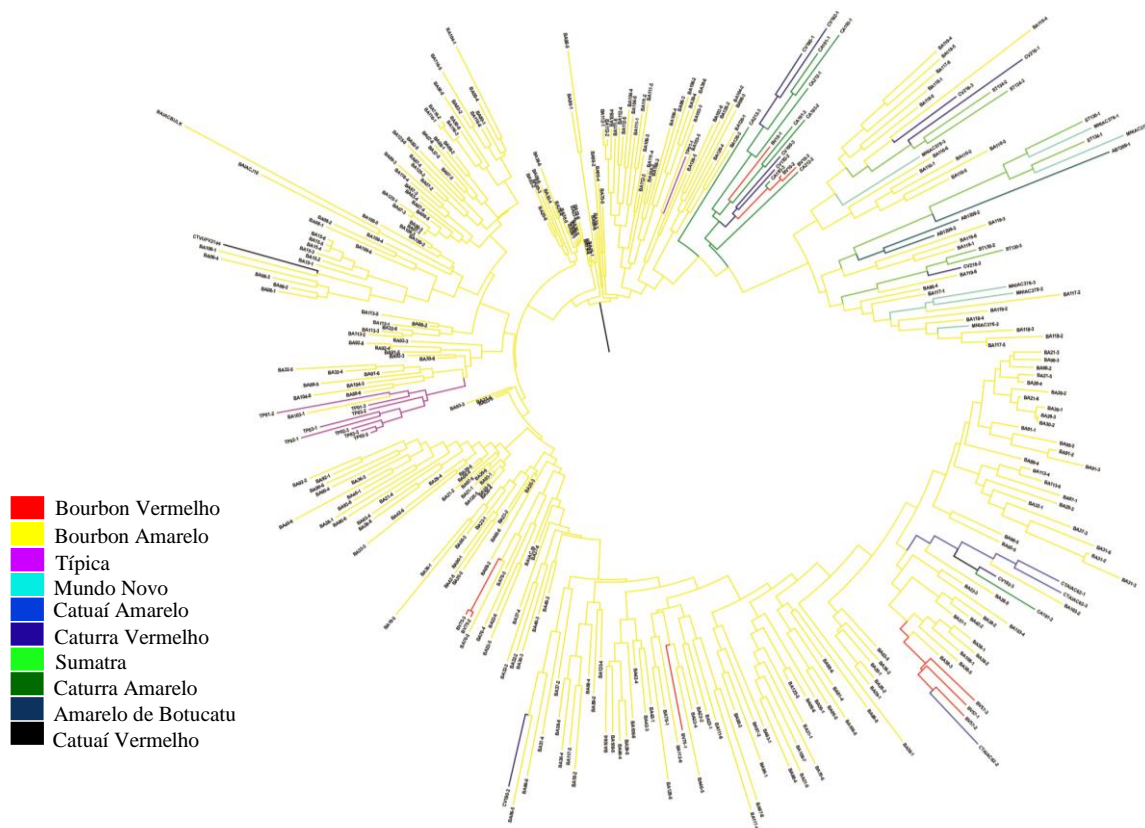


Figura 3. Dendrograma *Neighbor Joining* (NJ) de acessos de Bourbon Amarelo do Banco de Germoplasma de *Coffea* spp. da Epamig.

CONCLUSÃO

Existe variabilidade genética entre os acessos de Bourbon preservados no Banco Ativo de Germoplasma de *Coffea* spp. da Epamig, os quais podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas cultivares visando a produção de cafés com bebida superior e diferenciada. Assim, o conhecimento da dissimilaridade genética é essencial para a racionalização de cruzamentos e aumento da eficiência dos programas de melhoramento genético do cafeeiro.

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*, v. 173, n. 2, p. 255-264, 2010.
- CARVALHO, A. Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil. Documento IAC, Campinas, 34, 1993.
- DANTAS, A.C.A.; NUNES, G.H.S.; ARAÚJO, I.S.; ALBUQUERQUE, L.B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no nordeste brasileiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 1, p. 183-189, 2012.
- DINIZ, L. E. C.; SAKIYAMA, N. S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; 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*, v.5, p.387-393, 2005.
- GIOMO, G. S.; BORÉM, F. M. Cafés especiais no Brasil: opção pela qualidade. *Informe Agropecuário*, v.32, n. 261, p. 7-16, 2011.
- MISSIO, R. F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Development and validation of SSR markers for *Coffea Arabica* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 9, n. 4, p. 361-371, 2009.
- RAMBAUT A. Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.0. UK: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2012.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.30, p.2725-2729, 2013.
- VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L. (ed.). Recursos genéticos vegetais. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 281-305, 2007.