

## AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE CAFÉ E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS MELHORADAS<sup>1</sup>

SILVA, L.C.<sup>2</sup>; SAKIYAMA, N.S.<sup>3</sup> e OLIVEIRA, A.C.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Apoio financeiro: CNPq ; PNP&D Café; <sup>2</sup> UFV/BIOAGRO (eg37140@correio.cpd.ufv.br); <sup>3</sup> UFV/DFT (sakiyama@mail.ufv.br)

**RESUMO:** Este trabalho objetivou verificar a eficiência de marcadores RAPD, comparada a descritores morfológicos, como critérios de caracterização de linhagens melhoradas de café. Vinte e cinco linhagens melhoradas de café (23 linhagens de Catimor e duas de Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-15) do Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro da UFV/EPAMIG foram estudadas por meio de marcadores RAPD. Fez-se um “bulk” de DNA de cada progênie, constituído de 16 plantas da mesma progênie, que foi utilizado para amplificação do DNA pela técnica de RAPD-PCR. Para análise de agrupamento, utilizaram-se os métodos de Tocher e do vizinho mais próximo, baseados no complemento aritmético do Índice de Jaccard. Quatorze bandas polimórficas foram obtidas, com os “primers” OPH-19, OPJ-19, OPQ-12, OPA-8, OPX-10, OPY-16, OPY-18 e OPG-05 produzindo uma banda polimórfica cada e os “primers” OPI-07, OPP-6, OPX-16, duas bandas polimórficas cada. Neste estudo foram testados 80 “primers”, mas apenas 11 apresentaram polimorfismo. O método de agrupamento de Tocher distribuiu as 25 progênies em cinco grupos, de acordo com suas distâncias genéticas. Os marcadores moleculares proporcionaram agrupamentos mais coerentes com a genealogia do que marcadores morfológicos, mesmo quando estes apresentaram herdabilidade superior a 80%. Notou-se a importância da utilização de marcadores moleculares associados a marcadores morfológicos na caracterização de linhagens de café, visto que, quando não se pode utilizar caracteres como a cor do broto ou cor de fruto, os agrupamentos não ficaram muito coerentes com a genealogia. O “primer” OPQ-12 mostrou-se muito eficiente na distinção das progênies descendentes da progênie UFV 1340 (F4). Com os marcadores moleculares utilizados neste trabalho não foi possível a separação de progênies irmãs, mas apenas de grupos de progênies irmãs, dada a grande proximidade genética entre as progênies irmãs estudadas.

**Palavras-chaves:** *Coffea arabica*, identificação de linhagens, diversidade genética, RAPD.

## EVALUATION OF THE GENETIC VARIABILITY AMONG COFFEE ACCESSES AND IDENTIFICATION OF IMPROVED LINEAGE S

**ABSTRACT:** This work had as goal to verify the efficiency of RAPD markers, compared the morphological characters, as criteria of characterization of coffee improved lines. Twenty-five lines (23 Catimor lines and two Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-15 lines) from UFV/EPAMIG Coffee Genetic Improvement Program were studied through RAPD markers. A DNA bulk of each progeny was made, constituted of 16 plants of the same progeny that was used for DNA amplification by RAPD-PCR technique. The Tocher method and the single linkage method were used for grouping analysis that based on the arithmetic complement of the Jaccard Index. Fourteen polymorphic bands were gotten, with each the primers OPH-19, OPJ-19, OPQ-12, OPA-8, OPX-10, OPY-16, OPY-18 and OPG-05 producing a single polymorphic band and each the primers OPI-07, OPP-6 and OPX-16, two polymorphic bands. In this work 80 primers were tested, but just 11 primers were polymorphics. The Tocher method distributed the 25 progenies in five groups in agreement with your genetic distances. The molecular markers provided more coherent groupings with the genealogy than morphological markers, however these characters heritabilities are been higher 80%. It was noticed the importance of the molecular markers use associated to morphological markers in the characterization of coffee lines, because when cannot use characters as the sprout color or fruit color, the groupings were not very coherent with the genealogy. The primer OPQ-12 was shown very efficient in the distinction of the progenies derived from UFV 1340 (F<sub>4</sub>) progeny. With the molecular markers used in this work it cannot discriminate the full-sib progenies, just enable to grouping them, because of the great genetic proximity among the studied full-sib progenies.

**Key words:** *Coffea arabica*, fingerprinting, genetic diversity, RAPD.

### INTRODUÇÃO

O subgênero *Coffea* compreende cerca de 100 espécies distribuídas em diferentes seções. Das espécies cultivadas, *Coffea arabica* e *Coffea conephora* são as de maior importância econômica, embora outras espécies tenham uma valiosa reserva de genes para diferentes propostas do melhoramento genético. Pesquisas na área do melhoramento genético do cafeeiro no Brasil resultaram na obtenção de cultivares com potencial produtivo quase 240% superior ao das cultivares tradicionais. Entretanto, evidências

históricas indicam que as populações básicas para as seleções das cultivares atuais originaram-se de poucas plantas introduzidas na América Latina vindas do Iermen (Teixeira et al., 1999).

A variabilidade conservada nos bancos de germoplasma deve ser caracterizada, e identificada o que, na maioria das vezes, é realizado mediante o uso de características morfológicas, e estas apresentam uma série de dificuldades e desvantagens, pois são altamente influenciadas pelo ambiente e são de expressão tardia em etapas fenológicas, como, por exemplo, características de flor, fruto, etc., especialmente naquelas espécies de vida juvenil larga (café, cacau, fruteiras). Atualmente, existem técnicas mais precisas que complementam a caracterização de genótipos, dentre as quais podem-se citar eletroforese de isoenzimas, de proteínas e de DNA (RAPD, RFLP). As proteínas e isoenzimas representam a expressão direta dos genes em um ambiente e em determinada idade da planta; já a eletroforese do DNA mede a variabilidade diretamente na cadeia de DNA (Bustamante e Polanco, 1999).

Desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD na análise genética e no melhoramento de plantas tem tido uma difusão extremamente rápida, e uma de suas aplicações, dentre as várias, é a obtenção de “fingerprints” genômicos de indivíduos, variedades e populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Caracterização de padrão molecular (DNA fingerprinting) é a identificação do genótipo por meio de marcadores de DNA. Os padrões moleculares permitem identificar diferenças e similaridades entre indivíduos em nível de DNA. O uso de padrões moleculares tem sido freqüente nos estudos de diversidade genética das espécies presentes em bancos de germoplasma e na natureza. Essas informações adicionais sobre a diversidade genética facilitam a identificação de novas variantes na natureza a serem introduzidas nos bancos de germoplasma, ou de duplicações a serem eliminadas.

Em 25 de abril de 1997, o Presidente da República sancionou a Lei nº 9.456, de Proteção de Cultivares, e o Brasil passou a contar com um novo mecanismo legal para proteger variedades de plantas que apresentem características de novidade, distinção, homogeneidade e estabilidade genética (Sampaio, 1998, citado por Severino, 2000).

Proteção de cultivares é um instrumento de segurança para melhoristas e instituições de pesquisa. Para serem protegidas, as cultivares precisam ser distintas, homogêneas e estáveis. Distinta significa ser plenamente diferenciável de outros cultivares; homogênea significa apresentar variabilidade mínima nos descritores quando plantada em escala comercial; e estabilidade implica que em gerações sucessivas a homogeneidade persiste (Vasconcelos Neto et al., 1990, citados por Severino, 2000).

Padrões moleculares podem ser utilizados como descritores genéticos, para fins de identificação de cultivares. As limitações dos marcadores morfológicos utilizados para descrever as cultivares, de forma a

dar-lhes a distinguibilidade prevista na Lei de Proteção de Cultivares, podem ser diminuídas pela inclusão de marcadores de DNA.

Em estudos recentes, Severino (2000) constatou a dificuldade de estabelecer critérios de caracterização de linhagens melhoradas de café por meio de descritores morfológicos. Comparando a genealogia conhecida do material estudado com diferentes agrupamentos calculados com base nesses descritores, verificou-se que resultados coerentes foram obtidos somente quando se trabalhou com descritores apresentando alta herdabilidade. Este mesmo autor, em seu trabalho com descritores morfológicos, comparou a genealogia de progênes de Catimor com agrupamento quando se consideram os descritores com herdabilidade superior a 80%, herdabilidade superior a 50% e todos os descritores utilizando o Método de Tocher e distâncias de Mahalanobis.

No agrupamento em que Severino (2000) considerou apenas os dez descritores com herdabilidade acima de 80% houve relativa eficiência. Foram formados seis grupos, sendo o maior composto por dez progênes, o segundo por oito, um quádruplo e três unitários. As progênes dos grupos {UFV 6831}, {UFV 6861; ...; UFV 6870} e {UFV 6903} que possuem progenitor comum em F4 compuseram o primeiro grupo, mostrando coerência entre a genealogia e o agrupamento obtido. O segundo grupo foi formado por ambos os tratamentos de Catuaí contíguos e quatro das cinco progênes do grupo {UFV 5464;...;UFV 5480} que foram agrupadas contíguas. As progênes {UFV 5510; UFV 5512} foram postas no mesmo grupo, mas não contíguas. Já no agrupamento em que o referido autor utilizou descritores com herdabilidades acima de 50% houve menor eficiência de agrupamento, quando se compara com o agrupamento utilizando descritores com herdabilidade acima de 80%. Quando ele considerou todos os descritores a eficiência de agrupamento foi ainda menor.

Severino (2000) constatou ainda que a cor do broto, único descritor com herdabilidade igual a 100%, teve grande importância no agrupamento das progênes. Este descritor pode separar sem erro as progênes descendentes de UFV 1340 (F4) das demais progênes. Com a exclusão deste, o agrupamento foi prejudicado, embora ele seja apenas um descritor no meio de outros dez. O maior grupo passou a se compor de 80% das progênes, e dentro deste grupo a distribuição parece um pouco aleatória. A importância de descritores qualitativos está muito ligada à população que está sendo estudada. Em seu estudo, a cor do broto mostrou-se muito importante, porém, em uma população em que todos os cafeeiros tivessem a mesma cor do broto, esta característica não traria nenhuma informação discriminatória. A cor dos frutos é descritor qualitativo de grande importância, mas na população de Catimor e Catuaí estudada todos os frutos eram vermelhos, portanto este descritor não pôde ser utilizado. Assim, o presente trabalho

teve como objetivo verificar a eficiência de marcadores RAPD comparada a descritores morfológicos como critérios de caracterização de linhagens melhoradas de café (*Coffea arabica* L.).

## MATERIAL E MÉTODOS

O material genético utilizado neste trabalho foi composto de 25 progênies melhoradas de *Coffea arabica*, sendo 23 derivadas da população Catimor e duas do cultivar Catuaí vermelho LCH 2077-2-5-15, pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro da UFV/EPAMIG. A população designada Catimor compreende os cafeeiros descendentes do cruzamento da variedade Caturra Vermelho versus o Híbrido de Timor. O experimento foi plantado no ano de 1995 no Centro Experimental Elói Carlos Heringer, situado no município de Martins Soares-MG, BR 262, Km 14. As 23 progênies de Catimor utilizadas neste trabalho foram: UFV 5530, UFV 5527, UFV 5525, UFV 5512, UFV 5510, UFV 5451, UFV 5450, UFV 5492, UFV 5464, UFV 5475, UFV 5478, UFV 5479, UFV 5480, UFV 5550, UFV 4221, UFV 6903, UFV 6870, UFV 6867, UFV 6866, UFV 6864, UFV 6863, UFV 6861 e UFV 6831.

As amostras foram obtidas de um experimento em delineamento experimental do tipo látice, com 25 tratamentos, seis repetições e quatro plantas por parcela. Cada parcela constituiu uma amostra simples com quatro folhas, sendo uma folha de cada planta da parcela. Foram obtidas dessa forma 150 amostras simples, e cada progênie estava representada por seis amostras simples, devido às seis repetições. Extraiu-se o DNA de todas as amostras simples separadamente, e após a extração e quantificação do DNA fez-se um “bulk” de cada progênie, constituído de quatro amostras simples, o qual foi utilizado para os estudos efetuados neste trabalho. Para quantificação do DNA foi utilizada a técnica de análise comparativa de amostras coradas com brometo de etídio em gel de agarose.

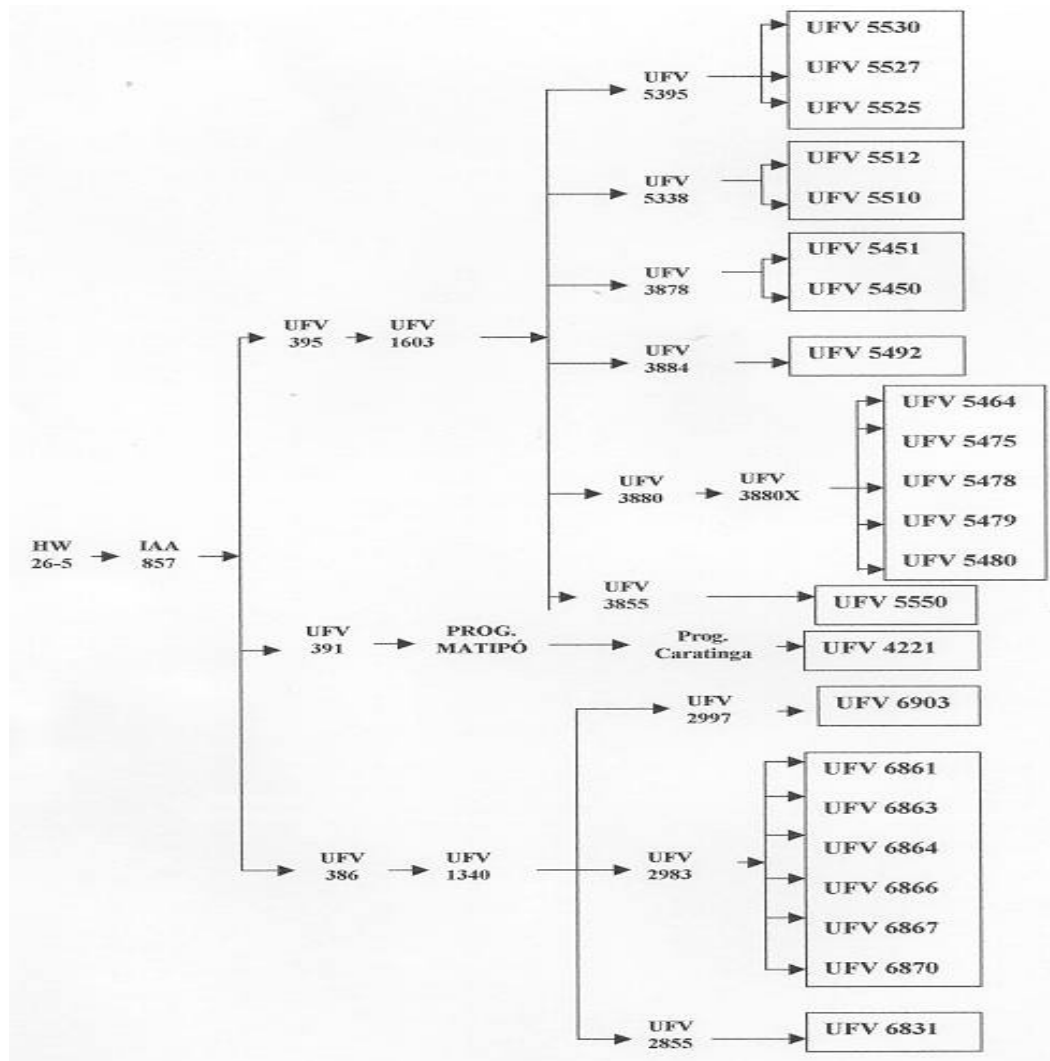
A amplificação de DNA foi realizada segundo a técnica de RAPD-PCR. O DNA amplificado foi corado com azul-de-bromofenol 1,2X e, em seguida, fez-se a aplicação de 14 µL desta solução em gel de agarose 1,4%, imerso em uma cuba de eletroforese contendo tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X, também foram aplicados 10 µL de marcador molecular de peso 1Kb DNA Ladder (1 ng/µL). Em seguida, realizou-se a eletroforese a 80 Volts por quatro horas. Após a eletroforese, fez-se a coloração do gel de agarose em brometo de etídio, sendo feita em seguida a fotodocumentação com uso de luz ultravioleta no aparelho Estratagene Eagle Eye II.

Para análise de agrupamento, foram utilizados o método hierárquico do vizinho mais próximo (Mardia et al., 1980; Cruz e Regazzi, 1997) e o método de otimização de Tocher (Cruz e Regazzi, 1997), que se fundamentaram na matriz de dissimilaridades genéticas gerada a partir do complemento aritmético

do Índice de Jaccard (Dias, 1998). Todas as análises genético-estatísticas foram processadas no Programa Genes (Cruz, 1997).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quatorze bandas polimórficas foram obtidas, e os “primers” OPH-19, OPJ-19, OPQ-12, OPA-8, OPX-10, OPY-16, OPY-18 e OPG-05 produziram uma banda polimórfica cada e os “primers” OPI-07, OPP-6, OPX-16, duas bandas polimórficas cada. Neste estudo foram testados 80 “primers”, mas apenas 11 apresentaram polimorfismo, em razão do grande parentesco entre as progênes testadas, como pode ser observado na Figura 1.



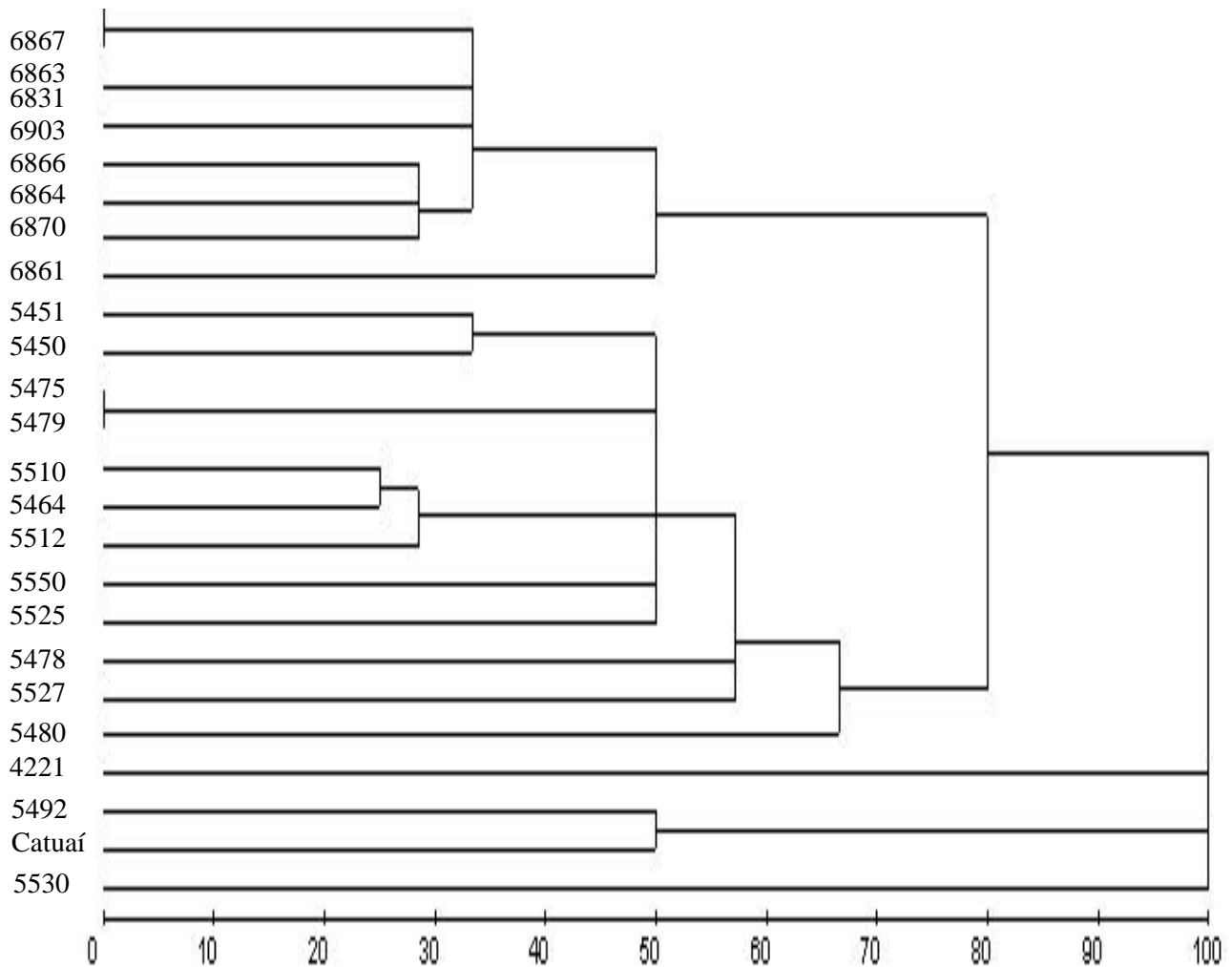
**Figura 1** - Árvore genealógica de progênes de Catimor estudadas, destacando grupos de progênes irmãs.

Observa-se, no Quadro 1, que pelo método de agrupamento de Tocher foram formados cinco grupos das progênes estudadas, sendo o grupo 1 formado por todas as progênes descendentes do progenitor UFV 1603 (F4), com exceção apenas de UFV 5530, que foi agrupada separadamente, formando o grupo 4, e também a UFV 5492, que foi agrupada com o Catuaí, formando o grupo 3. O grupo 2 foi formado por todas as progênes descendentes do progenitor UFV 1340 (F4); o mesmo resultado para o grupo 2 foi obtido por Severino (2000), quando este utilizou para análise de agrupamento pelo método de Tocher caracteres morfológicos com herdabilidade superior a 80%. O grupo 5 foi formado apenas pela progêne UFV 4221, descendente do progenitor UFV 391 (F3).

**Quadro 1** - Agrupamento de 25 progênes de Catimor e de Catuaí Vermelho pelo método de Tocher com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do Índice de Jaccard obtida a partir de marcadores RAPD

Grupos	Indivíduos
1	UFV 5475; UFV 5479; UFV 5464; UFV 5450; UFV 5550; UFV 5510; UFV 5512; UFV 5451; UFV 5525; UFV 5527; UFV 5478; UFV 5480.
2	UFV 6867; UFV 6863; UFV 6870; UFV 6864; UFV 6866; UFV 6831; UFV 6903; UFV 6861.
3	UFV 5492; CATUAÍ.
4	UFV 5530
5	UFV 4221

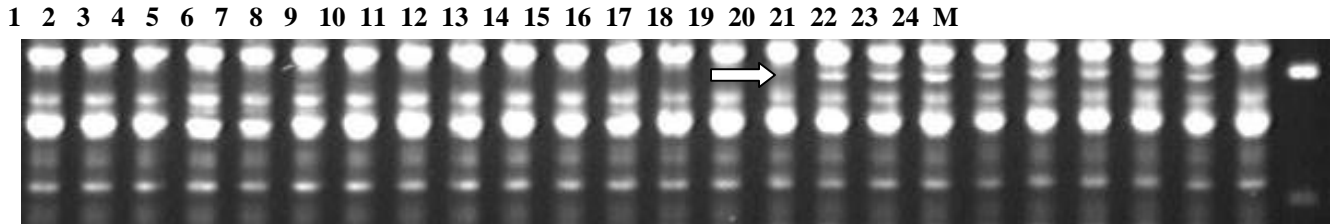
Observa-se no dendrograma (Figura 2) que, fazendo-se um corte em 70% da distância máxima obtêm-se os mesmos resultados do agrupamento pelo método de Tocher. Também pode ser observado, que as progênes UFV 6867 e UFV 6863 não apresentaram dissimilaridade, sendo a distância genética entre elas igual a 0%, mostrando ser idênticas, quando se utilizaram os marcadores estudados neste trabalho; o mesmo ocorreu com as progênes UFV 5475 e UFV 5479. Entre os descendentes da UFV 1430 (F4), a progêne UFV 6861 exclui-se do grupo a partir de próximo de 35% da distância máxima. As progênes UFV 5451 e UFV 5450 descendentes da UFV 3878 (F5) foram agrupadas a partir de próximo de 35% da distância máxima.



**Figura 2** - Agrupamento de 25 progênies de Catimor e de Catuaí Vermelho pelo método hierárquico do vizinho mais próximo, com base em marcadores RAPD e de acordo com a dissimilaridade do complemento aritmético do Índice de Jaccard.

Observa-se na Figura 3 (indicado pela seta) que o “primer” OPQ-12 apresentou uma banda polimórfica para as progênies UFV 6903, UFV 6870, UFV 6867, UFV 6866, UFV 6854, UFV 6863, UFV 6861 e UFV 6831, todas descendentes da UFV 1340 (F4); como se pode observar no agrupamento pelo método de Tocher, estas progênies foram incluídas em um único grupo.





**Figura 3** - Análise eletroforética dos produtos de amplificação com o “primer” OPQ-12, mostrando as canaletas correspondentes a: (1) UFV 5530, (2) UFV 5527, (3) UFV 5525, (4) UFV 5512, (5) UFV 5510, (6) UFV 5451, (7) UFV 5450, (8) UFV 5492, (9) UFV 5464, (10) UFV 5475, (11) UFV 5478, (12) UFV 5479, (13) UFV 5480, (14) UFV 5550, (15) UFV 4221, (16) UFV 6903, (17) UFV 6870, (18) UFV 6867, (19) UFV 6866, (20) UFV 6854, (21) UFV 6863, (22) UFV 6861, (23) UFV 6831, (24) Catuaí Vermelho e (M) marcador de peso molecular.

## CONCLUSÕES

- Utilizando-se marcadores moleculares, foram obtidos agrupamentos mais coerentes com a genealogia do que quando se utilizaram marcadores morfológicos, mesmo quando estes apresentaram herdabilidade superior a 80%.
- Notou-se a importância da utilização de marcadores moleculares associados a marcadores morfológicos na caracterização de linhagens de café (*C. arabica* L.), visto que, quando não se pode utilizar caracteres como a cor do broto ou cor de fruto, os agrupamentos não ficaram muito coerentes com a genealogia.
- O “primer” OPQ-12 mostrou-se muito eficiente na distinção das progênes descendentes da progênie UFV 1340 (F4).
- Com os marcadores moleculares utilizados neste trabalho não foi possível a separação de progênes irmãs, mas apenas de grupos de progênes irmãs, dada a grande proximidade genética entre elas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Aplicativo Computacional em Genética e Estatística**. UFV, 1997, Viçosa-MG, Brasil.

- CRUZ, C.D.; REGGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 390p.
- DIAS, L.A.S. **Análises Multidimensionais**. In.: Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Ed. Acelino Couto Alfenas. Viçosa: UFV, 1998. pp. 405-437.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA -CENARGEN, 1998. pp. 37-51, 121-145.
- BUSTAMANTE, P.J.W.; POLANCO, L.D. **Caracterización molecular de genótipos de café**. Anais do III SIBAC, 1999 Londrina, Brasil. pp. 181-183.
- SEVERINO, L.S. **Caracterização de progênies de Catimor e avaliação de descritores em *Coffea arabica* L.** Dissertação de Mestrado, 2000. UFV, Viçosa, Brasil. pp. 69.
- TEIXEIRA, T.A.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A.A.; SAKIYAMA, C.C.H. **Caracterização de acessos de *Coffea* por marcadores RAPD**. Anais do III SIBAC, 1999 Londrina, Brasil. pp. 177-180.