

## IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CAFEIEIRO DE IMPORTÂNCIA COMERCIAL PELA TÉCNICA PCR-RAPD<sup>1</sup>

NUNES, L.M.<sup>2</sup>; MOLINARI, H.B.<sup>3</sup>; VIEIRA, L.G.E.<sup>4</sup> E CROCHEMORE, M.L.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Apoio financeiro: Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café; <sup>2</sup> Estudante de Pós-Graduação – Genética e Melhoramento - Centro Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina – UEL; <sup>3</sup> Estudante de Graduação - Centro Ciências Agrárias - Universidade Estadual de Londrina – UEL; <sup>4</sup> Pesquisador - Dr - Área de Genética e Melhoramento Vegetal – IAPAR; <sup>5</sup> Pesquisadora - Dra - Área de Propagação Vegetal – IAPAR.

**RESUMO:** Classicamente, a identificação de cultivares do cafeeiro utiliza descritores morfológicos da semente e da planta em crescimento. A utilização de marcadores moleculares, além de permitir uma identificação genética precisa, possibilita a caracterização dos genótipos com menor custo de mão-de-obra e de tempo, pois a descrição é realizada com pequenas quantidades de DNA genômico, extraído em qualquer etapa de crescimento da planta. Este estudo tratou da identificação de genótipos de *Coffea arabica* de interesse comercial em diferentes regiões produtoras de café, utilizando-se marcadores do tipo PCR-RAPD. Foi realizado um “screening” com 140 *primers*, sendo selecionados 56. Dentre estes, até o momento, cinco deles apresentaram 23 bandas polimórficas com reprodutibilidade. Análise em Componentes Principais (ACP) e o cálculo de distâncias entre os genótipos mostraram certa divergência e indicaram um *background* genético de *Coffea canephora* em vários genótipos analisados. Os resultados até agora obtidos não mostram polimorfismo suficiente para a caracterização entre variedades dentro da espécie *Coffea arabica*.

**Palavras-chave:** *Coffea*, identificação de cultivares, marcador molecular, PCR-RAPD.

## IDENTIFICATION OF COFFEE GENOTYPES OF COMERCIAL IMPORTANCE USING PCR-RAPD MARKERS

**ABSTRACT:** Traditionally, the identification of coffee cultivars uses morphological descriptors of seeds and growing plants. Besides the precise genetic identification, molecular markers allow the characterization of genotypes with low costs and in a short time once the description is carried out based on small quantities of genomic DNA which can be extracted in any stage of plant development. The objective of this work was the identification of *Coffea arabica* genotypes which are commercially important in different coffee growing regions by using PCR-RAPD markers. One hundred and forty

primers were screened for polymorphisms and fifty six were selected. Among them, five primers showed 23 distinctive and reproducible polymorphic bands. Principal component analysis and the calculated Euclidean distances among genotypes showed some degree of divergence and indicated a genetic background of *Coffea canephora* in several genotypes analyzed. However the results obtained by using PCR-RAPD did not produce enough polymorphism to characterize the varieties of *C. arabica* used in this study.

**Key words:** Coffea, cultivar identification, molecular marker, PCR-RAPD.

## INTRODUÇÃO

A atividade sementeira tem basicamente, entre outras, uma função multiplicadora, controladora e fiscalizadora da manutenção da qualidade genética dos materiais produzidos pelo melhorista. Dentre as ações inerentes ao setor, o controle da identidade genética do cultivar é fundamental e abrange tanto o controle da identidade do cultivar nas multiplicações iniciais como a manutenção dessa identidade genética (pureza) nas diferentes etapas das multiplicações posteriores.

Os cultivares têm que ser distintos uns dos outros (D) e devem mostrar homogeneidade (H) e estabilidade (E) nas características usadas para distingui-los. Até o momento, o DHE envolve a comparação das novas e das variedades existentes apenas pela observação de caracteres fenotípicos. Se as ações para o controle de identidade genética no campo não tiverem sido eficientes, sendo as características morfológicas das sementes dos cultivares muito semelhantes, certamente misturas varietais não serão percebidas no controle laboratorial. De fato, no laboratório, a pureza física do lote de sementes é facilmente observada pelo analista, mas sempre surge a dúvida quanto à pureza genética quando dois ou mais cultivares apresentam características morfológicas idênticas ou muito próximas, tornando praticamente impossível a identificação.

Há necessidade, portanto, de se recorrer a outras técnicas mais precisas, que possam detectar diferenças genéticas entre os cultivares, quando a morfologia e o comportamento agrônômico mostram apenas similaridades ou, ao contrário, similaridade genética quando os cultivares mostrarem apenas diferenças fenotípicas.

Marcadores moleculares como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990) têm sido amplamente utilizados no estudo do polimorfismo do genoma de várias espécies vegetais (Caetano-Anollés et al., 1991; Thormann & Osborn, 1992), auxiliando o

melhorista na seleção de progenitores no estabelecimento de programas de melhoramento. Em cafeeiro, alguns marcadores RAPD mostraram-se bastante polimórficos (Lashermes et al., 1993, 1996, Orozco-Castillo et al., 1994), permitindo a caracterização da variabilidade entre espécies e dentro de espécies.

A utilização desses descritores, neutros em relação ao ambiente, precisos sob o ponto de vista genético e rápidos de serem manipulados, reduz o tempo e o trabalho de avaliação na caracterização e identificação, eliminando qualquer possível subjetividade, comum na avaliação clássica. O *genetic fingerprint* passa a ser uma ferramenta fundamental para todas as espécies/cultivares com interesse comercial.

Em *C. arabica*, a uniformidade genética das populações é mais acentuada devido à autogamia predominante, existindo porém taxa de fecundação cruzada da ordem de 10% (Carvalho et al., 1991). A variação que pode ser encontrada em muitas cultivares está geralmente mais associada ao resultado de uma mutação espontânea de determinados genes maiores do que a uma heterozigose residual (Carvalho, 1988). Embora uma pequena base genética tenha sido observada em variedades comerciais cultivadas, uma grande diversidade é encontrada dentro das coleções de germoplasma de *C. arabica* (Lashermes et al., 1996).

Este trabalho teve por objetivo identificar e distinguir linhagens e cultivares de *C. arabica* de interesse comercial, permitindo a caracterização genética ("fingerprints") desses materiais, visando proteção (propriedade intelectual).

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Material Vegetal

Até o presente foram avaliados 23 cultivares, sendo um cultivar de *C. canephora* e 22 cultivares e/ou linhagens comerciais integrantes da coleção de *C. arabica* do IAPAR e alguns provenientes do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Quadro 1). Plântulas dos genótipos de número 1 a 12 foram cultivadas em casa de vegetação, e os materiais de número 13 a 25 já estavam disponíveis no campo.

**Quadro 1** - Genótipos utilizados, com respectivos códigos e cruzamentos

CÓDIGOS	GENÓTIPOS	ORIGEM
7	Apoatã	<i>C.canephora</i>
25	Obatã	<i>C. canephora</i> x <i>C. arabica</i>
3	Icatu precoce – IAC 3282	<i>C. canephora</i> x <i>C. arabica</i> + retrocruzamento c/ <i>C. arabica</i>
22	IPR 106 – Icatu	Icatu (IAPAR 93166)
15	IPR 102 – IAPAR 77055	Catuaí x Icatu
23	IPR 103 – IAPAR 77054	Catuaí x Icatu

1	Catuai Amarelo IAC H2077-2-5-86	Caturra Amarelo x Mundo Novo
5	Catuai Amarelo IAC H2077-2-5-39	Caturra Amarelo x Mundo Novo
2	Catuai Vermelho IAC H2077-2-5-81	Caturra Amarelo x Mundo Novo
6	Catuai Vermelho IAC H2077-2-5-99	Caturra Amarelo x Mundo Novo
19	IPR 100	Catuai x Sh <sub>2</sub> Sh <sub>3</sub>
20	IPR 101	Catuai x Sh <sub>2</sub> Sh <sub>3</sub>
21	IPR 105	Catuai x [H7314 – 4 (Sh <sub>2</sub> Sh <sub>3</sub> )]
9	IAC Mundo Novo 388-17-1	Sumatra x Bourbon Vermelho
12	IAC Mundo Novo 388-6	Sumatra x Bourbon Vermelho
17	IPR 107	IAPAR 59 x Mundo Novo IAC 376-4
18	IPR 108	IAPAR 59 x (Catuai x Icatu)
8	IAPAR 59	Sarchimor
10	IPR 97 - IAPAR 75163-21	Sarchimor
14	IPR 98 - IAPAR 75163-21-10	Sarchimor
13	IPR 104 - IAPAR 75163-12-20	Sarchimor
4/16	IPR 99 - H 77028	Sarchimor
11/24	Tupi	Sarchimor

## 2. Extração e quantificação de DNA

A metodologia de extração utilizada baseou-se naquela descrita por Paillard et al. (1996) com modificações. Folhas jovens de 10 plantas de cada genótipo foram coletadas e o DNA foi extraído a partir de 2 g de tecido macerado em nitrogênio líquido, ao qual foram adicionados 20 ml de tampão de extração [100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 1M NaCl, CTAB 2%; metabissulfito de sódio (5 g/l); sarcosil 5% (w/v)]. Incubou-se a 65°C por 15 minutos. Foram adicionados 20 ml de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A precipitação foi feita pela adição de 1 ml de acetato de potássio 3 M e 0,6 V de isopropanol gelado. Foi feito um tratamento com 3 ml de TE + RNase (10 µg/ml) por 30 min e acrescentaram-se 3 ml de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi ressuspendido em 0,2 a 0,5 ml de TE e estocado a – 20°C. O DNA foi quantificado por fluorimetria (DyNa Quant 200 fluorimeter Hoefer).

## 3. Amplificação por PCR-RAPD

O protocolo de amplificação utilizado baseou-se no descrito por Williams et al. (1990). As reações foram preparadas em microtubos de 0,6 ml, em um volume total de 25 µl contendo 25 ng de DNA genômico, 2,5 mM tampão 10X [200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl], 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 mM dNTP, 5 picomoles de oligonucleotídeo iniciador (“primer”- Operon Technology), 1 U de *Taq* polimerase e água ultrapura para completar o volume. As amplificações foram realizadas em um termociclador (MJ Research, Inc.), utilizando o programa de temperaturas descrito por Lashermes et al. (1996): 1 ciclo de 4 min a 94 °C seguido de 43 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 37 °C e 2 min a 72 °C, com extensão final de 6 min a 72 °C.

#### 4. Análise por eletroforese dos fragmentos amplificados e visualização

As amplificações foram analisadas em eletroforese a 60 V (5V/cm) em gel de agarose (1,5%) na presença do marcador de peso molecular 1 Kb Plus.

O gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/ml, visualizado e fotografado pelo sistema KODAK EDAS 120 (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

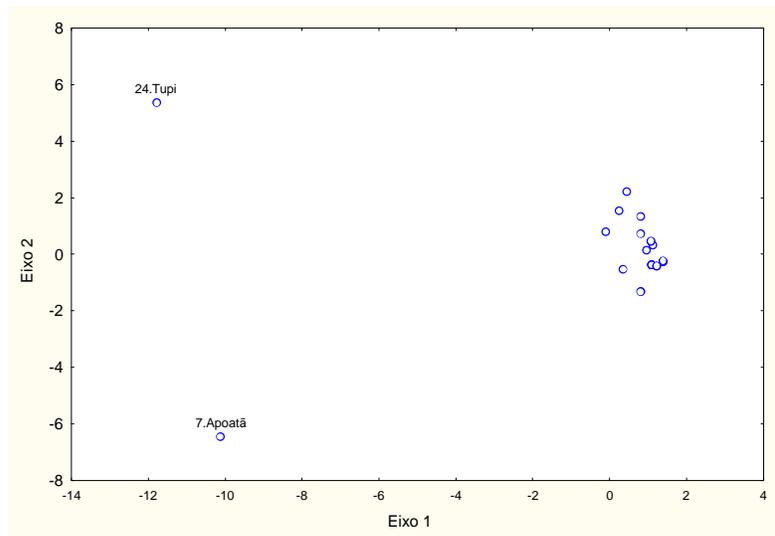
De cinco *primers* avaliados, obtiveram-se 23 bandas polimórficas. Uma matriz foi construída de acordo com a presença e ausência dessas bandas. Para isso, convencionou-se transformar os dados em nota 1 para ausência e 2 para presença da banda. A partir de uma matriz de correlação entre os genótipos calculou-se uma Análise em Componentes Principais (ACP). A divergência entre os genótipos foi avaliada pela Distância Euclidiana, aplicando-se o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average), resultando em um dendrograma.

Os dois primeiros componentes da ACP representaram 48,1e 15,6%, respectivamente, do total da variação. O componente 1 foi positivamente correlacionado para os *primers*/bandas: A1/3000pb, G12/1000pb, G11/700pb, G11/1750, X09/650pb, X09/850pb, X09/1200pb, X09/1500pb, X09/1800pb, B18/1300pb e B18/1500pb, e o componente 2 apenas foi correlacionado positivamente para a banda A1/830pb. A distribuição dos genótipos nos dois componentes (Figura 1) separou nitidamente Tupi de Apoatã e estes dos demais genótipos que praticamente foram indiferenciados. As bandas A1/3000pb e G12/1000pb estão ausentes em Tupi e presentes em Apoatã. As bandas G11/700pb, G11/1750pb, X09/650pb, X09/850pb, X09/1200pb, X09/1500pb, X09/1800pb, B18/1300pb e B18/1500pb estão ausentes em Tupi e em Apoatã, porém encontram-se presentes nos demais genótipos, o que os classifica em um grupo não diferenciado, como pode ser observado na origem dos dois componentes. Com relação ao segundo componente, apenas a banda A1/830pb apresentou-se ausente em Apoatã.

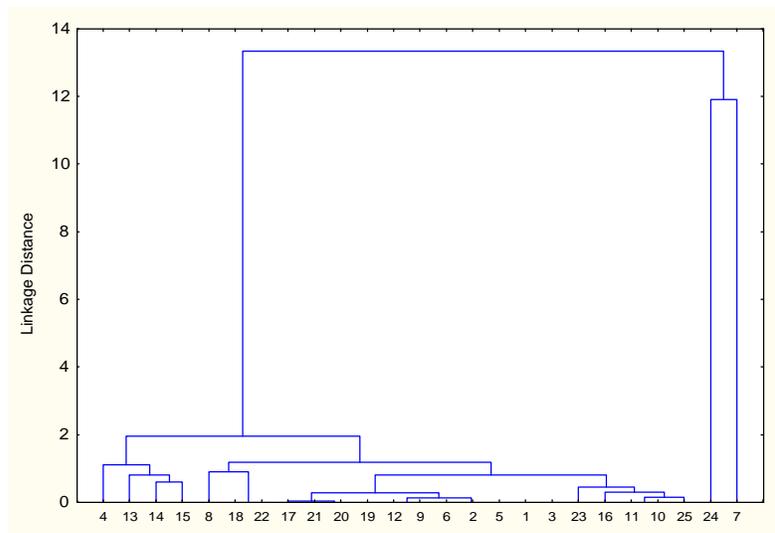
No dendrograma obtido (Figura 2), observa-se que os genótipos Tupi e Apoatã apresentaram-se distantes entre si, bem como dos demais genótipos. A participação de apenas uma variável (banda) no segundo componente da ACP dificulta qualquer inferência sobre as relações entre os demais genótipos. Observa-se, no entanto, elevada divergência entre os dois representantes do genótipo Tupi (11 e 24), bem como do genótipo IPR99-H77028.(4 e 16), ambos Sarchimor. Nos dois casos, um dos representantes era proveniente de folhas coletadas no campo e outro de folhas oriundas de plântulas propagadas por semente, o que poderia explicar a distância observada entre eles.

Pode-se observar, no entanto, que os genótipos com introgressão de *C. canephora* em seu *background* apresentam-se mais próximos do genótipo Apoatã, único representante da espécie *C. canephora* neste trabalho.

Ainda que nem todos os *primers* pré-selecionados neste estudo tenham sido avaliados para evidenciar e caracterizar os genótipos, os resultados até agora obtidos corroboram o de alguns autores, que não encontraram polimorfismo suficiente para a caracterização entre variedades dentro da espécie *C. arabica* utilizando a técnica RAPD.



**Figura 1** - Distribuição dos genótipos nos eixos da ACP.



**Figura 2** - Dendrograma dos genótipos de *Coffea* sp.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até agora não nos permite assegurar que ocorra uma perfeita caracterização das variedades em estudo, indicando a necessidade de incrementar o número de *primers* na busca de um maior polimorfismo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis. **Plant. Mol. Biol. Rep.**, 9: 294-307.
- CARVALHO, A. (1988). Principles and practices of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: R.J. Clarke & R. Macrae (Eds). Coffee vol 4: Agronomy. **Elsevier Applied Science**, London, p.129-165.
- CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO FILHO, O.; LIMA, M.M. A . (1991). Aspectos genéticos do cafeeiro. **Rev. Brasil. Genet.**, 14 (1): 135-183.
- LASHERMES, P.; CROS, J.; MARMEY, P.; CHARRIER, A. (1993). Use of random amplified DNA markers analyze genetic variability and relationships of *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 40: 91-99.
- LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; CHARRIER, A. (1996). Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, 87: 59-64
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; POWELL, W. (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, 87: 934-940.
- PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PETIARD, V. (1996). Construction of a molecular linkage map in coffee. **Theor. Appl. Genet.**, 93: 41-47.
- THORMANN , C.E.; OSBORN, T.C. (1992). Use of RAPD and RFLP markers for germoplasm evaluation. In: **Applications of RAPD Technology to plant breeding**. Joint Plant Breeding Symposia Series, Minnesota, USA, p. 9- 11.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, 18: 7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELICK, A. R. LIVAK, K.J., RAFALSKI, J. A., TINGEY S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, 18: 6531-6535.