

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE CAFEIROS DO BANCO DE GERMOPLASMA DA UFV/EPAMIG UTILIZANDO MARCADORES RAPD

Samuel Mazzinghy ALVARENGA¹, Eveline Teixeira CAIXETA^{2,4}, Antônio Carlos Baião de OLIVEIRA³, Raphael José Nascif RUFINO⁴, Giovani Greigh de BRITO⁴, Antônio Alvez Pereira⁵, Laércio ZAMBOLIM⁶ e Ney Sussumu SAKIYAMA^{4,7}

¹ Universidade Federal de Viçosa (UFV)/BIOAGRO, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, 36 571-000, Viçosa – MG. E-mail: samalvarenga@yahoo.com.br; ²Embrapa Café; ³Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café 'Alcides Carvalho', IAC; ⁴UFV/BIOAGRO; ⁵EPAMIG/CTZM; ⁶UFV/Departamento de Fitopatologia; ⁷UFV/Departamento de Fitotecnia

Resumo:

O conhecimento da diversidade genética do germoplasma utilizado em programas de melhoramento genético é importante para o planejamento de estratégias de trabalho. Técnicas de marcadores moleculares fornecem informações sobre distâncias genéticas entre acessos de Bancos de Germoplasma. Dessa forma, no presente trabalho, 92 acessos do Banco de Germoplasma da UFV/EPAMIG foram submetidos a uma análise de diversidade genética, utilizando-se 20 *primers* RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). As amplificações deram origem a um total de 42 bandas polimórficas. As distâncias genéticas entre os genótipos, baseadas no complemento de Jaccard, variaram de zero a 100%. No dendrograma obtido observou-se a formação de cinco grupos diferentes ao nível de 50% de distância genética, sendo um grupo formado pelos genótipos descendentes de Híbridos de Timor, outro com o genótipo Piatã, um terceiro grupo com o indivíduo da espécie *C. racemosa*, outro com o acesso Catindu e o último grupo com os demais genótipos.

Palavras-chave: diversidade genética, marcadores RAPD, café, *Coffea*.

ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY AMONG COFFEE TREES FROM THE UFV/EPAMIG GERMPLASM BANK USING RAPD MARKERS

ABSTRACT

The knowledge of the genetic diversity of germplasm used in breeding programs is important for planning work strategies. Molecular markers techniques provide information about genetic distances among germplasm accessions. Thereby, in the present work, 92 accessions from the UFV/EPAMIG Germplasm Collection were submitted to a genetic diversity analysis using 20 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) primers. The amplifications of these primers originated 42 polymorphic bands. The genetic distances among the genotypes, based on the Jaccard complement, ranged from zero to 100%. It was noticed, in the dendrogram, five different groups. One group was formed by the Híbrido de Timor descendants, other by the Piatã genotype, a third group by an individual from the specie *Coffea racemosa*, another by the accession Catindu and the last one by the remaining genotypes.

Key words: genetic diversity, RAPD markers, coffee, *Coffea*.

INTRODUÇÃO

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas de exportação. O Brasil e a Colômbia, juntos, representam cerca de 42% da produção mundial (Milhomem *et al.*, 2000). O gênero *Coffea* possui mais de 80 espécies conhecidas, mas apenas duas têm importância comercial. *Coffea arabica* L., conhecido como café arábica, é responsável por aproximadamente 70% da produção global e produz um café de qualidade superior, mas sua produção é frequentemente afetada por doenças e pragas. *Coffea canephora* Pierre *et* Froenher, chamado de café robusta, contribui com os restantes 30% da produção global e é mais tolerante a algumas doenças e pragas, mas a qualidade do seu produto é inferior. Devido a importância da cultura do café, diferentes programas de melhoramento genético estão sendo realizados no Brasil e já resultaram na obtenção de cultivares com potencial produtivo 300% superior ao das cultivares tradicionais (Medina-Filho *et al.*, 1984). O conhecimento da diversidade genética do germoplasma utilizado nos programas de melhoramento é importante para o planejamento de estratégias de trabalho. A disponibilidade de informações geradas a partir de atividades que estabelecem as diferenças ou semelhanças entre os acessos do germoplasma é condição essencial para a sua seleção e utilização. Técnicas de marcadores moleculares são ferramentas valiosas para melhorar a eficiência da avaliação da diversidade genética de Bancos de Germoplasma. Um dos marcadores utilizados na determinação de similaridades genéticas é o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). A tecnologia de marcadores RAPD envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando *primers* de seqüências arbitrárias. Esses marcadores requerem uma quantidade

mínima de DNA necessária para análise genotípica de um indivíduo; não requerem o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o genoma da planta; oferecem a possibilidade de amostrar regiões de DNA repetitivo, pois os *primers* utilizados são de natureza arbitrária; e possibilitam a automatização do processo de aquisição de dados, uma vez que o polimorfismo desses marcadores e a sistemática dos ambientes computacionais são de natureza binária (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético: na tabela 1, encontram-se listados os 92 genótipos do Banco de Germoplasma, que foram avaliados quanto à diversidade genética com base em marcadores RAPD. Uma planta de cada acesso foi utilizada no presente trabalho.

Tabela 1 – Acessos de *Coffea* do Banco de Germoplasma da UFV/EPAMIG utilizados para avaliação de distâncias genéticas com marcadores RAPD.

<i>Acesso</i>	<i>Descrição</i>	<i>Acesso</i>	<i>Descrição</i>
UFV 183-05	Piatã	UFV 384-49	Catimor
UFV 302-11	DK 1/6	UFV 385-18	Catimor
UFV 302-45	DK 1/6	UFV 386-80	Catimor
UFV 304-38	S12 - KAFFA	UFV 387-44	Catimor
UFV 307-03	Caturra Vermelho x K423	UFV 388-02	Catimor
UFV 307-32	Caturra Vermelho x K424	UFV 388-03	Catimor
UFV 308-34	Caturra Vermelho x KP 423	UFV 389-31	Catimor
UFV 309-03	Caturra Vermelho x DK 1/6	UFV 390-52	Catimor
UFV 310-53	Catuai Amarelo x H 276/2	UFV 392-72	Catimor
UFV 311-48	Caturra Amarelo x S333	UFV 393-40	Catimor
UFV 312-96	Caturra Vermelho x S795	UFV 395-141	Catimor
UFV 313-107	Caturra Vermelho x S795	UFV 396-01	Catimor
UFV 314-32	Catindu	UFV 396-76	Catimor
UFV 316-15	Caturra Vermelho x H 239/11	UFV 397-25	Dilla & Alghe x B.A. 16
UFV 317-22	Caturra Vermelho x H 275/7	UFV 399-33	B.E.5 Wush Wush x S288/23
UFV 318-47	Caturra Vermelho x S12 - KAFFA	UFV 399-45	B.E.5 Wush Wush x S288/23
UFV 319-60	Catuai Vermelho x H 288/14	UFV 400-47	Dilla & Alghe x Híbrido de Timor
UFV 321-37	H 310/1 x Mundo Novo	UFV 402-24	S333 x S12 – KAFFA
UFV 322-77	H 288/13 x Catuai Vermelho	UFV 402-87	S333 x S12 – KAFFA
UFV 323-31	Mundo Novo x H288/14	UFV 403-26	97/4 N197 x Híbrido de Timor
UFV 324-74	K7 x Dilla & Alghe	UFV 403-42	97/4 N197 x Híbrido de Timor
UFV 326-20	Caturra Amarelo x HW 4/6	UFV 406-01	B.E.5 - Wush Wush
UFV 328-60	Geisha x S288/23	UFV 409-18	Mundo Novo x S795
UFV 329-08	Dilla & Alghe x S333	UFV 411-23	H66 x S12 - KAFFA
UFV 332-10	Catuai Amarelo x H 65/7	UFV 412-12	K7 x S12 – KAFFA
UFV 333-09	H 26/1-7 x Caturra Amarelo	UFV 413-52	KP423 x S12 - KAFFA
UFV 335-02	Mundo Novo x S795	UFV 414-19	Catimor
UFV 335-05	Mundo Novo x S795	UFV 416-30	Catimor
UFV 339-10	Caturra Amarelo x H 79/1	UFV 417-97	Catimor
UFV 340-38	Dk 1/6 x S12 – KAFFA	UFV 418-24	Catimor
UFV 341-16	S353-4/5 x S4 – Agaro	UFV 419-36	Catimor
UFV 343-15	Catimor	UFV 452-37	K7 x Híbrido de Timor
UFV 345-03	Catimor	UFV 452-59	K7 x Híbrido de Timor
UFV 349-59	Sarchimor	UFV 453-10	EMOKA x Híbrido de Timor
UFV 350-98	Sarchimor	UFV 456-21	S4 – Agaro x Híbrido de Timor
UFV 351-08	Cachimor	UFV 457-53	F840 x Híbrido de Timor
UFV 355-16	10/1 x HW 26/9	UFV 478-14	B.E.5 - Wush Wush x Híbrido de Timor
UFV 356-03	10/1 x HW 26/9	UFV 480-06	S333 x Dilla & Alghe
UFV 357-14	Catuai Amarelo x HW 26/13	UFV 481-16	F840 x Híbrido de Timor
UFV 358-38	K7 x Híbrido de Timor	UFV 483-19	Bourbon x Dilla & Alghe
UFV 360-01	Bourbon 43-7 x R.P.13 x H 264/7	UFV 485-06	K7 x Dilla & Alghe
UFV 366-05	B.E.5 - Wush Wush x Híbrido de Timor	UFV 488-03	Catuai Vermelho x HW26/5
UFV 367-62	B.E.5 - Wush Wush x Híbrido de Timor	UFV 489-15	Catuai Amarelo x H 398/6
UFV 368-48	B.E.5 - Wush Wush x Híbrido de Timor	UFV 557-04	Racemosa
UFV 369-01	K7 x Híbrido de Timor	UFV 2144	Catuai
UFV 372-12	H66 x Híbrido de Timor	HW 262	Caturra Vermelho x Híbrido de Timor

Extração de DNA: o DNA foi extraído de folhas jovens, seguindo-se o protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado no laboratório BIOCAFÉ/BIOAGRO/UFV pela técnica *miniprep* de folhas de cafeeiros, com a adição de PVP (solúvel) no tampão de extração. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado a 4°C. Na época da amplificação, foi diluído em TE (Tris Hcl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) para uma concentração de 10 ng/μl.

Amplificação de DNA e Análise Eletroforética dos Produtos: o DNA extraído foi amplificado com 20 *primers* decâmeros de RAPD da *Operon Technologies*. As amplificações foram feitas em termociclador modelo Perkin-Elmer 9600, e cada reação foi composta pelo volume total de 25 μl, contendo os seguintes componentes: 25 ng de DNA genômico, uma unidade de AmpliTaq DNA polimerase, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 μM de *primer*, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl pH 8,3 e 2 mM de MgCl₂ e o volume final completado com água ultrapura. Para a amplificação, foi utilizado o seguinte programa: um ciclo de desnaturação (95°C por 1 minuto), 39 ciclos para amplificação (15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C, 60 segundos a 72°C) e, para finalizar, 7 minutos a 72°C. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,2%, corados com brometo de etídeo, visualizados em UV e fotodocumentados. RAPDs foram registrados como presença ou ausência de bandas. Somente foram consideradas as bandas polimórficas mais nítidas.

Análise dos Dados: A planilha de dados foi montada, atribuindo-se o valor 1 para presença e 0 para ausência de bandas. Estimativas de similaridades genéticas foram expressas como coeficientes de similaridades de Jaccard (Jaccard, 1901). O programa GENES (Cruz, 2004) foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas. O dendrograma, baseado na matriz de distâncias genéticas, foi obtido utilizando-se o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic average*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 20 *primers* utilizados nas amplificações deram origem a um total de 141 bandas, das quais 42 apresentaram polimorfismo (29,78%), média de 2,1 bandas polimórficas por *primer*. Dois *primers* não apresentaram polimorfismo. A figura 1 apresenta um exemplo de padrão eletroforético obtido com o *primer* OPAG – 08.

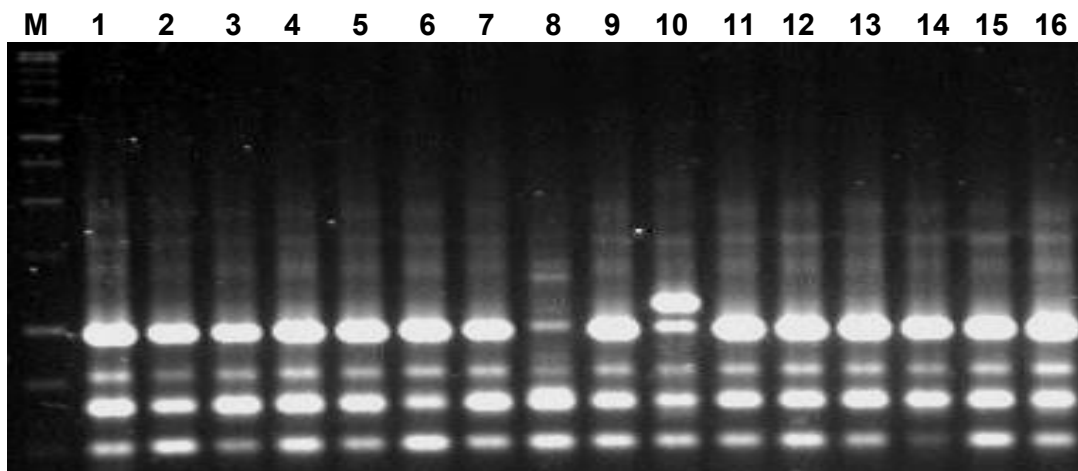


Figura 1 – Perfil eletroforético de 16 genótipos de café obtidos com o *primer* OPAG – 08. Da esquerda para a direita: M – Marcador de peso molecular 1Kb ladder. 1 – UFV 402-24 (S333 x S12 – KAFFA). 2 – UFV 307-32 (Catuaí Vermelho x K424). 3 – UFV 416-30 (Catimor). 4 – UFV 417-97 (Catimor). 5 – UFV 357-14 (Catimor). 6 – DK 1/6 302-11. 7 – UFV 402-87 (S333 x S12 – KAFFA). 8 – UFV 183-05 (Piatã). 9 – UFV 307-03 (Catuaí Vermelho x K423). 10 – UFV 557-04 (Racemosa). 11 – UFV 392-72 (Catimor). 12 – UFV 349-59 (Sarchimor). 13 – UFV 350-98 (Sarchimor). 14 – UFV 403-42 (S4-Agaro). 15 – UFV 2144 (Catuaí). 16 – UFV 400-47 (Dilla & Alghe x Híbrido de Timor).

Os 92 acessos foram reunidos, inicialmente, em dois grupos pelo método de Tocher. O acesso UFV 183-05 (Piatã) formou isoladamente o grupo I, enquanto que os 91 genótipos restantes foram classificados no grupo II. Um segundo agrupamento foi realizado dentro do grupo dois, gerando três subgrupos: o subgrupo I incluiu o acesso UFV 314-32 (Catindú); o subgrupo II, o acesso UFV 557-04 (*Coffea racemosa*); enquanto os 89 indivíduos restantes formaram o subgrupo III. Neste último subgrupo foi efetuado outro agrupamento, com o intuito de melhor discriminar os acessos nele contidos, obtendo-se 15 novos subgrupos. As distâncias genéticas obtidas para os 92 genótipos de cafeeiro analisados, baseadas nas 42 bandas polimórficas variaram de 0%, entre os genótipos UFV 321-37, UFV 324-74 e UFV 319-60; UFV 312-96 e UFV 480-06; UFV 332-10, HW 262 e UFV 402-87; UFV 326-20 e UFV 358-38; UFV 400-47, UFV 351-08 e UFV 357-14; UFV 2144 e

UFV 310-53; Ufv 483-19 e Ufv 322-77 e entre Ufv 409-18, Ufv 395-141 e Ufv 349-59, a 100%, entre os genótipos Ufv 557-04 e Ufv 321-37, Ufv 324-74 e Ufv 319-60. Um dendrograma, baseado na distância genética gerada pelo complemento aritmético do Índice de Jaccard, utilizando o método UPGMA, foi obtido para os 92 indivíduos estudados (Figura 2). Analisando-se o dendrograma, ao nível de 50% de distância genética, observou-se a formação de cinco grupos diferentes. O grupo A, constituído de 49 genótipos, ficou caracterizado pela presença de indivíduos descendentes de Híbridos de Timor. Os Híbridos de Timor são genótipos provenientes de cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora* e apresenta grande importância para o melhoramento do cafeeiro, por ser fonte de resistência a diferentes patógenos. Os genótipos do tipo Catimor (derivado do cruzamento entre ‘Caturra’ e Híbrido de Timor) constituíram 36% do grupo, que também é formado por indivíduos do tipo Sarchimor (derivado do cruzamento entre Villa Sarchi e Híbrido de Timor), Cachimor (derivado do cruzamento entre ‘Caturra Amarelo’ e Híbrido de Timor) e S4 – Agaro (seleção derivada do cruzamento entre H.129/1 - 97/4N.197 e Híbrido de Timor). O grupo B, formado por 41 acessos, ficou caracterizado pela presença de genótipos derivados de cruzamentos entre materiais genéticos de seleção, como Wush Wush, Dilla & Algehe, K7, DK, entre outros. O grupo C foi formado pelo genótipo Ufv 314-32 – Catindu. Este acesso é oriundo da Índia e é derivado do cruzamento entre ‘Caturra Vermelho’ e o material de seleção 1344/19 S.795. Em estudo realizado por Matiello (2001), o Catindu se sobressaiu nos ensaios de campo para porte baixo e se destacou no item produtividade, alcançando uma média anual, em cinco safras (1997-2001), de 29,2 sacas por hectare. O grupo D ficou constituído do genótipo *C. racemosa*. Esta espécie é nativa do Leste africano, Moçambique, e apresenta resistência a algumas pragas e doenças e outras características de interesse agrônomo. Eira (2003) demonstrou em seu trabalho que *C. racemosa* foi a espécie mais tolerante à desidratação, conseguindo também sobreviver ao método de conservação de Germoplasma pela técnica de criopreservação. O indivíduo Piatã se mostrou o mais divergente entre todos os genótipos avaliados, ficando isolado no grupo E. Este é um híbrido natural proveniente do cruzamento entre *C. arabica* e *C. dewevrei*.

CONCLUSÃO

Baseado na análise de 20 *primers* RAPD e na distância genética gerada pelo complemento aritmético do Índice de Jaccard, foi possível separar 92 acessos do Banco de Germoplasma da Ufv/EPAMIG em cinco grupos distintos. O critério adotado para o estabelecimento dos grupos foi fazer um corte no dendrograma ao nível de 50% de distância genética. O genótipo Piatã, o indivíduo da espécie *C. racemosa* e o acesso designado Catindu ficaram separados dos demais genótipos. Os acessos restantes foram divididos em dois grupos, um dos quais comportando os genótipos provenientes de cruzamentos envolvendo os Híbridos de Timor, e o outro grupo, os demais genótipos. O uso de outros tipos de marcadores moleculares poderá auxiliar na identificação de maior nível de polimorfismo entre os acessos, com o intuito de fornecer uma análise mais precisa sobre a diversidade genética desse Banco de Germoplasma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABRAL, T. A. T. Padrões moleculares, diversidade genética e mapa parcial de ligação do cafeeiro. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 112p., 2001.
- CRUZ, C. D. Programa Genes. Aplicativo computacional em genética e estatística. Universidade Federal de Viçosa, 2004. CD Rom.
- DOYLE, J. J., e DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p. 13-15, 1990.
- EIRA, M. T. S. Estudos biofísicos da tolerância à desidratação e baixa temperatura em sementes e embriões de *Coffea* spp. Universidade de Brasília, Brasília. 2003.
- FERNANDEZ, D. e LASHERMES, P. Molecular tools for improving coffee (*Coffea arabica* L.) resistance to parasites. *Molecular techniques in crop improvement*. S. Mohan Jain; D. S. Brar e B.S. Ahloowalia (eds), Kluwer Academic Publicado por Dordrecht, The Netherlands. P. 327-346, 2002.
- FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, pp. 220, 1998. (EMBRAPA-CENARGEN documento 20).
- FONTES, J. R. M. Heterose, capacidade combinatória e divergência genética estimada por análise de marcadores RAPD em cruzamentos entre cafeeiros Catuai (*Coffea arabica* L.) e híbrido de Timor. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 122p., 2001.
- MATIELLO, J. B. Híbridos f3, f4 e f5 e germoplasmas resistentes à ferrugem. *Site* na internet. O cafezal (2001) - www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp.
- MEDINA-FILHO, H.P., CARVALHO, A. e SONDAHL, M.R. Coffee breeding and related evolutionary aspects. JANICK, J. (ed.) *Plant breeding reviews*. AVI, v.2, p. 157-193, 1984.
- MILHOMEM, A. V.; TEIXEIRA, S. M. e MILHOMEM, S. V. Um modelo de oferta de café no Brasil. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (1.: 2000: Poços de Caldas, MG). Resumos expandidos. Brasília, D.F.: Embrapa Café; Belo Horizonte : Minasplan, 2v. (1490p.), p. 350-353, 2000.
- MORALES, E. V., MONTEIRO, J. S. e MENDES, R. A. Princípios de documentação para recursos genéticos vegetais. *Conservação de Germoplasma Vegetal*. Brasília: IIAC. P. 49-67, 1994.

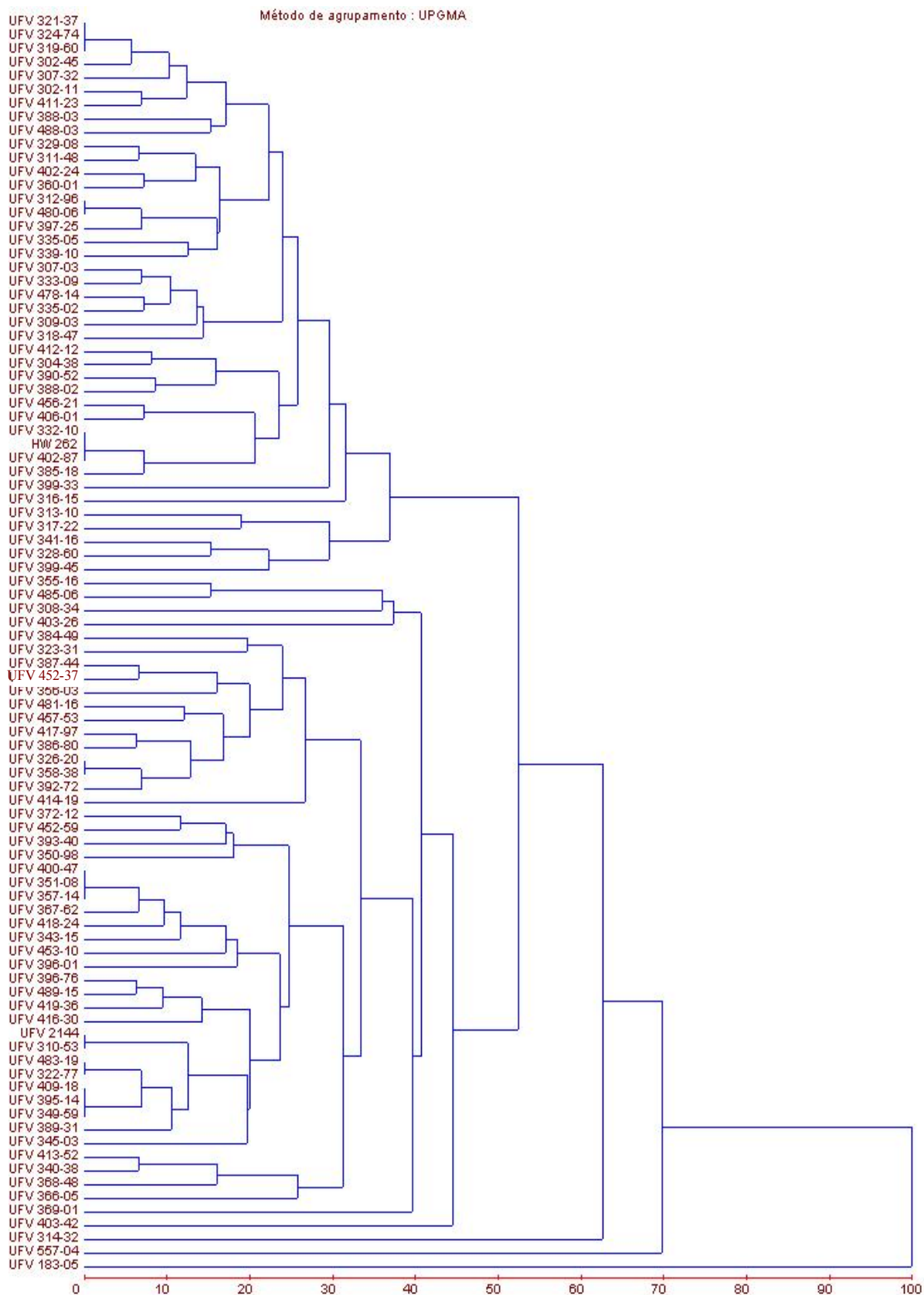


Figura 2 – Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas expressas pelo complemento do índice de Jaccard, estimadas entre 92 genótipos de cafeeiro e baseadas em 141 marcadores RAPD oriundos de 20 *primers*.