

## DIFERENCIAÇÃO ENTRE LINHAGENS DO CAFÉ CATIMOR DERIVADAS DO HÍBRIDO HW 26-5, COM BASE EM MARCADORES RAPD<sup>1</sup>

Luciano da Costa e Silva<sup>2</sup>  
Ney Sussumu Sakiyama<sup>2</sup>  
Laércio Zambolim<sup>2</sup>  
Antônio Alves Pereira<sup>3</sup>

### RESUMO

Em trabalho anterior sobre *Coffea arabica* L., 23 progênies de Catimor, gerações F<sub>6</sub> e F<sub>7</sub>, descendentes do híbrido CIFC HW 26-5, e uma linhagem de Catuaí Vermelho foram avaliadas com descritores morfológicos. Comparando-se com os dados de genealogia, os descritores morfológicos não foram eficientes para diferenciar as linhagens, exceto quando descritores de herdabilidade acima de 80% foram considerados. No presente trabalho, procurou-se distinguir as mesmas 23 progênies de Catimor em geração F<sub>6</sub> e F<sub>7</sub> empregando-se marcadores RAPD. As distâncias genéticas entre as progênies foram estimadas com base em 14 locos polimórficos. Dados de agrupamento com base em distâncias genéticas, obtidas a partir de marcadores RAPD, foram coerentes com os dados de genealogia destas progênies, mostrando que estes marcadores foram eficientes para diferenciar as descendências de Catimor derivadas do híbrido CIFC HW 26-5.

Palavras-chaves: *Coffea arabica*, diversidade genética, melhoramento do café.

---

<sup>1</sup>. Aceito para publicação em 05.08.2002.

<sup>2</sup>. UFV/BIOAGRO, 36571-000 Viçosa, MG.

<sup>3</sup>. EPAMIG/CTZM, 35571-000 Viçosa, MG.

## ABSTRACT

### RAPD BASED DIFFERENTIATION AMONG CATIMOR COFFEE LINES DERIVED FROM HYBRID HW 26-5.

In a previous report on *Coffea arabica* L., a Catuaí Vermelho line and 23 Catimor lines (generation F<sub>6</sub> and F<sub>7</sub>, derived from CIFC HW 26-5 hybrid) were evaluated by means of morphological descriptors. These were not efficient in grouping the lines according to their genealogic data, except when descriptors with high heritability (>80%) were considered. The same lines are now evaluated with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Genetic distances were estimated based on 14 polymorphic loci. Grouping analysis based on the genetic distances obtained with RAPD markers was in accordance with the genealogic data of these lines, showing that these markers were efficient in differentiating among descendants of Catimor lines derived from CIFC HW 26-5 hybrid.

Key words: *Coffea arabica*, genetic diversity, coffee breeding.

## INTRODUÇÃO

As características morfológicas têm sido normalmente utilizadas para a identificação dos cultivares de café. No entanto, estudos realizados até o momento demonstraram que a variabilidade genética destas características é pequena entre os cultivares (8).

Comparando a genealogia conhecida de um grupo de progênies de Catimor com os agrupamentos calculados com base em características morfológicas, Severino (10) verificou que resultados coerentes foram obtidos somente quando características de alta herdabilidade foram consideradas, e que a cor do broto, único descritor de herança mendeliana simples, teve grande influência neste agrupamento.

Padrões moleculares podem ser utilizados como descritores genéticos para fins de identificação de linhagens e variedades. As limitações dos marcadores morfológicos utilizados para descrever os cultivares podem ser diminuídas pela inclusão de marcadores de DNA, uma vez que estes apresentam herança mendeliana simples.

Marcadores RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) foram utilizados para diferenciar acessos do gênero *Coffea* (12) e introgressão interespecífica natural e artificial entre *C. canephora* e *C. arabica* (9).

Marcadores RAPD foram também utilizados para avaliar híbridos F<sub>1</sub> de café (*C. arabica*) e seus respectivos genitores, possibilitando a certificação da natureza híbrida dos materiais genéticos obtidos por cruzamentos artificiais (6).

A variabilidade genética entre 40 acessos de *Coffea arabica* foi avaliada utilizando-se marcadores RAPD associados a uma pré-digestão do DNA genômico com endonucleases de restrição. O agrupamento das variedades com base nestes marcadores moleculares foi consistente com as informações da genealogia e dados morfológicos descritos para este germoplasma (5).

A eficiência dos marcadores RAPD para avaliação de distâncias genéticas entre indivíduos ou grupos e a sua consistência com dados de genealogia têm sido constatadas em várias outras espécies, como ervilha (7), algodão (11) e soja (1).

Os objetivos do presente trabalho foram verificar a eficiência dos marcadores RAPD na avaliação da diversidade genética de um conjunto de progênies de Catimor derivado do híbrido CIFC HW 26-5 e comparar os dados de agrupamento destas linhagens (com base em distâncias genéticas obtidas com marcadores RAPD) com os dados de genealogia.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO/UFV), com amostras de folhas de café (*Coffea arabica* L.) coletadas em um experimento de campo localizado no Centro Experimental Elói Carlos Heringer, em Martins Soares, MG. O material genético utilizado neste trabalho foi composto de 23 progênies de Catimor do Programa de Melhoramento da UFV/EPAMIG e uma de Catuaí Vermelho (IAC 15). As 23 progênies de Catimor estudadas 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, todas derivadas do híbrido CIFC HW 26-5 (Figura 1).

Marcadores RAPD (14) foram obtidos seguindo-se as etapas de extração e purificação de DNA de folhas (13), amplificação de fragmentos de DNA por PCR (*polymerase chain reaction*), eletroforese e fotodocumentação. Amostras de DNA de cada progênie foram extraídas de folhas coletadas de 16 plantas. A amplificação de DNA foi realizada em volume de reação de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de DNA na concentração de 10 ng/ $\mu\text{L}$ , 12,25  $\mu\text{L}$  de água destilada deionizada e esterilizada, 2,5  $\mu\text{L}$  de KCl 500 mM, 2,5  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 100 mM, 2,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1,25  $\mu\text{L}$  de dNTPs 2 mM, 1,0  $\mu\text{L}$  de *primer* (Operon Technologies) 5  $\mu\text{M}$  e 1,0  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase 1 U/ $\mu\text{L}$ . A reação de amplificação foi feita em termociclador Perkin Elmer 9600, programado para realizar uma etapa de desnaturação a 95 °C por 1 min., 40 ciclos de amplificação dos fragmentos de DNA, sendo cada ciclo constituído de uma etapa de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, uma etapa de anelamento do *primer* ao DNA molde, a 35 °C por 30 segundos, e uma etapa de extensão a 72 °C por 1 min. Depois de 40 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72 °C por sete minutos. Nas amostras contendo DNA amplificado foram adicionados 8  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol 1,2X (azul de bromofenol 0,05% e sacarose em água a 8%) e em seguida fez-se a aplicação de 14  $\mu\text{L}$  desta solução em gel de agarose 1,4%, imerso em uma cuba de eletroforese contendo tampão TBE 0,5X (Tris-Borato 0,045 M e EDTA 0,001 M). Utilizaram-se 10  $\mu\text{L}$  de marcador de tamanho de fragmentos de DNA 1Kb Ladder Promega (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Em seguida, realizou-se a eletroforese a 80 volts, por quatro horas, e após, a coloração dos fragmentos amplificados com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), seguida de fotodocumentação sob luz ultravioleta.

A análise de agrupamento foi feita a partir de 14 bandas RAPD polimórficas, utilizando-se o método hierárquico do UPGMA e o método de otimização de Tocher (3), que se fundamentam na matriz de dissimilaridades genéticas gerada a partir do complemento aritmético do Índice de Jaccard (4). Todas as análises genético-estatísticas foram processadas no Programa Genes (2).

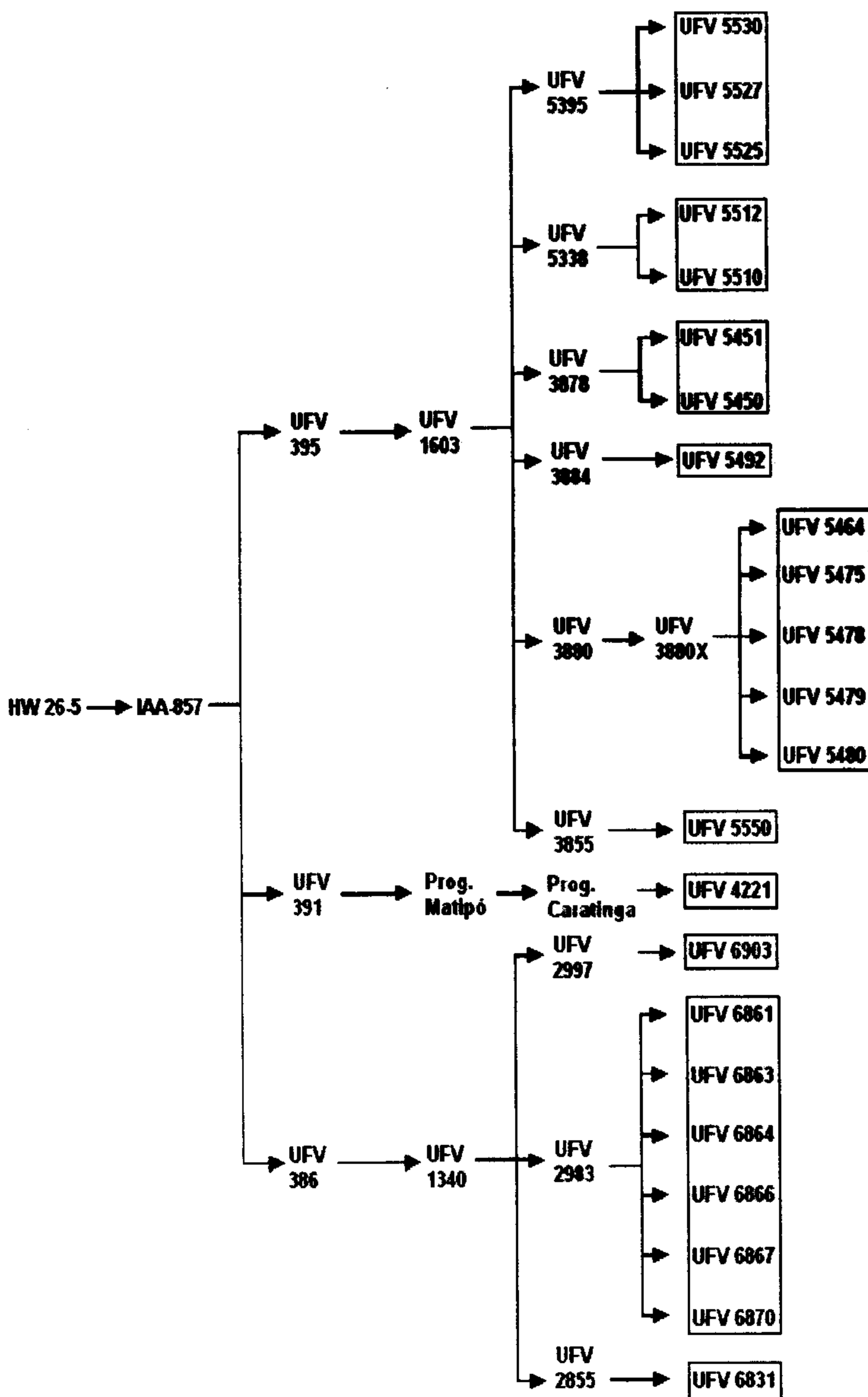


FIGURA 1 – Árvore genealógica da descendência de Catimor CIFC HW 26-5, destacando-se os grupos de progênies-irmãs (Fonte: 10).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 80 *primers* testados, somente 11 evidenciaram polimorfismo, devido ao grande parentesco entre as progênies. Quatorze bandas polimórficas foram obtidas; os *primers* OPH-19, OPJ-19, OPQ-12, OPA-8, OPX-10, OPY-16, OPY-18 e OPG-05 produziram uma banda polimórfica cada um e OPI-07, OPP-6 e OPX-16, duas.

Pelo método de agrupamento de Tocher (Quadro 1), foram formados cinco grupos com as progênies estudadas, sendo o Grupo 1 formado por todas as progênies descendentes de UFV 1603 (F<sub>4</sub>), exceto a UFV 5530, que foi agrupada separadamente formando o Grupo 4, e também a UFV 5492, agrupada com o Catuaí, formando o Grupo 3. O Grupo 2 foi formado por todas as progênies descendentes de UFV 1340 (F<sub>4</sub>), sendo coerente com a genealogia; o mesmo resultado no Grupo 2 foi obtido por Severino (10) quando utilizou, na análise de agrupamento pelo método de Tocher, caracteres morfológicos com herdabilidade superior a 80%. O Grupo 5 foi formado apenas pela progênie UFV 4221, única descendente da progênie Matipó (F<sub>4</sub>), descendente da progênie UFV 391 (F<sub>3</sub>), mostrando coerência com a genealogia.

| QUADRO 1 - Agrupamento de 23 progênies de Catimor e uma 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   | Progênies   | Descendência  |
| 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. | UFV 1603 (F <sub>4</sub> )                              |
| 2  | UFV 6867; UFV 6863; UFV 6870; UFV 6864; UFV 6866; UFV 6831; UFV 6903; UFV 6861.   | UFV 1340 (F <sub>4</sub> )                              |
| 3  | UFV 5492; Catuaí.   | UFV 1603 (F <sub>4</sub> ), exceto a linhagem de Catuaí |
| 4  | UFV 5530  | UFV 1603 (F <sub>4</sub> )                              |
| 5  | UFV 4221  | Único descendente da prog. Matipó (F <sub>4</sub> )     |

No dendrograma (Figura 2), observa-se que a 65% da distância máxima formam-se quatro grupos, o primeiro pelas progênies UFV 5530, UFV 5492 e Catuaí, sendo a UFV 5530 mais dissimilar do que a UFV 5492 em relação ao Catuaí, como obtido no agrupamento pelo método de Tocher. O segundo grupo é formado por todas as progênies descendentes de UFV 1603 (F<sub>4</sub>), exceto UFV 5530 e UFV 5492. O terceiro grupo é formado pela progênie UFV 4221, única descendente da progênie Matipó

(F<sub>4</sub>). O quarto grupo é formado pelas progênies UFV 6867, UFV 6863, UFV 6870, UFV 6864, UFV 6866, UFV 6831, UFV 6903 e UFV 6861, todas descendentes, em geração F<sub>6</sub>, da UFV 1340 (F<sub>4</sub>).

Na maioria dos casos, não foi possível a separação de progênies-irmãs, mas apenas de grupos de progênies-irmãs, dada a grande proximidade genética entre elas. O marcador obtido com o *primer* OPQ-12 possibilitou a distinção das progênies descendentes de UFV 1340 (F<sub>4</sub>).

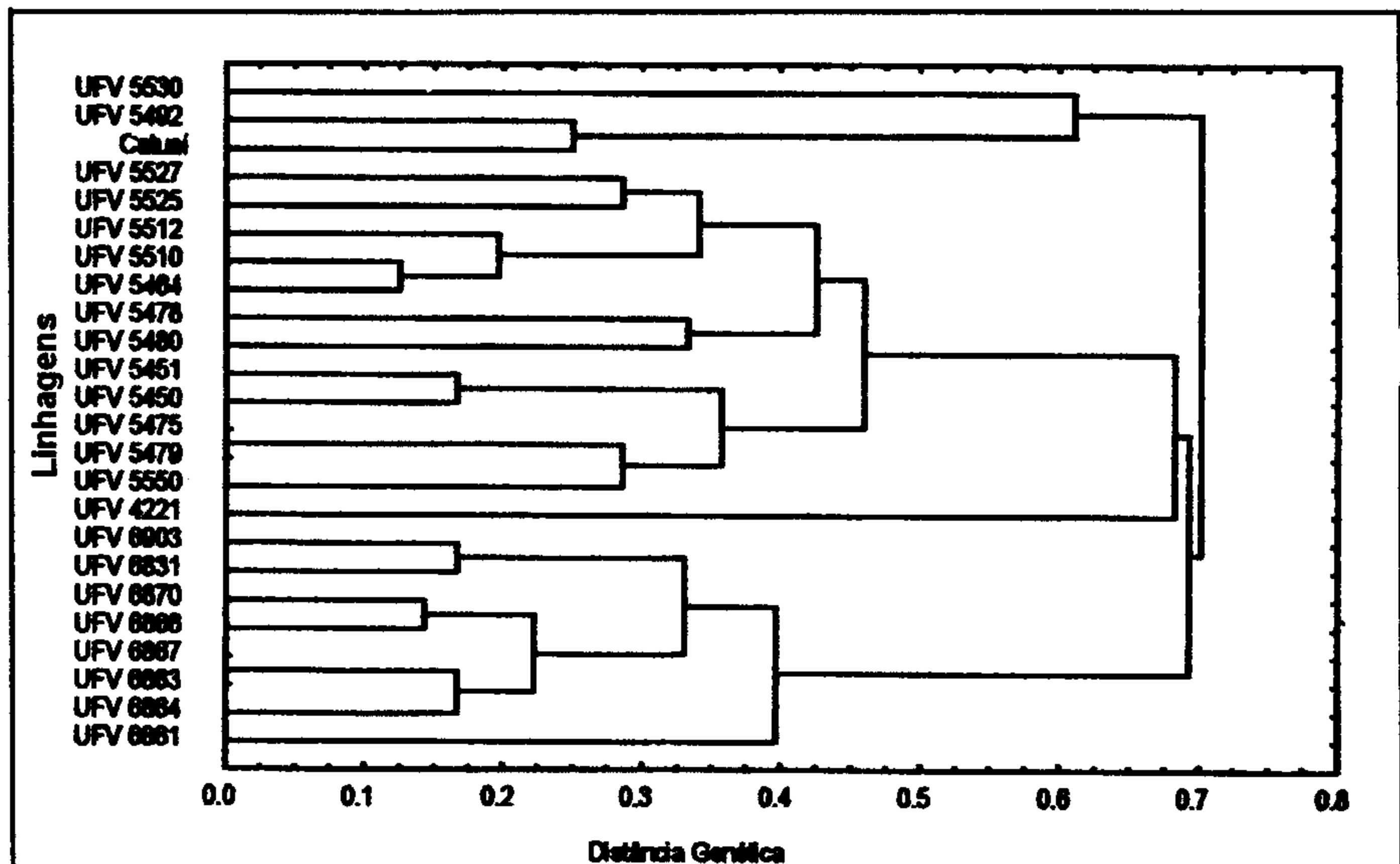


FIGURA 2 - Agrupamento de 23 linhagens de Catimor e uma de Catuai Vermelho, pelo método hierárquico do UPGMA, com base em marcadores RAPD e de acordo com a dissimilaridade do complemento aritmético do Índice de Jaccard.

Comparando-se os resultados com os obtidos por Severino (10), no mesmo experimento de campo utilizado no presente trabalho, verificou-se que o agrupamento com marcadores RAPD foi mais coerente com a genealogia do que quando foram utilizados marcadores fenotípicos. Este resultado pode ser explicado pela maior eficiência de marcadores de DNA, por exemplo, RAPD, em detectar pequenas diferenças entre genótipos geneticamente próximos, como neste estudo. A ausência do efeito de ambiente sobre os marcadores de DNA, os quais apresentam herança mendeliana simples, também explica este resultado. Severino (10) obteve agrupamento mais coerente com a genealogia quando considerou apenas os descritores com herdabilidades acima de 80% e verificou que a exclusão de um único descritor (cor do broto) de herança mendeliana simples permitiu a detecção de maior dissimilaridade entre progênies-irmãs, alterando o agrupamento. A base genética comum dos cultivares de café

arábica e a escassez de descritores morfológicos de herança mendeliana simples, sem efeito de ambiente, tomam os marcadores de DNA instrumentos úteis a serem considerados nos estudos de diversidade genética desta espécie, em complementação aos descritores fenotípicos atualmente utilizados.

## CONCLUSÕES

Marcadores RAPD são eficientes na avaliação da diversidade genética do conjunto de progênes de Catimor derivados do híbrido CIFC HW 26-5. O agrupamento das progênes com base em distâncias genéticas obtidas a partir de marcadores RAPD é coerente com a genealogia.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, Fapemig, Finep, CNP&D/Café e Centro Experimental Elói Carlos Heringer.

## REFERÊNCIAS

1. ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. *Revista Brasileira de Genética*, 18: 265 - 73, 1995.
2. CRUZ, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em Genética e Estatística. Viçosa, UFV, 1997. 442p.
3. CRUZ, C.D. & REGGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, UFV, 1994. 390p.
4. DIAS, L.A.S. 1998. Análises multidimensionais. In: Alfenas, A. C. (ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, UFV, 1998. p. 405-37.
5. DINIZ, L.E.C.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F. & SERA, T. Uso de RAPD associado a enzimas de restrição para detectar variabilidade genética no banco de germoplasma de *Coffea arábica* L. do IAPAR. In: I Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, 2000. Anais, Embrapa Café, Brasília, 2000, p.550-4.
6. FONTES, J.R.M.; SAKIYAMA, N.S.; CARDOSO, A.A.; ZAMBOLIM, L. & PEREIRA, A.A. Avaliação de híbridos F<sub>1</sub> de Café (*Coffea arábica* L.) e respectivos genitores, com marcadores RAPD. In: I Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, 2000. Anais, Embrapa Café, Brasília, 2000, p. 160-3.
7. HOEY, B.K.; CROWE, K.R. & JONES, V.M. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 92-100, 1966.
8. MALUF, M.P.; AGUIAR, A.T.E.; GALLO, P.B.; FAZUOLI, L.C. & GUERREIRO FILHO, O. Caracterização agrônômica e tecnológica de linhagens comerciais de café



- selecionadas pelo IAC. In: I Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, 2000. Anais, Embrapa Café, Brasília, 2000, p 469-72.
9. OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; WAUCH, R. & POWELL, W. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 934 - 40, 1994.
  10. SEVERINO, L.S. Caracterização de progênies de Catimor e avaliação de descritores em *Coffea arabica* L. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2000. 85p. (Tese de mestrado).
  11. TATINENI, V.; CANTRELL, R.G. & DAVIS, D.D. Genetic diversity in elite cotton germoplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Science*, 36: 186-92, 1996.
  12. TEIXEIRA, T. A. C.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A. & SAKIYAMA, C.C.H. Caracterização de acessos de *Coffea* por marcadores RAPD. In: III Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, Londrina, 1999. Anais, IAPAR/IRD, Londrina, 2000, p. 177- 80.
  13. TEIXEIRA, T. A. C. Padrões moleculares, diversidade genética e mapa parcial de ligação do cafeeiro. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 108p. (Tese de doutorado)
  14. WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531- 5, 1990.