

# VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Coffea canephora* COM BASE EM MARCADORES RAPD

Maria Amélia Gava FERRÃO<sup>1</sup> E-mail: [mferrao@incaper.es.gov.br](mailto:mferrao@incaper.es.gov.br), Aymbiré Francisco Almeida da FONSECA<sup>2</sup>, Wellington M. BARBOSA<sup>3</sup> e Romário Gava FERRÃO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), ES, <sup>2</sup>Embrapa/Incaper, <sup>3</sup>Bolsista CBP&D-Café/Incaper.

## Resumo:

Este estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética, por meio de marcadores do tipo RAPD, de 49 clones de *Coffea canephora* do programa de melhoramento do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). Foram utilizados 31 primers que geraram padrões de polimorfismo. O agrupamento dos genótipos, com base no algoritmo UPGMA e no método de otimização de Tocher, mostrou elevada divergência entre os genótipos. Verificou-se que os clones componentes de cada variedade clonal recomendada pelo Incaper encontram-se distribuídos em vários grupos geneticamente dissimilares, apesar de possuírem características fenotípicas em comum. A diversidade genética relativamente ampla observada neste estudo demonstra a importância da realização de hibridações entre estes germoplasmas.

Palavras-chave: Café conilon, variedades clonais, Espírito Santo, marcadores moleculares.

## GENETIC VARIABILITY OF *Coffea canephora* USING RAPD MARKERS

### Abstract:

This study aimed at the evaluation of the genetic divergence in 49 clones of *Coffea canephora* from the improvement program of the Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper) - ES, by applying the technique of RAPD. Thirty-one primers were used to generate standards of polymorphism. Grouping the genotypes based on the UPGMA algorithm and optimization method of Tocher, demonstrated high divergence between the genotypes. It was verified that the component clones of each clonal variety recommended by Incaper were found to be distributed in various genetically dissimilar groups, despite the possession of common phenotypic characteristics. The relatively high genetic diversity observed in this study demonstrates the importance of carrying out hybridizations between these germplasm.

Key words: Conilon coffee, clonal varieties, Espírito Santo, molecular markers.

## Introdução

O programa de melhoramento genético da espécie *C. canephora* do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper) visa disponibilizar aos cafeicultores materiais genéticos mais adequados às suas necessidades. Este programa, previsto para ser desenvolvido em várias etapas, possui metas a serem alcançadas a médio e longo prazo, guardando-se sempre a necessária atenção à estabilidade do processo produtivo e à sustentabilidade da atividade.

Os resultados do desenvolvimento dos trabalhos, relacionados à primeira fase deste programa, permitiram a obtenção e a recomendação de cinco variedades clonais e uma variedade de propagação por sementes, denominadas de EMCAPA 8111, EMCAPA 8121, EMCAPA 8131 (Bragança et al., 1993), EMCAPA 8141-Robustão Capixaba (Ferrão et al., 1999), EMCAPER 8151-Robusta Tropical (Ferrão et al., 2000) e Conilon Vitória-INCAPER 8142 (Fonseca et al., 2004).

Na composição das variedades clonais foram agrupados genótipos que além de reunirem as características de interesse, possibilitassem a manutenção de uma base genética ampla, com grande variabilidade para evitar no futuro o danoso processo de erosão genética. Para tal, clones de uma mesma variedade, apesar de possuírem uma série de características agrônomicas em comum, devem ser dissimilares em sua constituição genética, conferindo maior segurança e estabilidade aos cafeicultores que as adotarem para o plantio (Ferrão et al., 2004). Neste sentido, é de fundamental importância o estudo da divergência genética entre os genótipos selecionados, de forma a verificar a adequação da constituição das variedades sob este ponto de vista, e tendo ainda como finalidade adicional obter informações daqueles, que quando em programas de cruzamentos, possibilitariam combinações híbridas de maior efeito heterótico (Fonseca, 1999).

A precisa detecção e quantificação da variação genética é um pré-requisito para o sucesso na conservação e exploração dos recursos genéticos das plantas. O uso de marcadores moleculares, em nível de DNA, tem sido utilizado em grande escala nos últimos anos e tem se constituído numa ferramenta potente no melhoramento de plantas.

Esse trabalho visa avaliar a diversidade genética, por meio de marcadores moleculares RAPD, de quarenta e nove clones de *Coffea canephora* do programa de melhoramento do Incaper.

## Material e Métodos

Foram utilizados, nesta etapa, 49 clones de *Coffea canephora*, do programa de melhoramento genético da espécie, no Incaper, sendo 45 deles componentes das cinco variedades clonais de café conilon recomendadas pelo Instituto para o Espírito Santo (Tabela 1).

Tabela 1 – Genótipos de *Coffea canephora* utilizados para o estudo de diversidade genética.

| Tratamento | Genótipo | Variedade Clonal <sup>1</sup> | Tratamento | Genótipo | Variedade Clonal <sup>1</sup> |
|------------|----------|-------------------------------|------------|----------|-------------------------------|
| 1          | ES 01    | 1, 4 e 5                      | 26         | ES 92    | 3                             |
| 2          | ES 02    | 1 e 4                         | 27         | ES 39    | 3                             |
| 3          | ES 05    | 1                             | 28         | ES 21    | 3                             |
| 4          | ES 22    | 1                             | 29         | ES 34    | 3                             |
| 5          | ES 10    | 1                             | 30         | ES 36    | 3                             |
| 6          | ES 07    | 1                             | 31         | ES 38    | 3 e 5                         |
| 7          | ES 09    | 1                             | 32         | ES 31    | 3                             |
| 8          | ES 37    | 1                             | 33         | ES 85    |                               |
| 9          | ES 08    | 1                             | 34         | ES 77    |                               |
| 10         | ES 25    | 2                             | 35         | ES 40    | 3                             |
| 11         | ES 12    | 2                             | 36         | ES 125   | 5                             |
| 12         | ES 15    | 2                             | 37         | ES 113   | 5                             |
| 13         | ES 14    | 2 e 4                         | 38         | ES 102   | 5                             |
| 14         | ES 19    | 2                             | 39         | ES 123   | 4                             |
| 15         | ES 24    | 2                             | 40         | ES 146   | 4                             |
| 16         | ES 11    | 2 e 4                         | 41         | ES 121   |                               |
| 17         | ES 30    | 2                             | 42         | ES 109   | 5                             |
| 18         | ES 23    | 2 e 4                         | 43         | ES 212   | 5                             |
| 19         | ES 19    | 2 e 4                         | 44         | ES 347   | 5                             |
| 20         | ES 20    | 2                             | 45         | ES 346   | 5                             |
| 21         | ES 13    | 2                             | 46         | ES 328   | 4 e 5                         |
| 22         | ES 28    | 2                             | 47         | ES 329   | 4 e 5                         |
| 23         | ES 18    | 2                             | 48         | ES 327   | 5                             |
| 24         | ES 27    | 3                             | 49         | ES 309   |                               |
| 25         | ES 26    | 3                             |            |          |                               |

<sup>1/</sup> Variedade Clonal: 1= EMCAPA 8111; 2= EMCAPA 8121; 3= EMCAPA 8131; 4= EMCAPER 8141 – Robustão Capixaba; e 5= Conilon Vitória – INCAPER 8142.

Amostras de folhas sadias de plantas adultas, de cada um destes materiais, foram coletadas na Fazenda Experimental do Incaper, localizada no município de Marilândia, ES. Em seguida, foram inseridas em sacolas plásticas, devidamente etiquetadas, e conduzidas em isopor com gelo ao laboratório de biologia molecular do Centro Regional de Desenvolvimento Rural Centro Serrano/Incaper, onde foram acondicionadas à temperatura de -80°C. A extração do DNA foi efetuada com base na metodologia de Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações. Cerca de 2 g de folhas de cada clone, foram trituradas em gral de porcelana, com nitrogênio líquido. O pó obtido foi transferido para tubos de 2 ml, onde foram adicionados 900 µl de tampão de extração (CTAB 5%, NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, Tris – HCl 1 M pH 8,0, PVP 1%, β-mercaptoetanol 1%), e incubados por 40 minutos, em banho - maria, a 65 °C, tendo sido agitados suavemente 3 vezes durante o tempo de incubação. Após a incubação, efetuou-se a desproteção por duas vezes, com clorofórmio:álcool – isoamílico (24:1), e as amostras foram submetidas a centrifugação por aproximadamente 5 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa obtida desta centrifugação foi transferida para outros tubos e adicionou-se 600 µl de isopropanol gelado, para precipitação dos ácidos nucleicos, deixando a temperatura de -20 °C por 3 horas. Posteriormente foi feita a centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos e os *pellets* lavados com etanol 70% e 95%, secos e ressuspensos em tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Após a ressuspensão dos ácidos nucleicos, foi adicionada RNase A, numa concentração final de 40 µg/ml, e as amostras foram incubadas por 30 minutos, a 37 °C. A seguir, foram adicionados 600 µl de etanol absoluto gelado, para precipitar o DNA, e procedeu-se uma centrifugação a 14.000 rpm, para separá-lo da fase aquosa. O DNA foi lavado com etanol 70% e 95%, ressuspensado com TE e, finalmente, quantificado. A quantificação do DNA foi realizada a partir de amostras padrões com concentrações conhecidas. Cada reação de amplificação de 25 µl teve 25 ng de DNA, 0,1 mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl; 0,4 pM de um oligonucleotídeo iniciador ou *primer* e uma unidade de Taq polimerase. As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador, de acordo com Williams et al. (1990). Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 94 °C, por 15 segundos, uma etapa de ligação do *primer* ao DNA molde a 35 °C, por 30 segundos, e uma

etapa de extensão a 72 °C, por um minuto. Depois de 40 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72 °C, por sete minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2% imerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 Mm, EDTA 1 mM, pH 8,0), e posteriormente corados em solução contendo 10 mg/ml de brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

As bandas de DNA (produtos da amplificação) mais proeminentes foram tabuladas como **1** à presença e **0** à ausência de determinada banda. Com base nesses dados, foi obtida a matriz de dissimilaridade genética gerada a partir do complemento aritmético do índice de Jaccard. Para a análise de agrupamento dos genótipos, foram utilizados o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) e o método de otimização de Tocher (Cruz e Carneiro, 2003). As análises genético-estatísticas foram processadas no programa computacional GENES (Cruz, 2001).

## Resultados e Discussão

Utilizaram-se trinta e um primers que geraram padrões de polimorfismo entre os genótipos de *C. canephora* analisados. Destes primers, foram obtidos 233 produtos de amplificação polimórficos, com uma média de 7,516 bandas/primer.

O agrupamento obtido, com base no algoritmo UPGMA, é mostrado no dendrograma apresentado na Figura 1. Observa-se expressiva divergência entre os genótipos, em que os correspondentes aos tratamentos 38 (ES 102) e 7 (ES 09) foram geneticamente os mais dissimilares. Verifica-se que os clones componentes de cada variedade recomendada encontram-se dispersos no dendrograma, o que caracteriza a existência de dissimilaridade genética entre os mesmos e entre as variedades em questão.

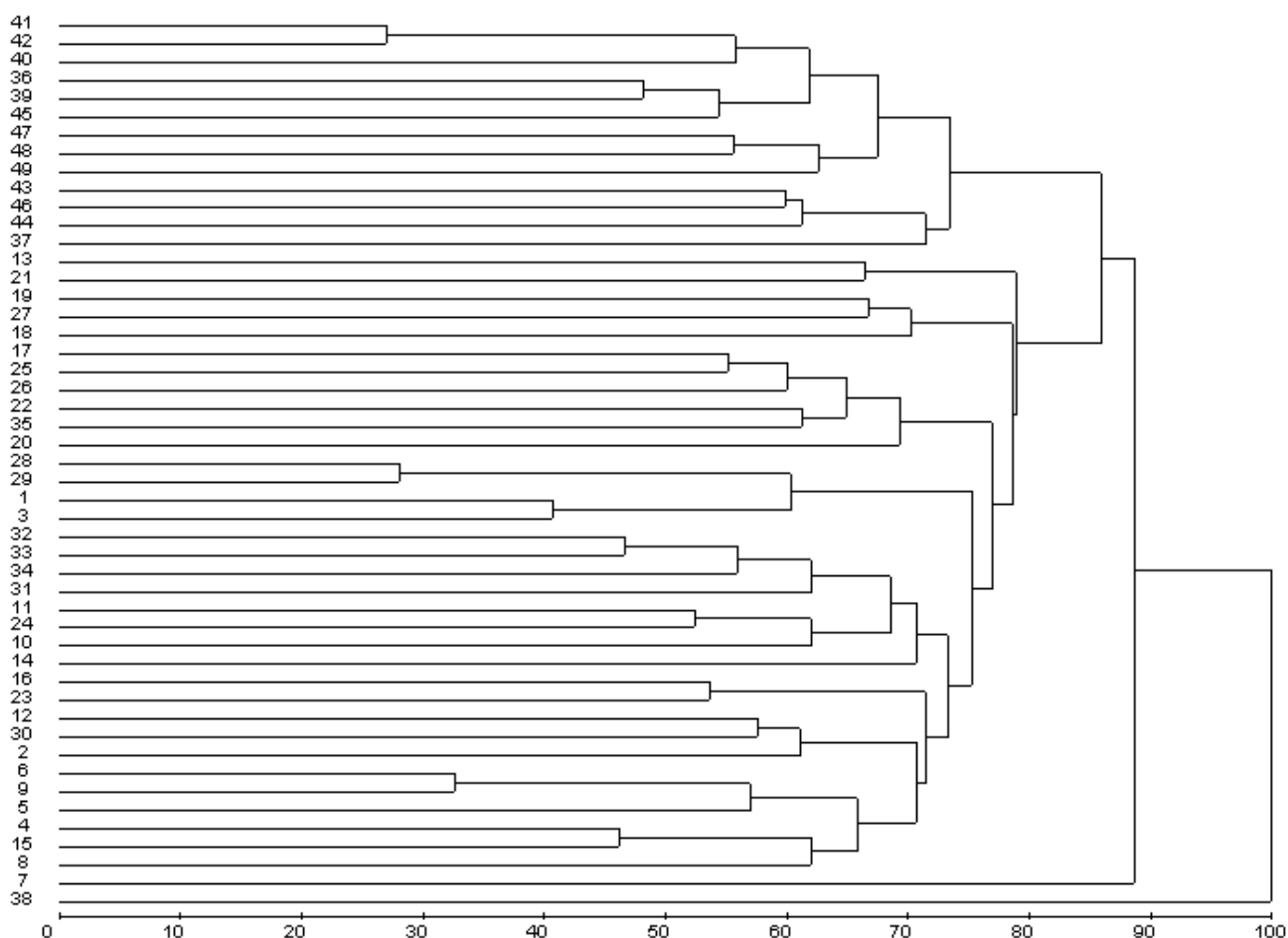


Figura 1 – Dendrograma construído usando o método UPGMA, para agrupamento de 49 genótipos de *Coffea canephora*, com base em marcadores RAPD e de acordo com a dissimilaridade genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard.

Pelo método de agrupamento de Tocher (Tabela 2), verifica-se a formação de seis grupos, sendo o primeiro deles composto de 44 genótipos, distribuídos em dezoito subgrupos. Os genótipos 38 (ES 102) e 21 (ES 13) aparecem como os mais dissimilares, seguidos pelos genótipos 7 (ES 09), 18 (ES 23) e 49 (ES 309). O quatro primeiro é componente de

quatro diferentes variedades recomendadas. O 38 (ES 102) está na variedade Conilon Vitória- Incaper 8142, o 21 (ES 13) na variedade EMCAPA 8121, o 7 (ES 09) na variedade EMCAPA 8111 e o 18 (ES 23) nas variedades EMCAPA 8121 e EMCAPER 8141.

Tabela 2 - Agrupamento de 49 genótipos de café conilon, pelo método de Tocher, com base na matriz de dissimilaridade genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard.

| Grupos | Subgrupos | Genótipos            |
|--------|-----------|----------------------|
| I      | 1         | 41 42 40 45 47 39 36 |
|        | 2         | 28 29 25 3 1         |
|        | 3         | 6 9 5 4 15 35        |
|        | 4         | 32 33 24 34 11 17    |
|        | 5         | 16 23                |
|        | 6         | 12 30 2              |
|        | 7         | 43 46 44             |
|        | 8         | 22 26                |
|        | 9         | 20                   |
|        | 10        | 19                   |
|        | 11        | 14                   |
|        | 12        | 13                   |
|        | 13        | 27                   |
|        | 14        | 31                   |
|        | 15        | 37                   |
|        | 16        | 10                   |
|        | 17        | 8                    |
|        | 18        | 48                   |
| II     |           | 49                   |
| III    |           | 18                   |
| IV     |           | 7                    |
| V      |           | 21                   |
| VI     |           | 38                   |

### Conclusões

A diversidade genética relativamente ampla, observada neste estudo, demonstra a importância da realização de hibridações entre estes germoplasmas como meio para obtenção de híbridos heteróticos.

Vários clones, componentes de uma mesma variedade clonal, encontram-se distribuídos em diversos grupos geneticamente dissimilares, apesar de possuírem características fenotípicas em comum.

### Referências bibliográficas

- Bragança, S.M., Carvalho, C.H.S., Fonseca, A.F.A. da. **EMCAPA 8111, EMCAPA 8121, EMCAPA 8131: primeiras variedades de café Conilon lançadas para o Espírito Santo**. Vitória, ES: EMCAPA, 1993. 2p. (Comunicado Técnico, 68).
- Cruz, C.D. Programa GENES – versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642 p., 2001.
- Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas. Editora UFV, Viçosa, MG, 200, 623 p.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n.1, p. 13-15, 1990.
- Ferrão, R.G.; Fonseca, A.F.A. da; Silveira, J.S.M.; Ferrão, M.A.G.; Bragança, S.M. Emcapa 8141 – Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante a seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. **Revista Ceres**, n. 273, p. 555 - 560, 2000.
- Ferrão, R.G.; Fonseca, A.F.A. da; Ferrão, M.A.G.; Bragança, S.M. **Emcaper 8151 – Robusta Tropical: primeira variedade de café conilon propagada por semente no Espírito Santo**. Vitória, ES, EMCAPER, 2000 (EMCAPER, Documento 103).

- Ferrão, R.G., Fonseca, A.F.A. da, Ferrão, M.A.G., De Muner, L.H., Verdin Filho, A.C., Volpi, P.S., Marques, E.M.G., Zucatei, F. **Café conilon: técnicas de produção com variedades melhoradas**. Vitória, ES: Incaper, 2004, 60 p. (Incaper: circular Técnica, 03 – I).
- Fonseca, A.F.A. da, **Análises biométricas em café conilon (Coffea canephora Pierre)**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 121p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- Fonseca, A.F.A. da, Ferrão, M.A.G., Ferrão, R.G., Verdin Filho, A.C., Volpi, P.S., Zucatei, F. **Conilon Vitória ‘Incaper 8142’: Variedade Clonal de Café Conilon**. Vitória, ES: Incaper, 2004. 24p. (Documentos, 127).
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, L.A., Tingey, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p. 6531 – 6535, 1990.