

# DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CLONES DE *Coffea canephora* UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES

Maria Amélia Gava Ferrão<sup>1</sup>; Elaine Manelli Riva-Souza<sup>2</sup>; Larissa Scheideger Athayde<sup>3</sup>; Larissa Garcia Queiroz<sup>3</sup>; Romario Gava Ferrão<sup>4</sup>; Aymbire Francisco Almeida da Fonseca<sup>5</sup> e Micheli Sossai Spadeto<sup>6</sup>

## Resumo

A estimativa de divergência genética existente em uma coleção de germoplasma é importante não só para a conservação dos recursos genéticos, mas também para aplicações no melhoramento de plantas. O presente trabalho objetivou estudar a divergência genética entre 33 clones de *Coffea canephora*, utilizando-se marcadores RAPD. Os métodos de Tocher e UPGMA foram utilizados para agrupar os clones. Concluiu-se que os marcadores RAPD foram eficientes para detectar variabilidade genética entre os clones de *Coffea canephora* analisados. Os métodos de agrupamento de Tocher e UPGMA foram em parte concordantes e mostraram divergência genética entre os clones. Os 13 clones que compõem a variedade Conilon Vitória e os 10 constituintes da variedade Robustão Capixaba, recomendadas pelo Incaper, encontram-se em diferentes grupos dissimilares, apesar de possuírem características fenotípicas similares. Existem outros clones também divergentes que podem ser úteis ao programa de melhoramento.

## Introdução

O café é a principal atividade econômica e social do Estado do Espírito Santo, sendo a espécie *Coffea canephora*, variedade conilon, responsável por 75% da produção Estadual.

Dos conhecimentos atuais existentes sobre a diversidade genética do café no Brasil, a maioria é resultante de trabalhos realizados a partir de análises de características morfológicas e utilizando-se marcadores bioquímicos e isoenzimáticos. Com a descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram desenvolvidos métodos baseados na amplificação do DNA genômico a partir de iniciadores que detectam polimorfismo específico de fragmentos de DNA, como o RAPD que possui uma seqüência de *primers* aleatórios, podendo apresentar várias regiões complementares a sua seqüência, distribuídos em diversos pontos do genoma (CAIXETA et al., 2006). Para café, marcadores RAPD tem sido eficientes em alguns estudos de divergência genética (FERRÃO et al., 2009; DINIZ, 2000; LASHERMES et al., 1993) e a sua utilização tem sido atrativa por ser uma técnica bastante simplificada, de modestos custos, possibilitando gerar um grande número de marcadores em pouco tempo, além disso, tem a vantagem de requerer pouca quantidade de DNA por análise.

O objetivo deste trabalho foi analisar a divergência genética entre 33 clones de *Coffea canephora*, com características fenotípicas distintas, envolvendo materiais caracterizados no Incaper como pertencentes ao grupo conilon e ao grupo robusta, utilizando marcadores moleculares RAPD.

## Material e métodos

Foram utilizados 33 clones de *Coffea canephora*: 13 clones componentes da variedade Vitória Incaper 8142 (FONSECA et al., 2004), 10 clones da variedade Emcapa 8141 Robustão Capixaba (FERRÃO et al., 2000) e, outros 10 clones de características contrastantes no programa de melhoramento genético do Incaper, caracterizados como pertencentes ao grupo Robusta e Conilon.

A extração de DNA foi realizada com cerca de 200mg de tecido foliar macerado em nitrogênio líquido e transferido para tubos de 2,0mL, com tampão de extração composto por CTAB 1%, beta-

<sup>1</sup> Pesquisadora Embrapa Café/Incaper. Bolsista CNPq. Incaper, Vitória, ES, CEP 29052-010. mferrao@incaper.es.gov.br

<sup>2</sup> Pesquisadora Incaper. CRDR/CS, Venda nova do Imigrante, ES, CEP 29375-000. manelliriva@incaper.es.gov.br

<sup>3</sup> Bolsista CBP&D Café/Incaper, CRDR/CS, Venda nova do Imigrante, ES, CEP 29375-000.

<sup>4</sup> Pesquisador Incaper. Incaper, Vitória, ES, CEP 29052-010. romario@incaper.es.gov.br

<sup>5</sup> Pesquisador Embrapa. Embrapa, Brasília, DF, CEP 70070-901. aymbire.fonseca@embrapa.br

mercaptoetanol 0,2%, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, PVP 1% e água ultra-pura 13,265mL(q.s.p 35 mL), com base no protocolo modificado de (DOYLE; DOYLE, 1990). Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% (p/v) e estocado a -20°C em tampão TE pH 8,0, até o momento da análise RAPD.

As reações de amplificação foram realizadas com solução contendo 25ng de DNA genômico, tampão 1X (10mM de Tris-HCL, pH 8,3 e 50mM de KCl), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 0,4μM de iniciador e uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e água ultra pura q.s.p. 25 μL. Foram testados 20 iniciadores do Kit 13 da *USBiological* para identificação de marcadores polimórficos. As reações RAPD foram realizadas em termociclador *Gene Amp PCR System 9700*, constando da seguinte programação: 1min a 95°C; 40 ciclos de 1 min e 45 seg a 94°C; 30 seg a 35°C e 1 min a 72°C, com extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,2% (p/v) em tampão TBE 0,5 X, sob corrente elétrica constante de 95 volts por 3h. Após a eletroforese as bandas foram coradas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV (*Eagle Eye II – Stratagene*).

A partir dos padrões de bandas das amostras geradas pelo RAPD, foi construída uma matriz binária, onde se analisou presença ou ausência de cada banda, codificada por um (1) ou zero (0) respectivamente. Partindo-se destes dados, obteve-se a matriz de dissimilaridade utilizando-se o complemento aritmético do Índice de Jaccard. Empregou-se como técnica de agrupamento o método de otimização de Tocher e o método hierárquico UPGMA - Média aritmética de grupos não ponderados. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2006).

## Resultados e discussão

Foi verificada a existência de divergência genética entre os clones de *Coffea canephora* analisados. As menores distâncias genéticas foram registradas entre os clones do grupo Conilon 7 e 8 (0,15) e 5 e 11 (0,18), considerados mais similares. As maiores distâncias foi verificada entre os clones 1 e 28 (0,83) e 1 e 30 (0,76), grupos conilon (1) e robusta (28 e 30). O clone 1 foi o mais divergente em relação aos demais, fazendo parte dos valores mais altos de distância genética.

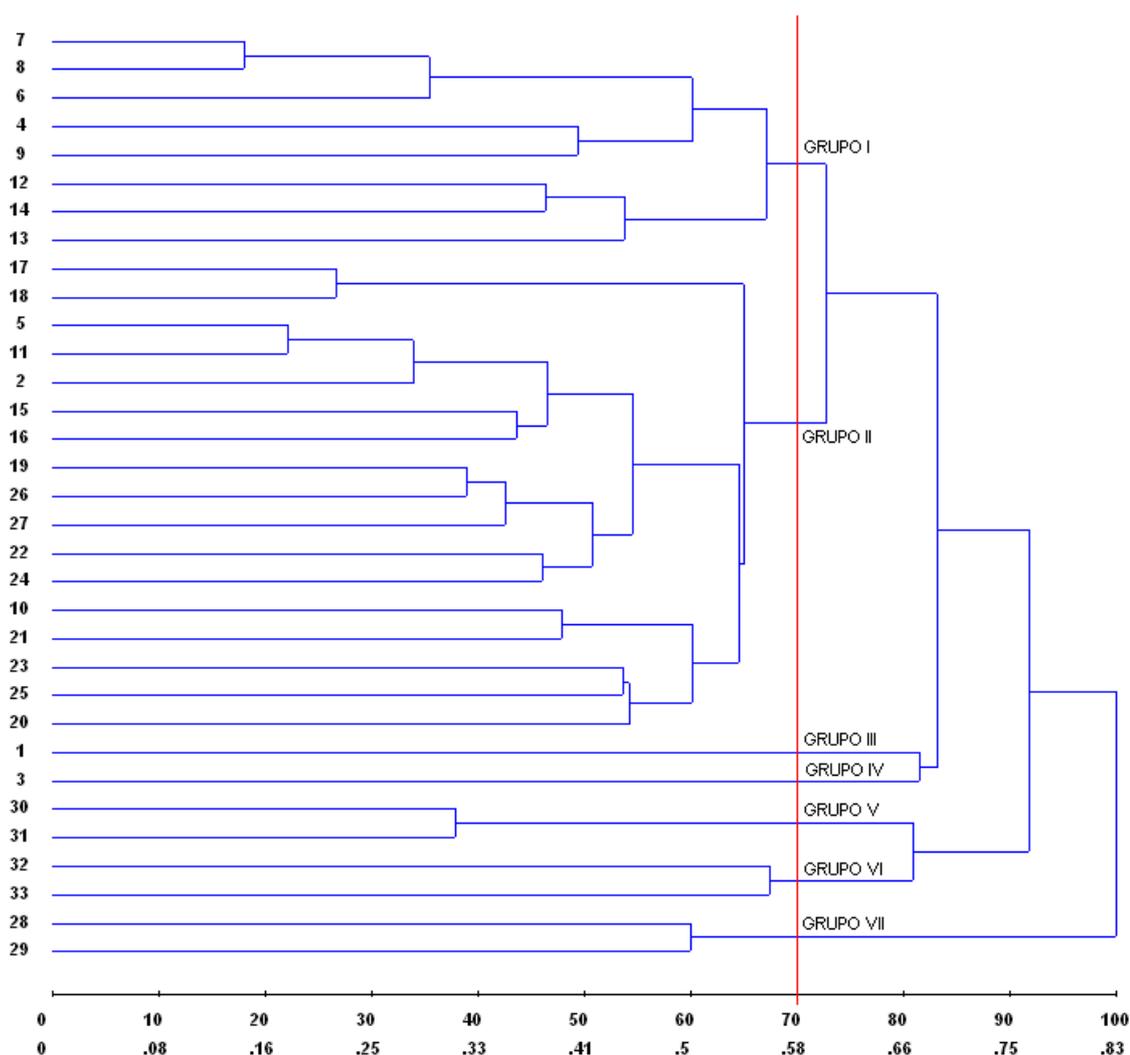
Por meio do método de Otimização de Tocher foi possível a formação de oito grupos (Tabela 1). O grupo I foi o maior grupo, reunindo 18 clones, ou seja, 54,54% do total, sendo 10 clones constituintes da variedade 'Vitória' e seis clones componentes da variedade 'Robustão Capixaba'. O grupo II foi composto por seis clones, incluindo o clone 10, que faz parte da variedade 'Vitória' e outros clones da variedade 'Robustão Capixaba'. Os grupos III, IV e V foram formados por dois clones em cada um. Estes grupos foram contemplando com clones pertencentes à coleção de germoplasma, porém não fazem parte das variedades citadas. Os clones 14, 1 e 3 permaneceram isolados em grupos distintos (grupos VI, VII e VIII, respectivamente). Os clones 1 e 3, com divergência suficiente para não serem agrupados juntos ou com outros clones fazem parte da variedade 'Vitória', e o clone 14 integra a variedade 'Robustão Capixaba'.

O método de agrupamento UPGMA, considerando-se um corte no eixo x a 70% de distância relativa entre os clones, permitiu a formação de sete grupos (Figura 1), que foram: grupo I (clones 7, 8, 6, 4, 9, 12, 14 e 13); grupo II (clones 17, 18, 5, 11, 2, 15, 16, 19, 26, 27, 22, 24, 10, 21, 23, 25 e 20); grupo III (clone 1); grupo IV (clone 3); grupo V (clones 30 e 31); grupo VI (clones 32 e 33) e grupo VII (clones 28 e 29). O coeficiente de correlação cofenética ( $r=0.8608^{**}$ ) revelou um bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a sua matriz original. Verificou-se que para os clones 1, 3, 28, 29, 30, 31, 32 e 33 houve concordância entre os grupos formados tanto pelo método de Tocher, quanto pelo método UPGMA.

Os clones estudados foram distribuídos entre os grupos, evidenciando variabilidade entre as variedades e dentro das mesmas. Esta variabilidade também foi observada em condições de campo para características fenotípicas. Alguns clones são mais estáveis em ambientes adversos, outros mais resistentes a doenças, e outros, ainda, apresentam menor variação bienal de produção (FONSECA et al., 2004). Este trabalho vem confirmar a importância de se plantar todos os clones de uma variedade clonal de café conilon e em quantidades proporcionais, a fim de obter toda a sua potencialidade produtiva e estabilidade.

**Tabela 1.** Agrupamento 33 clones de *Coffea canephora*, caracterizados com marcadores RAPD, com base no método de otimização de Tocher, utilizando-se o complemento aritmético do Índice de Jaccard.

Grupo	Clones
I	7-8-6-16-15-13-4-5-11-2-9-12-22-24-23-19-27-26
II	17-18-10-21-20-25
III	30-31
IV	28-29
V	32-33
VI	14
VII	1
VIII	3



**Figura 1.** Dendrograma de dissimilaridades genéticas obtido pelo método UPGMA, utilizando-se o complemento aritmético do Índice de Jaccard, entre 33 clones de *Coffea canephora*, caracterizados por marcadores RAPD.

Os métodos de agrupamento utilizados, Tocher e UPGMA, foram em parte concordantes e mostraram divergência genética entre os clones. Os 13 clones que compõem a variedade 'Vitória' e os 10 constituintes da variedade 'Robustão Capixaba', recomendadas pelo Incaper, encontram-se em

diferentes grupos dissimilares, apesar de possuírem características fenotípicas similares, o que confirma resultados anteriores (FERRÃO et al. 2005, 2009). Existem outros clones também divergentes que podem ser úteis ao programa de melhoramento.

## Conclusão

A maior divergência genética foi verificada entre materiais do grupo Conilon com o Grupo Robusta.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CBP&D-Café pela concessão de bolsas de desenvolvimento científico e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## Referências

- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). *Marcadores Moleculares*. Viçosa: UFV, 2006. p.9-78.
- CRUZ, C.D. *Programa genes: análise multivariada e simulação*. Viçosa: UFV. p 175, 2006.
- DINIZ, L.E.C. *Relação genética entre 40 acessos de Coffea arabica L. indicada pela técnica de RAPD associada à digestão com enzimas de restrição*. 2000. 172f. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus, v.12, p.13-15, 1990
- FERRÃO, M.a.G., Fonseca, A.F.A. da, BARBOSA, W.M.; FERRÃO, R.G. *Variabilidade genética em Coffea canephora com base em marcadores RAPD*. In: IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Londrina, PR. 2005
- FERRÃO, M. A. G. ; FONSECA, A. F. A. ; FERRÃO, R. G. ; BARBOSA, W. M. ; SOUZA, E. M. R.. Marcadores RAPD no estudo de diversidade genética em café conilon. In: 4º Congresso de melhoramento de plantas (4º CBMP) "Melhoramento de plantas e Agronegócio", 2007, São Lourenço / MG. Resumos expandidos.... São Lourenço /MG : UFLA, CNPq FAPEMIG, 2007.
- FERRÃO, M.A.G; FONSECA, A.F.A; FERRÃO,R.G; BARBOSA,W.M; SOUZA,E.M.R. Genetic Divergence in Conilon coffee Revealed by RAPD Markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9: 66-73, 2009.
- FERRÃO, R.G; FONSECA, A.F.A.; SILVEIRA, J.S.M.; FERRÃO, M.A.G.; BRAGANÇA, S.M. Emcapa 8141 – Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. *Revista Ceres*, n.273, p.555-560, 2000.
- FONSECA, A.F.A; FERRÃO, M.A.G; FERRÃO,R.G; FILHO, A.C.V; VOLPI,P.S ; ZUCATELI,F. *CULTIVAR RELEASE 'Conilon Vitória - Incaper 8142': improved Coffea canephora var. kouillou clone cultivar for the state of Espírito Santo*. v. 4, n. 4, p. 503-505, 2004.
- LASHERMERS, P.; CROS, J.; MARMEY, P.; CHARRIER, H. *Use of random amplified DNA markers to analyse genetic variability and relationships of coffea species*. Genetic Resources and Crop Evolution, n.40, p.91-99, 1993.