

Avaliação de híbridos F_1 de café (*Coffea arabica* L.) e respectivos genitores, com marcadores RAPD¹

José Roberto M. FONTES - UFV; Ney. S. SAKIYAMA - UFV (sakiyama@mail.ufv.br); Antônio A. CARDOSO - UFV; Laércio ZAMBOLIM - UFV; Antônio A. PEREIRA - EPAMIG.

RESUMO: Um estudo com marcadores RAPD foi realizado para avaliação de híbridos F_1 de café (*Coffea arabica* L.) e respectivos genitores. Dos primers utilizados para a obtenção de marcadores RAPD, 53,5% apresentaram polimorfismo, com média de 2,35 bandas polimórficas por primer. Marcadores RAPD foram eficientes para a avaliação de diversidade genética em *Coffea arabica* L. e para a certificação da natureza híbrida de materiais genéticos obtidos por cruzamentos artificiais.

PALAVRAS-CHAVE: diversidade, híbrido, *C. arabica*, RAPD.

ABSTRACT: RAPD markers were used to evaluate the F_1 coffee hybrids (*C. arabica* L.) and their respective progenitors. From the total of the primers used to generate RAPD markers, 53.5% showed polymorphism, with an average of 2.35 polymorphic bands per primer. RAPD markers were efficient to evaluate the genetic diversity in *C. arabica* L., and to certificate the hybrid condition of the genetic materials obtained by artificial crosses.

INTRODUÇÃO

A utilidade dos marcadores de DNA é determinada em grande parte pela tecnologia que é empregada para revelar o polimorfismo (TINGEY *et al.*, 1992). A técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) surgiu como ferramenta para detectar seqüências polimórficas (WILLIAMS *et al.*, 1990). Estes marcadores são fáceis de serem detectados pois não requerem informações sobre a seqüência de DNA a ser amplificada ou a síntese de primers específicos. O conhecimento da diversidade genética é importante para que possa ser explorado no melhoramento e informações de polimorfismos de DNA entre os acessos de um banco de germoplasma são úteis para este propósito. Outra aplicação dos marcadores de DNA para o melhoramento é a possibilidade da certificação do sucesso de um cruzamento artificial na obtenção de híbridos. O presente trabalho foi realizado com o propósito de obter informações sobre a diversidade genética e certificação da natureza híbrida de materiais do programa de melhoramento da UFV/EPAMIG.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo da diversidade genética de 51 genótipos: 10 genitores Catuaí, 12 genitores Híbrido de Timor e 29 híbridos resultantes de diferentes combinações entre Catuaí e Híbrido de Timor, na geração F_1 (Tabela 1). Foi realizada também a certificação da natureza híbrida de 12 híbridos F_1 estudados. Foi utilizada a técnica de marcadores moleculares RAPD. Para o estudo de diversidade foram realizadas um total de 157 reações, com 86 primers diferentes. Para a certificação da natureza híbrida dos F_1 foram utilizados 12 primers previamente selecionados de um total de 30. A extração do DNA dos genótipos estudados foi obtida através de folhas novas de cada planta seguida de amplificação de fragmentos de DNA, separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose a 1,4%, coloração dos fragmentos com brometo de etídio e fotodocumentação sob luz U.V., em equipamento próprio (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Os dados foram tabulados considerando a presença (1) ou ausência (0) das bandas amplificadas (reproduzíveis e mais intensas), originando uma matriz que foi usada para calcular as distâncias genéticas. Utilizando-se o Programa GENES (CRUZ, 1997), estes dados foram submetidos a análise para obtenção da matriz de dissimilaridade e, em seguida, dos grupos de genótipos e suas respectivas distâncias genéticas. O programa STATISTICA foi utilizado para construir os dendrogramas.

¹ Apoio: CNPq, FINEP, FAPEMIG e CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ.

Catuai	Híbrido de Timor	Híbridos F ₁
UFV2143-193, UFV2143-235, UFV2143-236, UFV2144-32, UFV2144-35, UFV2144-36, UFV2144-260, UFV2145-79, UFV2145-113, UFV2148-57	UFV376-2, UFV427-15, UFV435-1, UFV438-52, UFV439-2, UFV440-22, UFV441-1, UFV442-108, UFV443-3, UFV445-46, UFV446-8, UFV832-1	UFV332-1, UFV332-3, UFV332-5, UFV332-6, UFV341-11, UFV342-1, UFV342-2, UFV342-5, UFV342-7, UFV342-8, UFV348-2, UFV348-3, UFV348-4, UFV348-7, UFV348-9, UFV415-1, UFV415-2, UFV415-4, UFV418-6, UFV419-8, UFV419-10, UFV421-5, UFV427-2, UFV429-1, UFV430-1, UFV505-9, UFV506-3, UFV511-1, UFV513-5

Tabela 1- Lista dos 51 genótipos de café estudados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo da diversidade genética: Dos 86 primers diferentes que foram utilizados neste trabalho, 46 deles, ou seja, 53,5% dos primers, apresentaram polimorfismo; totalizando 108 bandas polimórficas, média de 2,35 bandas/primer polimórfico. Os polimorfismos são identificados como fragmentos de DNA amplificados a partir de um indivíduo e não amplificados a partir do outro, que resultam em presença e ausência de banda no gel. Dentre os primers que apresentaram maior número de bandas polimórficas encontram-se o OPA-8, OPC-10, OPA-5 e OPA-IO com nove, seis, cinco e cinco bandas polimórficas, respectivamente. A análise de agrupamento (Figura 1) definiu, ao nível de 74%, dois grupos: o grupo A com 15 genótipos (14 híbridos F₁ e 1 Híbrido de Timor) e o grupo B com os outros 36 genótipos restantes. Todos os 14 híbridos presentes no grupo A são híbridos menos produtivos, segundo avaliações de campo (dados não demonstrados). Considerando um limite de 60% de dissimilaridade genética, um terceiro grupo é formado pela divisão do grupo B. Este novo grupo é formado apenas por um genótipo, o híbrido F₁ UFV513-5. Dos 13 híbridos F₁ presentes no segundo subgrupo, 11 deles são os híbridos mais produtivos. No terceiro subgrupo encontram-se todos os genitores Catuaí estudados, além do Híbrido de Timor UFV427-15 e do F₁ UFV415-2. Tem-se observado no campo que o fenótipo do UFV427-15 se assemelha muito ao fenótipo de *C. arabica*. Se for considerado um limite de 44% de dissimilaridade genética, haverá uma subdivisão em 9 subgrupos, sendo 4 deles originados do grupo A e os outros 5 do grupo B. No grupo B, teremos: o primeiro subgrupo formado por UFV513-5; o segundo subgrupo formado pelo híbrido F₁ mais produtivo, UFV341-11, e o Híbrido de Timor C1FC832-1; o terceiro subgrupo formado por oito Híbridos de Timor; o quarto subgrupo formado por 12 híbridos F₁ (10 deles tratam-se dos mais produtivos) e um Híbrido de Timor (UFV376-2); e o quinto subgrupo formado pelos 10 Catuaí (todos), o Híbrido de Timor UFV427-15 e o híbrido F₁ UFV415-2. O grupo dos híbridos F₁ mais produtivos situa-se numa posição intermediária aos dois grupos onde estão os seus genitores (grupo dos Catuaí e grupo dos Híbrido de Timor). O Híbrido de Timor C1FC832-1 no limite de 49% de dissimilaridade já se situa num grupo à parte dos outros Híbrido de Timor. Este híbrido é um dos poucos que permanece resistente a todas as raças existentes do fungo *H. vastatrix*. O baixo polimorfismo molecular observado em *C. arabica* por outros autores (LASHERMES *et al.*, 1995) é mais provavelmente relacionado à origem desta espécie alotetraplóide. Entretanto, a diversidade genética relativamente ampla dentro da coleção do germoplasma arábica observado neste estudo demonstra a importância da realização de hibridações entre este germoplasma e deste com outros afins.

Teste dos híbridos F₁: Para certificação da natureza híbrida utilizou-se um total de 15 marcadores RAPD gerados por 12 primers. Foram estudados os 12 híbridos mais produtivos. Observou-se que 11 deles apresentaram bandas polimórficas presentes apenas no genitor masculino (Híbrido de Timor), confirmando a ocorrência de cruzamento e, portanto, atestando a natureza híbrida dos materiais estudados. Dentre aqueles que apresentaram natureza híbrida estão: UFV341-11, UFV342-8, UFV418-6, UFV419-8, UFV419-10, UFV427-2, UFV429-1, UFV430-1, UFV505-9, UFV506-3 e UFV511-1. A natureza híbrida de UFV513-5 não foi confirmada nos testes realizados. Por esta razão e pelo fato de ser distinto dos demais, mais estudos estão sendo realizados com este material. A Figura 2 exemplifica os resultados dos testes realizados para certificação da natureza híbrida dos materiais.

CONCLUSÃO

O agrupamento com base em marcadores RAPD foi consistente com as informações prévias sobre a genealogia do material estudado, possibilitando também a certificação da natureza híbrida dos materiais genéticos obtidos por cruzamentos artificiais.

51 genótipos
108 marcadores RAPD

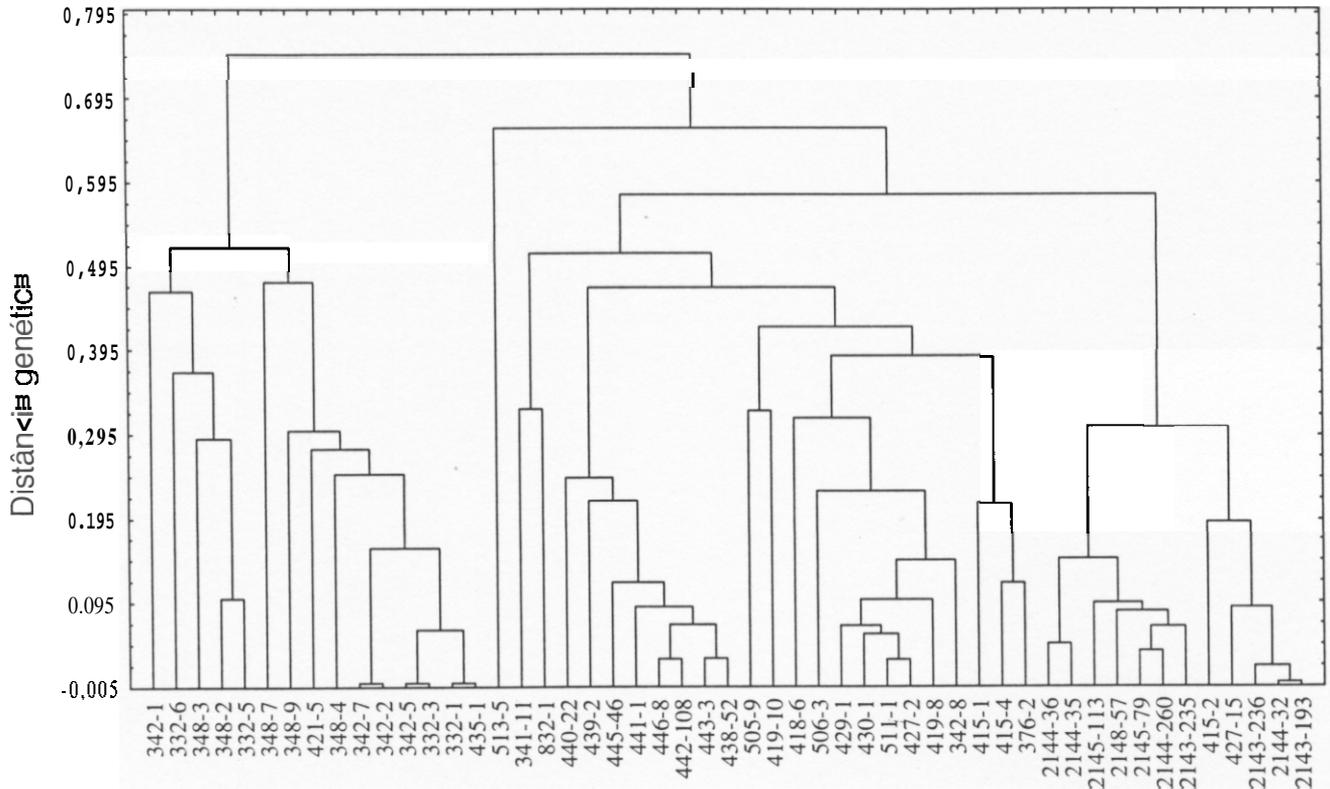


Figura 1 -Dendrograma representando distâncias genéticas estimadas entre 51 genótipos de café baseados em 108 marcadores RAPD gerados por 46 primers.

I 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 B

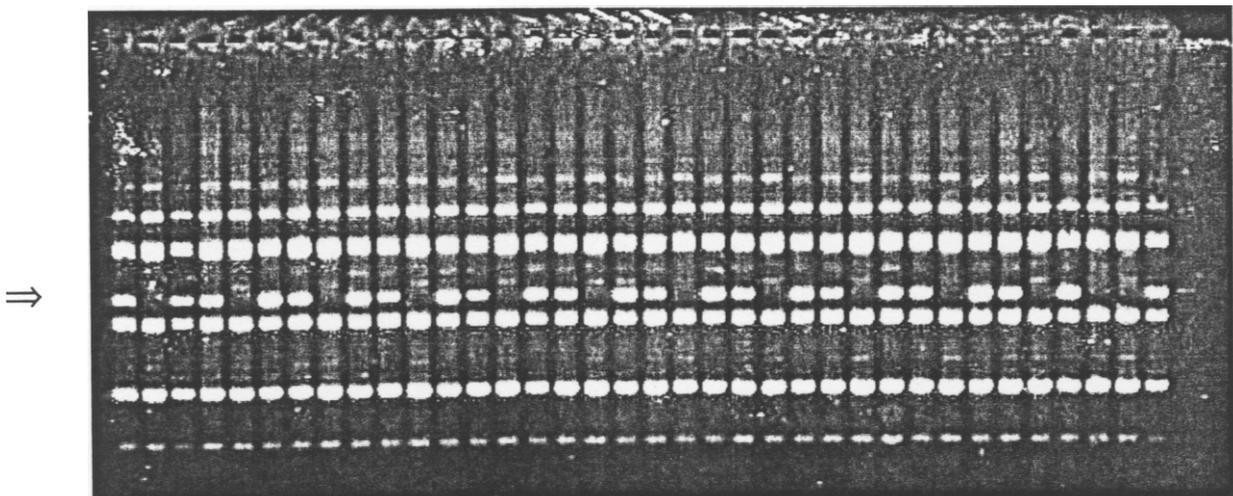


Figura 2 - Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido com o primer OPC-9 para doze híbridos F₁ e seus respectivos genitores (genitor feminino Catuaí e genitor masculino Híbrido de Timor). A seta indica o polimorfismo mais evidente. A seqüência de genótipos partindo da esquerda é a seguinte: (1) UFV341-11, (2) UFV2144-35, (3) UFV435-1, (4) UFV342-8, (5) UFV2144-35, (6) UFV445-46, (7) UFV418-6, (8) UFV2143-235, (9) UFV443-3, (10) UFV419-8, (11) UFV2143-235, (12) UFV445-46, (13) UFV419-10, (14) UFV2143-235, (15) UFV445-46, (16) UFV427-2, (17) UFV2144-260, (18) UFV439-2, (19) UFV429-1, (20) UFV2145-113, (21) UFV441-1, (22) UFV430-1, (23) UFV2145-113, (24) UFV442-108, (25) UFV505-9, (26) UFV2145-79, (27) UFV438-52, (28) UFV506-3, (29) UFV2145-79, (30) UFV446-8, (31) UFV511-1, (32) UFV2148-57, (33) UFV443-3, (34) UFV513-5, (35) UFV2148-57, (36) UFV832-1 e (B) Branco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUZ, C.D. 1997. Programa Genes: Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- FERREIRA, M.E. & GRATAPAGLIA, D. 1996. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 2ª edição. EMBRAPA, Brasília, DF. 220p.
- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; CROS, J.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F. & CHARRIER, A. 1995. Origin and genetic diversity of *Coffea arabica* L. based on DNA molecular markers. *Agronomie*, p.528-536.
- TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A. & WILLIAMS, J.G.K. 1992. Genetic analysis with RAPD markers. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*, Minneapolis, p. 3-8.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, 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 Research*, Oxford, 18:6531-6535.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425