

## USO DE MARCADORES RAPD NA AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Coffea*

Terezinha A. **TEIXEIRA-CABRAL** (UFV, tcabral@alunos.ufv.br); Ney S. **SAKIYAMA** (UFV, sakiyama@mail.ufv.br); Laércio **ZAMBOLIM** (UFV); Antônio A. **PEREIRA** (EPAMIG); Cássia C. H. **SAKIYAMA** (UFV).

**ABSTRAT:** Molecular genetic distance information is helpful, since the enlargement of the genetic diversity is important for arabica coffee tree improvement. RAPD markers (*Random Amplified Polymorphic DNA*) were used to evaluate genetic distances among 40 coffee genotypes of the Universidade Federal de Viçosa coffee germoplasm (including four different species). A set of 11 arbitrary decamer oligonucleotides (Operon Technologies, Inc.) was used for the PCR amplification of DNA sequences. Amplified DNA fragments were separated by electrophoresis in a 1.4% agarose gel and photographed under UV light after staining with ethidium bromide. RAPD technique was efficient to detect variations among accessions of *Coffea*. The clustering based on these markers agreed with the known genetic relationship.

**RESUMO:** A ampliação da diversidade genética é importante para o melhoramento genético do café, fazendo com que informações sobre distâncias genéticas entre acessos de um banco de germoplasma baseadas em marcadores moleculares sejam úteis na identificação desta diversidade. Marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) foram usados para avaliar as distâncias genéticas entre 40 genótipos de café do banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa (incluindo quatro espécies diferentes). Foram utilizados 11 *primers* arbitrários da Operon Technologies, Inc., com repetição. Os produtos amplificados foram separados em geis de agarose 1,4%, tratados com brometo de etídeo e visualizados em um transiluminador UV. A técnica RAPD foi eficiente na identificação de variações entre acessos de *Coffea*. O agrupamento baseado no estudo com estes marcadores concordou com as relações genéticas previamente conhecidas.

**PALAVRAS-CHAVE:** café, *Coffea*, marcadores RAPD, distância genética, diversidade.

### INTRODUÇÃO

A ampliação da diversidade genética tornou-se importante para promover o melhoramento de café e informações sobre diversidade entre acessos de um banco de germoplasma são úteis para este propósito. Estimativas de distâncias genéticas baseadas na análise direta do DNA eliminam certas complicações advindas da avaliação do fenótipo, como por exemplo a influência do meio ambiente e baixo número de polimorfismos. A utilidade destes marcadores de DNA é determinada em grande parte pela tecnologia que é empregada para revelar os polimorfismos (Tingey et al., 1992). Com o desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) várias técnicas foram desenvolvidas para detectar polimorfismos de DNA pela amplificação de fragmentos específicos de DNA e separação dos fragmentos por eletroforese para visualização dos polimorfismos. Uma destas técnicas foi desenvolvida por Williams et al. (1990) e foi chamada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). 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. Duas outras vantagens são a automatização do processo e pequena quantidade de DNA requerida. Estas vantagens fazem com que marcadores RAPD sejam escolhidos para determinação de similaridades 20 genéticas (Thormann & Osborn, 1992). O objetivo deste trabalho foi avaliar a adequação da técnica RAPD na estimação da diversidade genética entre 40 acessos do gênero *Coffea* do banco de germoplasma localizado no campus da Universidade Federal de Viçosa.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Material genético:** Na Tabela 1 encontram-se listados os 40 genótipos do banco de germoplasma avaliados quanto à diversidade genética com base em marcadores RAPD. Foi amostrada apenas uma planta de cada genótipo. **Extração de DNA:** O DNA foi extraído de folhas jovens seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1990) com a adição de PVP-40 (solúvel) no tampão de extração. Após a extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro, corrido em gel de agarose 0,8 % e armazenado a 4°C. Na época da amplificação foi diluído em TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para uma concentração final de 10 ng/µl. **Amplificação de DNA e análise eletroforética dos produtos:** Foram utilizados 11 *primers* de 10 bases

da “Operon Technologies” (OPA-01, OPA-02, OPA-05, OPA-10, OPA-18, OPA-20, OPB-01, OPB-07, OPB-11, OPB-12 e OPC-09) e as amplificações foram feitas em termociclador Perkin-elmer 9600. Cada reação contou com um volume total de 25 µl, contendo os seguintes componentes: 25 ng de DNA genômico, 1 unidade AmpliTaq DNA polimerase, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 µM de “primer”, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e o volume final completado com água ultrapura. Foi utilizado o seguinte programa: um ciclo para desnaturação (95°C por 1 min), 39 ciclos para amplificação (15 seg a 94°C, 30 seg a 35°C, 60 seg a 72°C) e para finalizar 7 min a 72°C. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em geis de agarose 1,4%, corados com brometo de etídio, visualizados em UV e fotodocumentados. O experimento foi executado com duas repetições de amplificação para cada *primer* e somente foram consideradas as bandas polimórficas mais nítidas e com resultados consistentes nas duas repetições, sendo os RAPDs registrados como presença ou ausência de bandas. Análise dos dados: Foi montada uma matriz de acordo com a presença (1) e ausência de bandas (0). Estimativas de similaridades genéticas foram expressas como coeficientes de similaridades de Jaccard (Jaccard, 1901) usando a equação  $SG_{ij} = a/(a+b+c)$ , onde  $SG_{ij}$  é a similaridade genética entre os genótipos  $i$  e  $j$ ,  $a$  é o número de bandas presentes em ambos  $i$  e  $j$ ,  $b$  é o número de bandas presentes em  $i$  e ausentes em  $j$ , e  $c$  é o número de bandas presentes em  $j$  e ausentes em  $i$ . A conversão para distância genética (DG) foi feita usando a equação  $DG_{ij} = 1 - SG_{ij}$ . O programa GENES (Cruz, 1997) foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas. O dendrograma, baseado na matriz de distâncias genéticas, foi criado pela análise de agrupamento do programa STATISTICA, versão 5.0, usando o método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic average*).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 11 *primers* utilizados deram origem a 73 bandas polimórficas, nítidas com resultados consistentes nas duas repetições, que representaram uma média de 6,63 bandas polimórficas por *primer*. A análise de agrupamento baseada nos complementos aritméticos de Jaccard utilizando o método UPGMA ao nível de 19% de distância genética (Figura 1), definiu seis grupos, o grupo A com um genótipo (*C. racemosa*), o grupo B com um genótipo (*C. canephora*), o grupo C com um genótipo (Triplóide), o grupo D com um genótipo (*C. congensis*), o grupo E com um genótipo (Híbrido de Timor em geração F<sub>1</sub> CIFIC 4106) e o grupo F com os 35 genótipos restantes. A espécie mais distante de *C. arabica* foi *C. racemosa*, seguida por *C. canephora* e *C. congensis*. Esta ordem de distância está de acordo com publicações anteriores (Orozco-Castillo et al., 1994; Lashermes et al., 1995; Raina et al., 1998; Lashermes et al., 1999). Considerando um limite de 9,5% de distância genética, o grupo F foi subdividido em dois subgrupos: o subgrupo F1 com nove genótipos (H 484-2, H 843, Catimor UFV 2983, Catimor UFV 1359, Cachimor UFV 351-13, Cavimor UFV 357-4, Catimor UFV 386-19, H 415-3 e Catimor UFV 395-141) e o subgrupo F2 com os 26 genótipos restantes. Todos os genótipos do subgrupo F1 são descendentes do Híbrido de Timor. O genótipo Catimor UFV 1310, que é a geração F<sub>4</sub> do cruzamento entre Caturra Vermelho (CIFIC 19/1) e Híbrido de Timor (CIFIC 832/1) ficou fora do grupo de descendentes do Híbrido de Timor, aproximando-se mais do seu ancestral Caturra Vermelho. O Híbrido de Timor CIFIC 2234, originário da Tanzânia de seleções VCE 1587 com provável resistência a *Colletotrichum kahawae* agente causal da doença coffee berry (CBD) (Bettencourt, comunicação pessoal), também ficou agrupado com as cultivares comerciais de *C. arabica*, o que está de acordo com resultados obtidos por Fontes (dados a serem publicados). Analisando o dendrograma vê-se que os 26 genótipos do subgrupo F2 estão próximos, confirmando a pequena variabilidade genética dos cultivares de *Coffea arabica* L. Outros autores (Lashermes et al., 1993; 1995; Orozco-Castillo et al., 1994; 1996) também relataram a obtenção de dados com marcadores RAPD, indicando a pequena variabilidade genética das variedades comerciais de café arábica e uma relativamente ampla diversidade genética entre as espécies do gênero *Coffea*. Entretanto, vários locos polimórficos entre os genótipos dentro do subgrupo F1 e do subgrupo F2 indicam a possibilidade de análise da variabilidade existente, com o uso de maior número de *primers*, tendo em vista que no presente trabalho foram utilizados somente 11.

Tabela 1. Acessos de *Coffea* utilizados para avaliação de distâncias genéticas com marcadores RAPD.

---

<b>Genótipos</b>
01. <i>Coffea racemosa</i>
02. <i>Coffea congensis</i>
03. <i>Coffea canephora</i> T 3755
04. Triplóide UFV 557-3 ( <i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i> )
05. Híbrido de Timor CIFC 4106
06. Híbrido de Timor CIFC 2234
07. Típica da China UFV 2945
08. Típica de Portugal UFV 536
09. Catuaí Vermelho IAC 15
10. Catuaí Vermelho IAC 44
11. Catuaí Vermelho IAC 99
12. Catuaí Vermelho IAC 81
13. Catuaí Amarelo IAC 30
14. Catuaí Amarelo IAC 86
15. Catuaí Amarelo IAC 47
16. Catuaí Amarelo IAC 113
17. Mundo Novo IAC 464-18
18. Mundo Novo IAC 515-3
19. Mundo Novo IAC 376-4-32
20. Mundo Novo IAC 388-17-16
21. Mundo Novo IAC 376-4-22
22. Bourbon Amarelo UFV 535 – Procedente do CENICAFE
23. Bourbon UFV 2952
24. Bourbon da China (Progênie 5288 II 1) UFV 2946
25. Bourbon da China (Progênie 5288 II 2) UFV 2947
26. Caturra Vermelho CIFC 19/1
27. Catimor UFV 395-141
28. Catimor UFV 386-19
29. Catimor UFV 1310
30. Catimor UFV 1359
31. Catimor UFV 2983
32. H 484-2 (IAC 515-3 x ERU 209/7)
33. H 415-3 (IAC 30 x ERU 209/6)
34. Mundindu UFV 315-76
35. Cachimor UFV 351-13
36. Cavimor UFV 357-4
37. San Ramon UFV 3094
38. Airi UFV 3095
39. Purpuracens UFV 4072
40. Rasgano H 843

---

CENICAFE - Centro Nacional de Investigações del Café (Colômbia)

ERU - Estação Regional de Vige (Angola)

IAC - Instituto Agronômico de Campinas (Brasil)

T - Turrialba (Costa Rica)

UFV - Universidade Federal de Viçosa (Brasil)

## CONCLUSÃO

Comparando-se o dendrograma obtido pelas distâncias genéticas, resultantes do estudo de marcadores RAPD, com as relações genéticas previamente conhecidas entre os materiais estudados, conclui-se que os marcadores RAPD são confiáveis e úteis para a avaliação da diversidade genética entre acessos de *Coffea*.

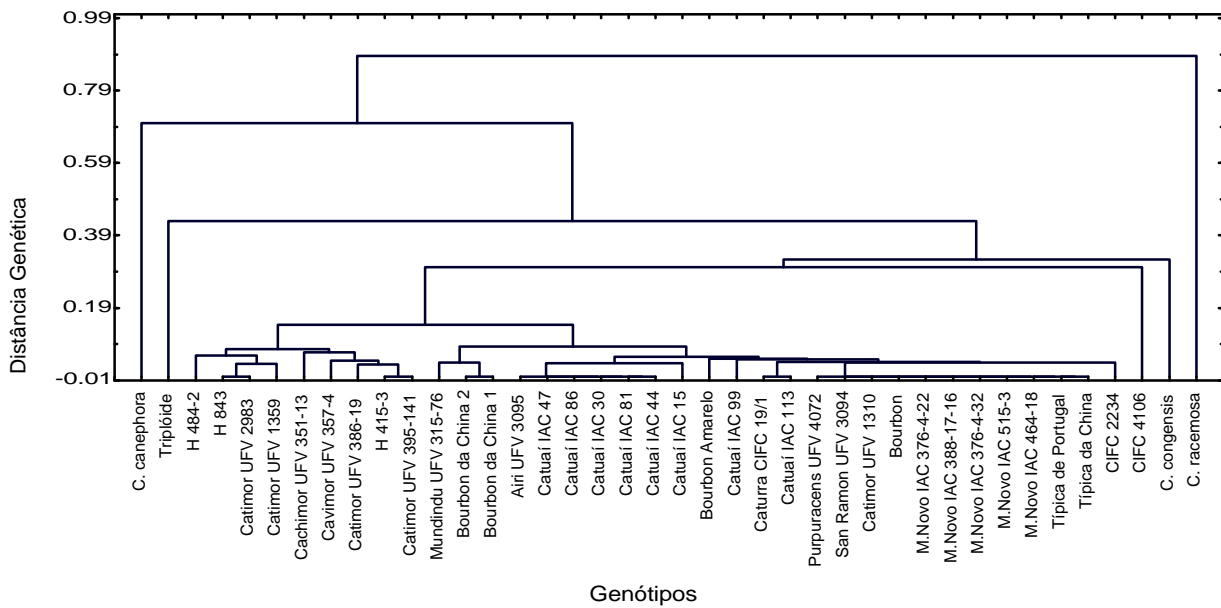


Figura 1. Dendrograma representando distâncias genéticas estimadas entre 40 genótipos de cafeeiro e baseadas em 73 marcadores RAPD oriundos de 11 *primers*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUZ, C.D. 1997. Programa Genes: Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**(1):13-15.
- JACCARD, P. 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull Soc. Vaudoise Sci. Nat.* **37**:547-579.
- LASHERMES, P.; CROS, J.; MARMEY, P. & CHARRIER, A. 1993. Use of random amplified DNA markers to analyse variability and relationships of *Coffea* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **40**:91-99.
- 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.
- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F. & CHARRIER, A. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet*, **261**:259-266.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R & POWEL, W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor Appl Genet*, **87**:934-940.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; POWEL, W. & WAUGH, R. 1996. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. *Plant Cell Reports*, **15**:337-341.
- RAINA, S.N.; MUKAI, Y. & YAMAMOTO, M. 1998. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theor Appl Genet*, **97**:1204-1209.
- THORMANN, C.E. & OSBORN, T.C. 1992. Use of RAPD & RFLP markers for germplasm evaluation. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*, Minneapolis, p. 9-11.
- 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