

## DIFERENÇAS GENÉTICAS ENTRE SELEÇÕES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DA MESMA ORIGEM AVALIADAS POR RAPD COM DIGESTÃO PRÉVIA COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

RUAS<sup>1</sup>, P.M., SERA<sup>2</sup>, T., RUAS<sup>1</sup>, C.F., DINIZ<sup>1</sup>, L.C., TORRES<sup>1</sup>, F.M., CARVALHO<sup>1</sup>, V.P., RAMPIM<sup>1</sup>, L., RUAS<sup>1</sup>, E. A., SILVEIRA<sup>1</sup>, S.R.

<sup>1</sup> Depto de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 86051-990. E-mail: ruas@sercontel.com.br

<sup>2</sup> Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR).

**RESUMO:** Marcadores moleculares RAPD, obtidos após digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, foram utilizados para análise da distância genética em 14 variedades de *Coffea arabica*. Vinte e quatro primers RAPD amplificaram um total de 330 fragmentos dos quais 224 (68%) foram polimórficos. Os produtos de amplificação foram analisados pelo método de agrupamentos UPGMA, construído a partir de uma matriz de distância genética. A cultivar Mundo Novo foi a que apresentou maior distância genética (variando de 0,27 to 0,43) e pode portanto ser utilizada em cruzamentos que devem resultar em híbridos com maior performance. Os resultados sugerem a possível origem da cultivar Kattimor. Algumas das associações observadas na análise dos grupos mostram que as cultivares Caturra Vermelho e Caturra Amarelo mostraram uma distância genética de 0,18 e, dentre as linhagens irmãs do IAPAR-59, a cultivar 'IAPAR-75163-12' é a mais distinta. Além disso, os marcadores RAPD mostram que o F-2 derivado do cruzamento 'IAPAR-59' X 'Mundo Novo' apresenta uma distância genética de 0,16 e 0,41 em relação aos dois cultivares, respectivamente. Os resultados mostram que marcadores RAPD, obtidos após a digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, são eficientes para a caracterização genética de genótipos *C. arabica* além de fornecer informação importante sobre a provável origem do cultivar Kattimor.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*, enzima de restrição, marcadores moleculares, RAPD, variabilidade genética.

## GENETIC DIFFERENCES AMONG COFFEE SELECTIONS (Arabic *Coffea* L.) OF THE SAME ORIGIN EVALUATED BY RAPD WITH PREVIOUS RESTRICTION DIGESTION

**ABSTRACT:** RAPD molecular markers, obtained after of DNA, were used to measure genetic distance among 14 *Coffea arabica* varieties. Twenty four 10-mer primers amplified 330 DNA fragments and a total of 224 (68%) were polymorphics. The RAPD products were used to group the arabica cultivars by

cluster analysis created from a genetic distance matrix calculated by UPGMA method. The Mundo Novo cultivar was the most distinct (genetic distance ranging from 0,27 to 0,43) and therefore, it can be used to predict higher performance hybrids. The probable origin of Kattimor cultivar was suggested. The associations observed in the dendrogram showed that the cultivars Caturra Vermelho and Caturra Amarelo cluster with a genetic distance of 0,18. Among the cultivars belonging to the IAPAR-59 group, cultivar 'IAPAR-75163-12' was the most distinct. The RAPD markers showed that the F-2 'IAPAR-59' X 'Mundo Novo' had a genetic distance of 0,16 and 0,41 from both 'IAPAR-59' and 'Mundo Novo' the parental cultivars, respectively. The use of restriction digestion of genomic DNA followed by RAPD amplification is efficient for genetic characterization of *C. arabica* genotypes and add important contribution for the origin determination of the Kattimor cultivar.

**Key words:** *Coffea arabica*, genetic variability, molecular markers, RAPD.

## INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais populares do mundo e uma cultura de grande valor para a exportação. A bebida de melhor qualidade é produzida por *Coffea arabica* L. a qual representa 70% da produção mundial. Atualmente, três cultivares são largamente cultivados, 'Mundo Novo', um híbrido entre 'Bourbon' e *C. arabica* var *arabica*, 'Caturra' um mutante de 'Bourbon' com internodos curtos e 'Catuai' um híbrido entre 'Caturra' e 'Mundo Novo'. Estes cultivares são altamente produtivos e produzem uma bebida de alta qualidade. Entretanto, programas de melhoramento são limitados pela base genética estreita de *C. arabica*. Assim, metodologias que permitem um melhor acesso da variabilidade genética são de extrema importância. O desenvolvimento de marcadores polimórficos amplificados ao acaso (RAPD) (Wesh & Mc Clelland, 1990; Williams et al., 1990), permitiu o exame da variabilidade genômica sem conhecimento prévio das seqüências de DNA. Esta técnica tem se mostrado útil no estudo da base molecular do polimorfismo, caracterizando recursos genéticos e localizando genes de interesse. Marcadores de RAPD tem sido descritos como um método efetivo para identificar acessos de café (Lashermers et al., 1993). Neste estudo, marcadores gerados por RAPD com digestão prévia do DNA genômico com enzimas de restrição foram usados para estimar a distancia genética entre 14 acessos de *C. arabica*, a origem de determinados acessos e os melhores cruzamentos futuros para aumentar a variabilidade genética.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os acessos utilizados fazem parte de uma coleção de *C. arabica* mantida no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em Londrina e inclui: ‘Mundo Novo’, ‘Catuai’, ‘Caturra Vermelho’, ‘Caturra Amarelo’, ‘Villa Sarchi’, ‘Colombia Amarelo’ (“Sarchimor”), ‘IAPAR-59’ (“Sarchimor” IAPAR75163-22), ‘Tupi’ (“Sarchimor” LC1669-33), IAPAR75163-21-10 (“Sarchimor”), ‘IAPAR75163-12’ (“Sarchimor”), ‘Kattimor’, F<sub>1</sub> ‘Mundo Novo’ LCMP 376-4 x ‘IAPAR-59’, F<sub>2</sub> ‘Mundo Novo’ LCMP 376-4 x ‘IAPAR-59’.

### Extração de DNA, amplificação e eletroforese

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens coletadas de quatro plantas de cada cultivar usando o protocolo Doyle & Doyle (1987) exceto que o CTAB foi substituído por MATAB no tampão de extração (Diniz 2000). A concentração de DNA foi estimada usando o fluorômetro DyNA Quant 2000 (Hoefler Pharmacia) de acordo com as especificações do fabricante. Antes da amplificação o DNA genômico foi digerido com uma das enzimas de restrição Bam HI, Eco RI e Hae III conforme descrito por Diniz (2000). As reações de amplificação e o programa utilizado estão descritos em Diniz (2000).

### Análise dos dados

Os marcadores obtidos foram avaliados pela presença (1) e ausência (0) de bandas e analisados com o programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses, version 1.3) usando uma matriz de distância genética (Nei, 1978), a partir da qual contruiu-se o dendograma utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Averages). A reprodutibilidade dos padrões de agrupamento, foi avaliada com as probabilidades do “bootstrap” calculadas através de 1000 permutações. A análise da coordenada principal foi feita de acordo com o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers v. 2.1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de RAPD, associada com digestão prévia do DNA genômico com enzimas de restrição, permitiu a detecção de polimorfismo em 14 cultivares de *C. arabica*. Um total de 330 marcadores RAPD foram obtidos, dos quais 224 (68%) foram polimórficos. Os dados foram analisados usando o método de agrupamentos UPGMA gerado a partir dos cálculos de distância genética de Nei (1978). Os valores de

distância genética assim como as associações obtidas entre as 14 cultivares são apresentadas na Tabela 1 e nas Figuras 1 e 2.

**Tabela 1** - Distância genética construída com base no coeficiente de Nei (1978) a partir de 330 marcadores RAPD obtidos para 14 variedades de *C. arabica*.

Variedades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 - Mundo Novo IAC 376-4	0.00													
2 - Catuai Vermelho	0.27	0.00												
3 - Caturra Vermelho	0.27	0.18	0.00											
4 - Caturra Amarelo	0.31	0.24	0.18	0.00										
5 - Villa Sarchi	0.34	0.29	0.27	0.24	0.00									
6 - Colombia Amarelo	0.35	0.28	0.26	0.30	0.22	0.00								
7 - IAPAR 77028 Amarelo	0.38	0.28	0.25	0.28	0.17	0.18	0.00							
8 - IAPAR - 59	0.33	0.27	0.24	0.24	0.18	0.16	0.16	0.00						
9 - TUPI	0.30	0.27	0.27	0.27	0.17	0.18	0.13	0.10	0.00					
10 - IAPAR 75163-21-10	0.34	0.29	0.27	0.26	0.18	0.14	0.15	0.09	0.09	0.00				
11 - IAPAR 75163-12	0.43	0.28	0.27	0.29	0.26	0.22	0.19	0.15	0.18	0.12	0.00			
12 - KATTIMOR	0.36	0.28	0.27	0.2	0.21	0.19	0.19	0.13	0.17	0.14	0.15	0.00		
13 - F-1	0.37	0.26	0.27	0.27	0.24	0.19	0.18	0.14	0.16	0.14	0.13	0.14	0.00	
14 - F-2	0.41	0.36	0.27	0.26	0.25	0.22	0.24	0.16	0.18	0.16	0.22	0.21	0.23	0.00

Um polimorfismo considerável foi identificado entre as variedades mostrando que a metodologia utilizada pode ser eficiente para delinear cruzamentos futuros bem como podem auxiliar a elucidar a origem de alguns cultivares.

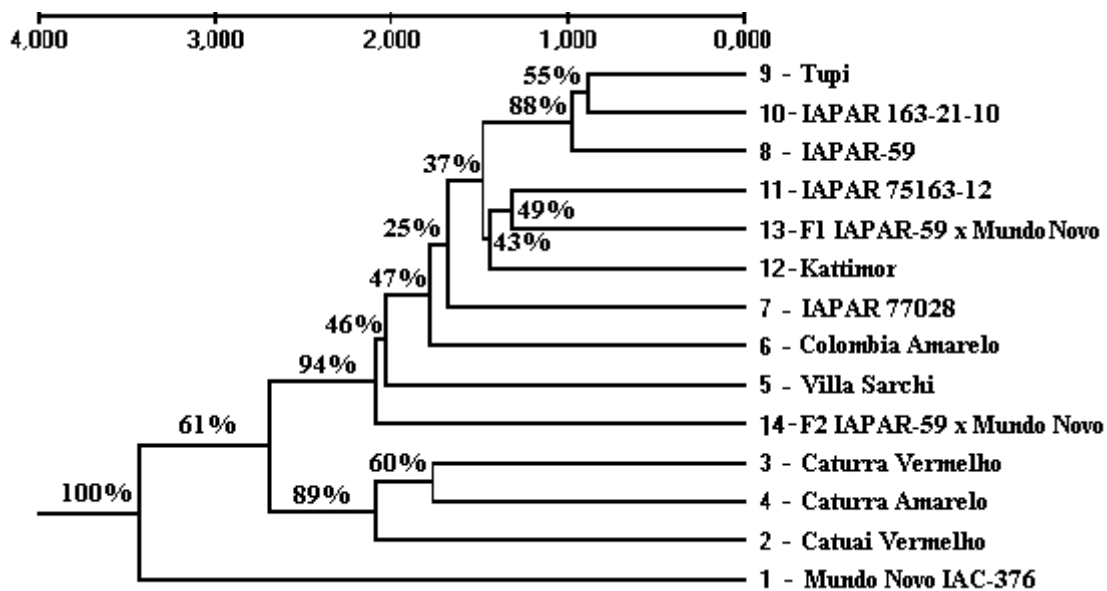
#### **‘Catuai Vermelho IAC 81’ vs ‘Mundo Novo IAC 376-4’ e ‘Caturra Vermelho’.**

‘Catuai Vermelho’ e ‘Catuai’ Amarelo são produtos de hibridação artificial entre ‘Caturra’ e ‘Mundo Novo’, onde progênies com frutos vermelhos ou amarelos, selecionados em populações F<sub>3</sub> foram chamados de Catuai Vermelho e Catuai Amarelo, respectivamente (Fazuoli, 1986). As distâncias genéticas entre ‘Caturra Vermelho’ e ‘Mundo Novo’ (0,27) e entre ‘Catuai Vermelho’ e ‘Mundo Novo’

(0,27) indicam que ao cruzar ‘Mundo Novo’ com ‘Caturra’ e selecionar para arquitetura compacta de planta, ocorreu uma maior incorporação de genes do ‘Caturra’ no germoplasma Catuai. Esta conclusão é reforçada pela distância genética menor entre Catuai e Caturra (0,18) quando comparada com a distância genética entre ‘Catuai’ e ‘Mundo Novo’ (0,27).

#### ‘Caturra Vermelho’ vs ‘Caturra Amarelo’

As cultivares Caturra Vermelho e Caturra Amarelo são muito semelhantes quanto as características morfológicas, somente distinguíveis pela cor do fruto. O germoplasma Caturra com suas diversas linhagens originou-se de uma mutação espontânea para arquitetura compacta (CtCt) de plantas de Bourbon Vermelho (ct ct) (Carvalho et al., 1991). Segundo Sera (1980), o germoplasma Bourbon Vermelho ainda mostra variabilidade genética para produtividade. O germoplasma Caturra apesar de muito semelhante morfológicamente mostrou uma herdabilidade de 0,03 para a produtividade entre as linhagens ‘Caturra Vermelho’ e ‘Caturra Amarelo’, o que indica que estes dois cultivares possuem variabilidade genética. Assim, a distância genética (0,18) entre ‘Caturra Vermelho’ e ‘Caturra Amarelo’ a qual é uma das menores entre os diversos acessos (Tabela 1, Figuras 1, 2) concorda com a variabilidade genética observada entre estes dois cultivares.



**Figura 1** - Dendrograma construído com método UPGMA a partir da distância de Nei (1978), mostrando o agrupamento das 14 variedades de *Coffea arabica*. Os números, em porcentagem, inseridos em cada nó, correspondem a proporção de réplicas similares geradas por 1000 permutações de bootstrap usando o programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses) version 1.3

**‘Colombia Amarelo’ vs cultivares ‘Colombia Amarelo’ e ‘Caturra Vermelho’**

A cultivar Colombia Amarelo resultou do cruzamento entre o “Híbrido de Timor” CIFIC 1343 e Caturra CIFIC 135 (Bertrand et al., 2000) sendo produto de uma mistura de várias linhagens que apresentavam resistência à ferrugem e semelhanças em importantes características agronômicas tais como produtividade, arquitetura de planta, qualidade e precocidade de maturação. A distância genética entre ‘Colombia Amarelo’ e ‘Caturra Amarelo’ (Tabela 1, Figuras 1 e 2) foi de 0,30, valor muito superior àquele observado entre ‘Caturra Vermelho’ e ‘Caturra Amarelo’ (0,18). Os cultivares Colombia Amarelo e Caturra Vermelho mostraram uma distância genética de 0,26. Deste modo, os valores de distância genética obtidos a partir dos marcadores RAPD, mostraram que a cultivar Colombia Amarelo difere consideravelmente das cultivares Caturra Amarelo e Caturra Vermelho e deve portanto ter incorporado mais genes do “Híbrido de Timor” CIFIC 1343 na seleção efetuada.

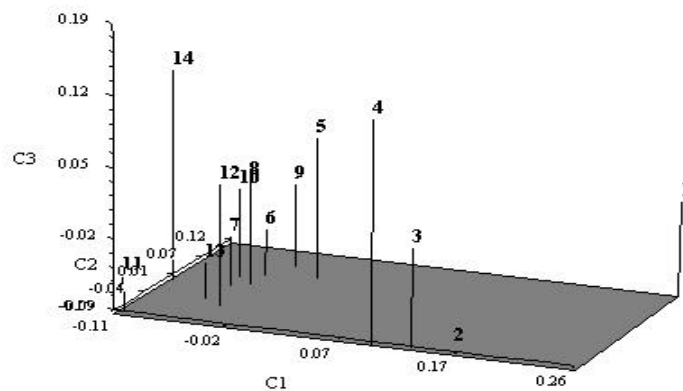
**‘Villa Sarchi’ vs ‘Sarchimor’ e ‘Caturra Vermelho’.**

Considerável polimorfismo foi encontrado entre genótipos derivados do germoplasma Sarchimor. As cultivares deste germoplasma (Sarchimor) são constituídas de diversas linhagens, com fatores para resistência a ferrugem  $Sh_6$ ,  $Sh_7$ ,  $Sh_8$ ,  $Sh_9$  e  $Sh?$ , selecionadas nas gerações  $F_3$  e  $F_5$  a partir dos cruzamentos entre *C. arabica* cv Villa Sarchi e “Híbrido Timor” CIFIC 832-2 (Bertrand et al., 2000). As distâncias genéticas (Tabela 1, Figura 1 e 2) entre o cultivar Villa Sarchi e as diferentes seleções de “Sarchimor”, IAPAR-77028 (0,17), IAPAR-59 ou IAPAR-77163-22 (0,18), Tupi (0,16), IAPAR-75163-21-10 (0,18), IAPAR-163-12 (0,26), Kattimor (0,21),  $F_1$  IAPAR-59 x Mundo Novo (0,24), e  $F_2$  IAPAR-59 x Mundo Novo (0,26) indicam que existem diferenças entre as seleções do germoplasma Sarchimor. Bertrand et al. (2000) coloca ‘Villa Sarchi’ como parte do germoplasma de ‘Caturra’. Porém, os resultados moleculares mostraram uma distância genética considerável entre Villa Sarchi e as médias das cultivares ‘Caturra Vermelho’ e ‘Caturra Amarelo’ (0,26). Estes resultados concordam com a menor distância genética observada entre as seleções do germoplasma Sarchimor e Villa Sarchi do que aquela observada com ‘Caturra Vermelho’ (Tabela 1, Figuras 1 e 2). A distância genética entre ‘Catuai Vermelho’ e ‘Caturra Vermelho’ (0,18) mostra que ‘Villa Sarchi’ e ‘Caturra Vermelho’, mutantes para CtCt (porte) ocorridos em cultivares diferentes, portanto apresentando portanto, um “background genético diferente.

**IAPAR-59 vs outras linhagens de “Sarchimor”, ‘Caturra’, ‘Catuai’ e ‘Mundo Novo’.**

As estreitas relações mostradas pelos dados moleculares entre ‘IAPAR-59’ e ‘IAPAR-77163-21-10’ (0,09), ‘IAPAR-59’ e ‘IAPAR-163-12’ (0,16), estão de acordo com as origens destas cultivares, sendo

que IAPAR-75163-12 é a que mais difere da IAPAR-59 (Tabela 1, Figuras 1 e 2). Todas estas cultivares originaram-se de progênies selecionadas do genoma Sarchimor IAC LC1669. ‘IAPAR-59’ mostrou uma distancia genética de 0,24 com ‘Caturra Vermelho’, 0,27 com ‘Catuai Vermelho’ e 0,33 com ‘Mundo Novo’. Isto mostra que ‘IAPAR-59’ é muito diferente destas cultivares especialmente no que diz respeito a Mundo Novo, o que indica que existe um grande potencial para obtenção de híbridos e linhagens superiores, a partir de cruzamentos efetuados entre estas cultivares.



**Figura 2** - Coordenada Principal mostrando as associações entre as 14 variedades de *C. arabica*. Os números correspondem aqueles citados da Tabela 1.

### **Kattimor vs ‘Colombia Amarelo’ e linhagens de Sarchimor**

O cultivar Kattimor é de origem desconhecida. Os dados de RAPD e características morfológicas indicam que provavelmente esta cultivar é o resultado de uma mistura das melhores plantas das cultivares IAPAR-75163-12 (0,15), IAPAR-75163-21-10 (0,14), IAPAR-59 (0,14) e de plantas derivadas do cruzamento natural com algumas plantas de Catuai Vermelho. ‘Kattimor’ tem arquitetura compacta de planta e resistência à ferrugem em 80% de suas plantas, o que indica que pode ter sido cruzado com plantas de ‘Catuai’ existentes nas proximidades. Os dados moleculares (Tabela 1, Figura 1 e 2) mostraram que ‘Kattimor’ tem mais genes do germoplasma Sarchimor em relação ao germoplasma Catimor pois a

distância genética foi maior com ‘Colombia amarelo’ (0,22) de “Catimor” do que com os cultivares IAPAR-59 (0,14), IAPAR75163-21-10 (0,14), e IAPAR-575163-12-10 (0,15) de Sarchimor.

### **‘Mundo Novo’ vs F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> de ‘IAPAR-59’ x ‘Mundo Novo’**

A cultivar Mundo Novo mostrou a maior distância genética com as demais cultivares estudadas (Tabela 1, Figuras 1 e 2) o que indica uma maior possibilidade de heterose ou recombinação superior de hibridação entre Mundo Novo e IAPAR-59 e outras seleções do germoplasma. Sarchimor (IAPAR75163-21-10, IAPAR75163-12, Kattimor e Tupi). A possibilidade de que marcadores de RAPD possam demonstrar uma melhor performance e heterose foi demonstrada em 43 híbridos de Arroz por Xiao et al. (1996). A performance do F<sub>1</sub> IAPAR-59 x Mundo Novo tem confirmado esta melhor possibilidade de heterose de linhagens de “Sarchimor” com o ‘Mundo Novo’. Este híbrido vem apresentando heterose de cerca de 25% (Sera, comunicação pessoal), distância genética de 0,33. A F<sub>2</sub> de ‘IAPAR-59’ x ‘Mundo Novo’ ainda com metade da heterose observada em F<sub>1</sub> mostrou uma distância genética de 0,41 com ‘Mundo Novo’ e de 0,16 com ‘IAPAR-59’ (Tabela 1, Figuras 1 e 2), mostrando que na recombinação há uma maior incorporação de genes do ‘IAPAR-59’.

## **CONCLUSÕES**

A técnica de RAPD associada a digestão prévia do DNA com enzimas de restrição Bam HI, Eco RI e Hae III mostrou-se eficiente na detecção de polimorfismos entre cultivares relacionados com e sem os genes de *C. canephora*.

Foi possível determinar a origem da cultivar Kattimor. Este acesso é uma multi-linha composta em diferentes proporções de ‘IAPAR-59’, ‘IAPAR-75163-21’, ‘IAPAR-75163-12’ e o cruzamento natural com plantas de ‘Catuai Vermelho’.

A cultivar Mundo Novo mostrou uma maior distância genética com o ‘IAPAR-59’ e com as demais cultivares. Estes resultados mostram que cruzamentos com ‘Mundo Novo’ possivelmente fornecerão híbridos com uma boa performance e heterose. As cultivares Villa Sarchi e ‘Caturra Vermelho’ mostrou diferenças consideráveis enquanto a cultivar Catuai, originada do cruzamento entre ‘Caturra’ e ‘Mundo Novo’ assemelha-se mais com a ‘Caturra’. As cultivares Caturra Vermelho e Caturra Amarelo são geneticamente diferentes, o mesmo se verificando em relação a cultivar Colombia Amarelo e Caturra Amarelo.



A linhagem IAPAR-75163-12 é a mais distinta entre as linhagens irmãs do IAPAR-59 e IAPAR-75163-21-10 e o F1 e F2 de 'IAPAR-59' cruzado com 'Mundo Novo' tende a assemelhar-se geneticamente mais a 'IAPAR-59' do que a 'Mundo Novo'.

**Agradecimentos** - Os autores agradecem ao Consórcio Brasileiro do Café, CNPq e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTRAND, B.; ETIENNE, H.; SANTACREO, R.; ANZUETO, F.; ANTHONY, F. El Mejoramento Genetico en America Central. **Anais** III Seminario Internacional sobre Biotecnologia na Agricultura cafeeira, p. 237 – 243, 1999.
- CARVALHO, A.; MEDINA-FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO-FILHO, O. E LIMA, M.M.A. Aspectos Genéticos de Cafeeiro. **Ver. Brasil. Genet.** 14: 135-183, 1991.
- 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.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 2000. 172 pgs.
- LASHERMERS, P.; CROS, J.; MARMEY, P. E CHARRIER, H. Use of random amplified DNA markers to analyse genetic variability and relationships of coffea species. **Genetic Resources and Crop Evolution** 40: 91-99. 1993.
- SERA, T. **Estimação de componentes de variância e do coeficiente de determinação genotípica da população de grãos de café (C. arabica L.).** Dissertação de mestrado, ESALQ-USP, 1980. 62 pgs.
- WESH, J.; MC CLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, 18: 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J. A. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18: 6531-6535, 1990.