

## CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS COMERCIAIS DE CAFÉ ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES

Milene **SILVESTRINI**, Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica/ IAC ; Mirian P. **MALUF**, Centro de Café e Plantas Tropicais/ IAC ; Luciana M. de Campos **RUGGIERO**, Centro de Café e Plantas Tropicais/ IAC; Oliveiro **GUERREIRO-FILHO**, Centro de Café e Plantas Tropicais/ IAC; Carlos A. **COLOMBO**, Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica/IAC, ccolombo@cec.iac.br

**RESUMO:** Estudos sobre a diversidade genética de espécies com finalidade de melhoramento genético representam importante preocupação dos melhoristas. Diversas técnicas moleculares têm permitido revelar uma diversidade genética presente no genoma que até então era desconhecida pelos cientistas. Muitas espécies de interesse agrônomo têm sido alvo de estudos que abordam a diversidade genética em nível molecular. De uma maneira geral, os resultados obtidos a partir do uso dos marcadores têm sido bastante satisfatórios, principalmente para aquelas espécies que apresentam ampla base genética e insuficiente número de descritores botânicos para diferenciação de genótipos, como é o caso da mandioca. A base genética formada pelos cultivares de *C. arabica*, principal espécie cultivada, é considerada estreita. Em relação ao Brasil, principal produtor mundial desta cultura, a própria história explica em parte a ausência de variação genética nos materiais atualmente em cultivo. Historicamente, as primeiras plantações de café formaram-se há mais de dois séculos a partir de poucas plantas, constituindo material muito uniforme e de pouca variabilidade genética. De fato, estudos sobre a diversidade genética de cafeeiros em cultivo realizados no IAC utilizando descritores botânicos e agrônômicos têm revelado baixo nível de variação genética entre as diferentes linhagens que compõem um cultivar. Entre diferentes cultivares esta variação é mais notória, não tão acentuada como se pensava, mesmo quando diferentes espécies participam da genealogia destes cultivares. Desta maneira, este trabalho teve como objetivo principal a avaliação das técnicas de RAPD e AFLP para a identificação e caracterização de diversas linhagens comerciais de *C. arabica* selecionadas pelo IAC. Os resultados obtidos com estes marcadores confirmam os dados obtidos anteriormente de que a variabilidade genética entre as linhagens é pequena. Além disso, os dados sugerem que a técnica de RAPD não é eficiente para a identificação e determinação da distância genética entre as linhagens avaliadas, apesar de representar uma ferramenta adequada para avaliação da variabilidade no cafeeiro. No entanto, embora o nível de variação observado através dos marcadores moleculares seja baixo, sabe-se que estas linhagens apresentam comportamento agrônomo bastante diferenciado. Isso nos leva a pensar que poucos genes diferenciam os principais materiais genéticos de cafeeiro de importância agrônoma e que o uso de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética e localização de genes de interesse agrônomo deve ser repensada.

**ABSTRACT :** A major concern of plant geneticists is the determination of genetic diversity available in populations for genetic improvement. Molecular techniques have been developed in order to access this genetic variability at the molecular level, and so far have been used to characterize several species of agronomic interest. The use of molecular markers has been particularly efficient in the differentiation of genotypes from plant species that present a wide genetic background but an insufficient number of botanical descriptors, such as cassava and coffee. The cultivars of *Coffea arabica*, the major cultivated species, have a narrow genetic base. In Brazil, the small genetic variability can be explained historically by the fact that few individual plants were first introduced and bred in order to establish the cultivated population. Recent analysis using botanic and agronomic descriptors carried out at IAC demonstrated that there is small genetic variation among inbred lines of the cultivars. Besides this, the results indicated that the variation among different cultivars is not so large as expected, even in cases such as cultivars originated from interspecific hybrids. These results may also indicate that this type of analysis is not efficient for determination of genetic variability in *Coffea*. The present work has the main objective of evaluating the technique of RAPD to characterize and identify different commercial lines of *C. arabica* developed by IAC. Results obtained with RAPD markers, tested in 14 different lines, confirmed the previous results of small genetic variability among the lines. Also, the results suggest that this methodology is not efficient for identification and phylogeny

purposes, although it can be used for determination of genetic variability in coffee. However, even though the level of genetic variation detected with this type of marker is low, it is well known that those lines have a very distinct agronomic performance, indicating the existence of genetic variability. Therefore, we suggest that maybe few genes are related with the differentiation of coffee cultivars, and then the use of molecular markers as tools for the identification and location of involved genes may be reconsidered.

**PALAVRAS-CHAVE:** café, marcadores moleculares, variabilidade genética

## INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas no mundo, sendo produzido por mais de 70 países. O Brasil, a Colômbia e a Indonésia são responsáveis por cerca de 50% da produção mundial. Ao longo de 65 anos de pesquisas voltadas para o melhoramento genético do cafeeiro, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) acumulou importante germoplasma desta cultura. Diversos cultivares foram selecionados e vêm sendo cultivados não apenas no Brasil, como também em vários países cafeicultores. O BG de *Coffea* do IAC tem sido mantido e caracterizado através dos métodos tradicionais, tais como avaliação de características morfológicas (altura de planta, tamanho e cor de folhas, frutos e sementes) e agrônomicas (produtividade, resistência a pragas e doenças, qualidade de bebida). No entanto, esse tipo de avaliação tem se mostrado insuficiente para caracterizar os recursos genéticos disponíveis. Essa limitação é em parte devida a características da biologia do cafeeiro, tais como ciclo de vida longo, baixa variabilidade genética das espécies de interesse comercial, e em parte também devido a dificuldades de manutenção e conservação de algumas espécies recalcitrantes para cultivo *in vivo*. Os marcadores moleculares têm se mostrado uma alternativa eficiente para se conhecer e acessar a variabilidade genética, e vêm sendo utilizados em programas de melhoramento de diversas espécies vegetais de interesse para agricultura (Rafalski et al., 1993).

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo preliminar a caracterização inicial de algumas linhagens comerciais de *Coffea arabica* selecionadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Brasil, através da técnica de RAPD. Com estes resultados pretende-se avaliar o potencial desta metodologia para identificação de cultivares e linhagens, determinação da variabilidade genética disponível e estimativa de similaridade genética.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Germoplasma** – Foram selecionadas 12 linhagens comerciais de *Coffea arabica* do IAC (Mundo Novo 501-5, Mundo Novo 515, Mundo Novo 376-4, Acaiá 474-19, Catuaí Amarelo -74, Catuaí Vermelho -81 e -99, Bourbon Amarelo 18 e Icatu Vermelho 4040 e 4042).

**Métodos** – Para cada linhagem foram coletadas ao acaso folhas jovens de plantas em campos experimentais do IAC. O DNA foi extraído de acordo com Agwanda *et al.*, 1997. Para as reações de PCR foram utilizados 40 ng de DNA. Os primers utilizados pertencem aos kits A, G, H e X da Operon Technology. Para a reação de PCR foram utilizados 1mM de dNTP, 2 M de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M de primers, 1X tampão de reação e 0,25 U de Taq Polymerase. A reação foi repetida 45 vezes nas seguintes condições: 1min a 94°C, 45seg a 35°C e 1,5 min a 72°C. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% e analisados para determinação de tamanho através do *software* ImageMaster TotalLab (Pharmacia).

Para a análise de polimorfismos foram consideradas apenas bandas com boa qualidade de amplificação. O polimorfismo foi avaliado com relação à presença/ausência de bandas semelhantes nos diferentes genótipos. Os dados gerados foram avaliados pelos *softwares* NTSYS e Estatística para construção da matriz, análise de similaridade genética e construção do dendograma.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 80 primers foi testado. Destes, 27 apresentaram polimorfismos entre as linhagens, e amplificaram um total de 178 bandas, sendo 94 polimórficas. De maneira geral, o polimorfismo encontrado entre linhagens de um mesmo cultivar é pequeno. Este resultado confirma o fato de que a variabilidade genética de populações selecionadas de *C. arabica* é baixa. A análise de coordenadas principais mostra que as linhagens avaliadas são similares do ponto de vista genético. Por esta análise somente linhagens que resultaram da seleção de híbridos entre *C. arabica* e *C. canephora*, como é o caso de Obatã e Icatu Vermelho 4040 e 4042, podem ser claramente diferenciadas geneticamente. As outras linhagens de Mundo Novo, Catuaí Vermelho e Amarelo, Acaiá e Bourbon Amarelo são todas seleções de populações de *C. arabica*, portanto com origem genética comum e pouco variável. Um ponto interessante a ser observado é o polimorfismo encontrado entre 2 amostras da linhagem Bourbon Amarelo, sugerindo que ainda existe variabilidade genética

dentro desta linhagem. A provável origem botânica do BA é o cruzamento espontâneo entre os cultivares arábica Bourbon Vermelho e Amarelo de Botucatu (Típica amarelo), semelhante à origem de linhagens de Mundo Novo e Acaiaí. No entanto, a variabilidade dentro de linhagens não foi observada em outras amostras. Uma possível explicação seria o fato de que linhagens de BA não sofreram seleção tão intensa quanto as de MN, e portanto ainda apresentam variabilidade para ser explorada.

Baseado nos resultados apresentados pode-se afirmar que a técnica de RAPD não é eficiente para separação e identificação de linhagens de arábica. No entanto, a metodologia é indicada para avaliação da variabilidade genética presente em cultivares de arábica. Portanto, a identificação de marcadores associados com características de interesse agrônomo, necessita de técnicas mais sensíveis para detectar polimorfismos, tais como AFLP e microsátélites.

## CONCLUSÃO

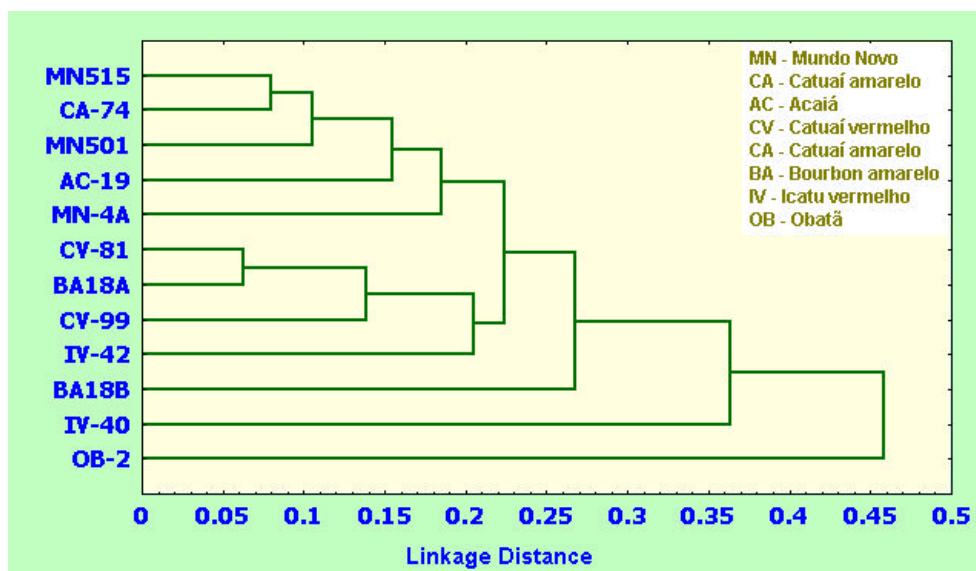
Pelos resultados obtidos até o presente pode-se sugerir que a metodologia de RAPD não é indicada para a identificação precisa das linhagens comerciais de *Coffea arabica* selecionadas pelo IAC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGWANDA, C.; Lashermes, P.; Trouslot, P.; Combes, M.C.; Charrier, A. 1997. **Euphytica**, 97: 241-248.

CARVALHO, A.; Medina-Filho, H.P.; Fazuoli, L.C.; Guerreiro-Filho, O.; Lima, M.M.A. 1991. **Rev. Brasil. Genet.**, 14(1): 135-183

RAFALSKY, J.A.; Tingey, S.V. 1993. **Trends Genet.** 9: 275-280.



Representação de 12 linhagens de café baseada no método de agrupamento (UPGMA) e de índices de similaridade genética obtidos por marcadores RAPD.