

USO DE MARCADORES RAPD NO ESTUDO DE VARIABILIDADE EM CLONES DE *Coffea canephora* VAR. CONILLON¹

Dalza G. SILVA - UFV; Laércio ZAMBOLIM - UFV; Ney S. SAKIYAMA - UFV (sakiyama@mail.ufv.br); Cássia C.H. SAKIYAMA - UFV; Aymbiré F. A. FONSECA - EMCAPER; Antonio A. PEREIRA - EPAMIG; Terezinha A. TEIXEIRA - UFV

RESUMO: Avaliou-se quatro repetições de 12 clones que apresentaram variabilidade de reação à *H. vastatrix*. Oito indivíduos dos clones 03 e 07 foram analisados quando inoculados com as raças I, II, III e XIII. Selecionou-se também, cinco clones que apresentaram reação uniforme quando inoculados com quatro raças do patógeno, totalizando 76 indivíduos. Pelo método de agrupamento de Tocher, os 76 indivíduos formaram 16 grupos. As quatro repetições de cada clone formaram grupos distintos, entretanto, o indivíduo 21, correspondente à repetição I do clone 104-A, formou isoladamente o grupo 16, mostrando-se divergente dos demais. Os clones 104-A e 104-B formaram um grupo, e os clones 110-A e 110-B, outro grupo, indicando que são muito próximos geneticamente. Os primers utilizados não foram capazes de detectar diferenças entre os clones quando se considera o ciclo de maturação, da mesma forma que não foi possível observar diferenças intraclones. Por meio de marcadores RAPD, não foi possível detectar diferenças intraclones da variedade Conillon que apresentaram instabilidade de reações a *H. vastatrix*. Da mesma forma, não foi possível diferenciar clones de diferentes ciclos de maturação. A técnica de RAPD foi eficaz no estudo de variabilidade genética em *C. canephora*.

PALAVRAS-CHAVE: RAPD, clones, *C. canephora*, Conillon, variabilidade genética.

ABSTRACT: Four replication of 12 clones that showed reaction variability for *H. vastatrix* were evaluated. Eight plants of the clones 03 and 07 were analyzed when inoculated with the races I, II, III and XIII. It was also selected five clones that showed uniform reaction when inoculated with four races of the pathogen, giving a total of 76 plants. By the Tocher method of agroupment, 16 groups were formed. The four replications of each clone formed distinct groups; however, the plant clone 21 that belongs to the replication I of the clone 104-A, formed one isolated group (16), showing that it was different from the others. The clones 104-A and 104-B formed one group, and the clones 110-A and 110-B another, indicating that they are genetically very close. The primers utilized were not able to detect differences between the clones when we analyzed the maturation cycle. Also, it was not possible to detect intraclones differences. By the use of RAPD markers, it was not possible to detect intraclones differences of the variety Conillon that showed instability of reactions to *H. vastatrix*. In the same way, it was not possible to differentiate clones of different maturation cycles. The RAPD techniques was efficient to study genetic variability in *C. canephora*.

INTRODUÇÃO

A variedade Conillon de *C. canephora*, contribui com mais de 70% do café produzido no estado do Espírito Santo, correspondendo a 80% da produção brasileira, colocando o Brasil como segundo maior produtor mundial deste produto (MATIELLO, 1998). Entretanto, apesar da importância sócio-econômica do café Conillon para este Estado, a produtividade das lavouras formadas por mudas oriundas de sementes é baixa (aproximadamente 7 sc. benef./ha) devido à alta variabilidade genética entre as plantas, em consequência da alogamia e auto incompatibilidade gametofítica dessa espécie (BRAGANÇA *et al.*, 1993). Por esta razão, a Empresa Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, por meio de seleção de clones, lançou três variedades clonais, 'EMCAPA 8111', 'EMCAPA 8121' e 'EMCAPA 8131', de ciclo de maturação precoce, médio e tardio, constituídas de 10, 15 e 14 clones, respectivamente. Resultados preliminares do presente trabalho demonstraram que essas variedades clonais são compostas por clones resistentes e suscetíveis às raças I, II, III e XIII de *H. vastatrix*. Observou-se, ainda, variabilidade de reações entre repetições de alguns clones quando inoculados com as respectivas raças fisiológicas de *H. vastatrix*. O uso de marcadores RAPD tem sido proposto como técnica eficiente em cafeeiros, no estudo de diversidade genética, como demonstram os trabalhos de OROZCO-CASTILLO *et al.* (1994, 1996) e LASHERMES *et al.* (1996a), assim como na construção de mapa genético para *C. canephora* (PAILLARD *et al.*, 1996). O presente estudo teve como objetivo a análise da variabilidade inter e intraclones de *C. canephora* var. Conillon por meio de marcadores RAPD.

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

MATERIAL E MÉTODO

Foram avaliados quatro plantas de 12 clones de *C. canephora* (02, 139, 03, 07, 11, 14, 100, 104-A, 104-B, 110-A, 153 e 201) que apresentaram, em testes preliminares, variabilidade de reação quando inoculados com as raças I, II, III e XIII de *H. vastatrix*. Oito indivíduos dos clones 03 e 07 foram analisados quando inoculados com as raças I, II, III e XIII. Os clones 36, 45, 46, 109-A, 110-B, que apresentaram reação uniforme quando inoculados com as quatro raças do patógeno, também com quatro repetições, foram utilizados como padrão, totalizando 76 plantas. Foi utilizada a técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) proposta por WILLIAMS *et al.* (1990) com algumas modificações. Foram utilizados 14 primers de 10 nucleotídeos (Quadro 1) da “Operon Technology”. O experimento foi executado com duas repetições. Os marcadores obtidos foram avaliados pela presença (1) e ausência (0) das bandas de DNA homólogas entre as plantas avaliadas. Os dados foram analisados e uma matriz de similaridade genética foi obtida. Foi realizado uma análise por agrupamento dos indivíduos de cada clone utilizando o programa estatístico GENES (CRUZ & REGAZZI, 1994) baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard e no método de agrupamento de Tocher.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 20 primers utilizados, 14 geraram 29 bandas polimórficas consistentes, ou seja, geradas em ambas repetições das reações de amplificação. Em média, cada primer gerou dois loci polimórficos. As plantas geneticamente próximas foram agrupadas, utilizando-se o método de agrupamento de Tocher, baseando-se na distância de similaridade de Jaccard. Cada grupo é estabelecido nesta técnica, adotando-se o critério em que a distância média intragrupo é inferior a qualquer distância intergrupo, de tal forma que existe homogeneidade dentro e heterogeneidade entre grupos. Pelo método de agrupamento de Tocher (Quadro 2), foi possível agrupar as 76 plantas da var. Conillon, pertencentes a 17 clones, em 16 grupos, sendo que cada clone formou um grupo, porém a planta 21, correspondente à repetição I do clone 104-A, formou isoladamente, o grupo 16. Essa diferença foi causada por nove loci polimórficos, com presença de bandas na planta 21 e ausência nas demais repetições e por um locus com presença de banda na planta 21, porém ausentes nos demais indivíduos desse clone. Sugere-se a hipótese de que essa planta seja oriunda de uma quimera setorial do clone 104-A ou misturas. Os clones 104-A e 104-B formaram um único grupo, e os clones 110-A e 110-B, outro grupo. No entanto, com relação aos clones 104-A e 104-B, que pertencem à variedade EMCAPA 8111, de ciclo de maturação precoce, quando inoculados com as raças fisiológicas de *H. vastatrix*, apresentaram reação diferenciada. Quando inoculados com as raças I e XIII, mostraram-se como resistentes, e com a raça III, suscetíveis. Porém, quando inoculados com a raça II, o clone 104-A mostrou-se suscetível e o 104-B, resistente. Com relação aos clones 110-A e 110-B, ambos foram igualmente suscetíveis às quatro raças do patógeno, porém, o clone 110-A pertence à variedade precoce EMCAPA 8111 e o clone 110-B à variedade de ciclo de maturação intermediária, EMCAPA 8121. O dendrograma reuniu os clones em três grupos. Analisando o dendrograma (Figura 1), com base nas porcentagens de similaridade, observa-se que há 60% de distância genética estimada, as plantas analisados formaram três grupos. O primeiro, grupo A, com dezesseis indivíduos representando quatro clones (109-A, 36, 46 e 45); o segundo, grupo B, com 35 indivíduos representando oito clones (11, 07, 201, 153, 110-B, 110-A, 104-B e 104-A), e o terceiro, grupo C, com 25 indivíduos representados por cinco clones (02, 139, 03, 14, 100 e um indivíduo do clone 104-A). Constatou-se que RAPD é uma técnica muito eficaz na avaliação da variabilidade genética em *C. canephora*. Os resultados desse experimento mostram a diversidade entre os clones da variedade Conillon e a homogeneidade intraclones dessa variedade, não demonstrando variação somaclonal ou misturas de plantas, com exceção do clone 104-A. Porém, a variação nos tipos de reações apresentados, quando inoculados com as raças de *H. vastatrix*, pode ser causada por genes não ligados a esses marcadores, localizados em regiões não amplificadas do genoma.

CONCLUSÕES

A técnica de RAPD foi eficaz no estudo de variabilidade genética em *C. canephora*. Por meio de marcadores RAPD, foi possível observar a variabilidade entre os clones da variedade Conillon, porém, não foi possível detectar diferenças intraclones que apresentaram instabilidade de reações a *H. vastatrix*, não demonstrando variação somaclonal ou misturas de plantas, com exceção do clone 104-A. Da mesma forma, não foi possível diferenciar clones de diferentes ciclos de maturação. A variação nos tipos de reações apresentados, quando inoculados com as raças de *H. vastatrix*, pode ser causada por genes não ligados a esses marcadores, localizados em regiões não amplificadas do genoma. A resistência de clones da variedade Conillon à ferrugem do cafeeiro deve ser estudada mais detalhadamente, com vistas à obtenção de clones com maior nível e durabilidade de resistência. A continuidade de estudos nesta linha de pesquisa é de fundamental

importância para a elucidação desse fenômeno de variabilidade de reações. Um maior número de primers e de clones deve ser utilizado em estudos futuros.

Código do primer	Seqüência de nucleotídeos
OPA-01	5' CAGGCCCTTC 3'
OPA-07	5' GAAACGGGTG 3'
OPA-09	5' GGGTAACGCC 3'
OPA-10	5' GTGATCGCAG 3'
OPA-18	5' AGGTGACCGT 3'
OPB-05	5' TCGGCCCTTC 3'
OPB-12	5' CCTTGAGGCA 3'
OPE-20	5' AACGGTGACC 3'
OPH-04	5' GGAAGTCGCC 3'
OPJ-01	5' CCCGGCATAA 3'
OPJ-04	5' CCGAACACGG 3'
OPJ-05	5' CTCCATGGGG 3'
OPJ-06	5' TCGTTCGCA 3'
OPK-02	5' GTCTCCGCAA 3'

Quadro 1 - Seqüência de nucleotídeos de 14 primers que geraram padrões de polimorfismo entre os 76 indivíduos de *C. canephora* analisados

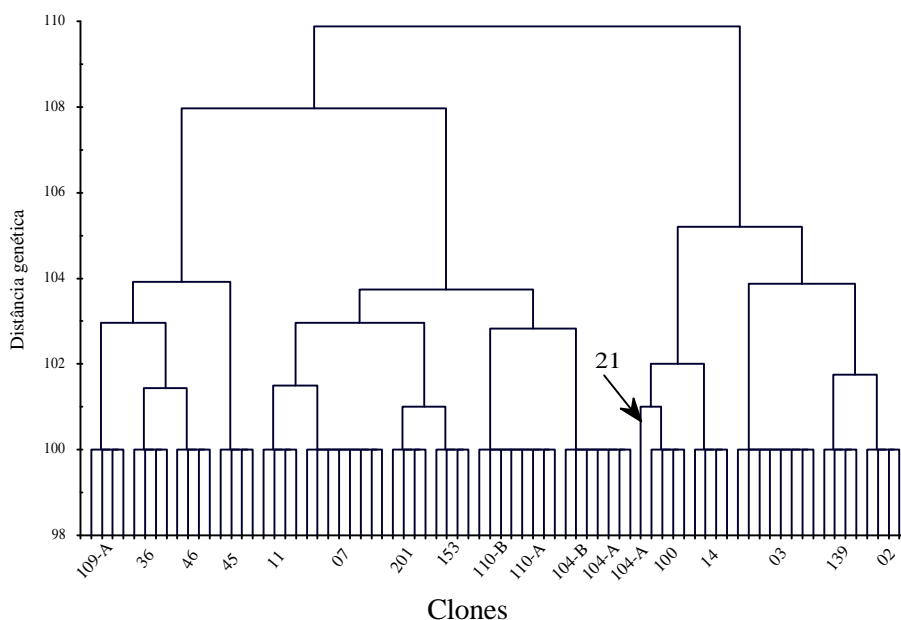


Figura 1- Dendrograma representando distâncias genéticas, estimadas entre 76 indivíduos de 19 clones de *Coffea canephora* var. Conillon e baseadas em 29 marcadores polimórficos RAPD, gerados por 14 primers de 10 oligonucleotídeos.

Grupo	Indivíduos/Clones
1	1, 2, 3, 4 (clone02)
2	5, 6, 7, 8 (clone 139)
3	9, 10, 11, 12, 33, 34, 35, 36 (clone 03)
4	13, 14, 15, 16 (clone 14)
5	17, 18, 19, 20 (clone 100)
6	22, 23, 24 (clone 104-A); 45, 46, 47, 48 (clone 104-B)
7	25, 26, 27, 28 (clone 153)
8	29, 30, 31, 32 (clone 201)
9	37, 38, 39, 40, 49, 50, 51, 52 (clone 07)
10	41, 42, 43, 44 (clone 11)
11	53, 54, 55, 56 (clone110-A); 73, 74, 75, 76 (clone 110-B)
12	57, 58, 59, 60 (clone 45)
13	61, 62, 63, 64 (clone 46)
14	65, 66, 67, 68 (clone 36)
15	69, 70, 71, 72 (clone 109-A)
16	21(repetição I, clone 104-A)

Quadro 2- Agrupamento de indivíduos da variedade Conillon de *Coffea canephora* pelo método de Tocher.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAGANÇA, S.M., FONSECA, A.F.A., SILVEIRA, J.S.M., FERRÃO, R.G., CARVALHO, C.H.S. **EMCAPA 8111, EMCAPA 8121, EMCAPA 8131. Primeiras variedades clonais de café conillon lançadas para o Espírito Santo.** Vitória, ES: EMCAPA, 1993. (Comunicado técnico, 68).
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Viçosa, MG: UFV, 1994. p.299-302.
- LASHERMES, P., TROUSLOT, P., ANTHONY, F., COMBES, M.C., CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, v.87, p.59-64. 1996.
- MATIELLO, J.B. **Café conillon.** Rio de Janeiro, MMA/SDR/PROCAFÉ/PNFC, 1998. 162p.
- OROZCO-CASTILLO, C., CHALMERS, K.J., POWELL, W., WAUGH, R. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. **Plant Cell Reports**, v.15, p.337-341, 1996.
- PAILLARD, M., LASHERMES, P., PÉTIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.41-47, 1996.
- WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, L.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.