



ANÁLISE MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DAS CULTIVARES DE CAFÉ DO IFES CAMPUS DE ALEGRE

Fernanda Vargas Valadares¹, Raiane Mariani Santos¹, Iris Petronilia Dutra², José Dias de Souza Neto³, Monique Moreira Moulin⁴.

¹Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal do Espírito Santo *Campus* de Alegre.

²Graduada em Tecnólogo em Cafeicultura do Instituto Federal do Espírito Santo *Campus* de Alegre.

³ Técnico Mestre do Instituto Federal do Espírito Santo *Campus* de Alegre.

⁴ Professora Doutora do Instituto Federal do Espírito Santo *Campus* de Alegre, Brasil. Email: moniquemoulin@gmail.com

Recebido em: 08/04/2016 – Aprovado em: 30/05/2016 – Publicado em: 20/06/2016

DOI: 10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2016_008

RESUMO

O café é uma das espécies mais cultivadas e comercializadas do mundo. O estudo morfoagronômico e molecular é muito útil para análise da diversidade genética, sendo importante para o conhecimento e uso da cultura. Os objetivos do presente trabalho foram: i) realizar a caracterização morfoagronômica e por intermédio desta estimar a divergência genética de cultivares de café, e ii) selecionar o método de extração de DNA mais eficiente e os iniciadores adequados para a caracterização molecular das cultivares de café. A pesquisa foi realizada nas lavouras de café do Parque Cafeeiro do Ifes *Campus* de Alegre, com oito cultivares, sendo cinco arábicas (*C. arabica* L.) e três conilon (*C. canephora* P.). As cultivares foram caracterizadas por descritores morfoagronômicos específicos para o gênero *Coffea*. Para as análises moleculares de DNA foram testados cinco protocolos de extração, e após escolha do protocolo adequado, foi realizada triagem com dez ISSR com o intuito de averiguar o polimorfismo gerado. As análises estatístico-genéticas das características morfoagronômicas quantitativas foram realizadas com auxílio do programa Genes e o agrupamento obtido pelo método UPGMA. Para as análises moleculares, foi realizado ANOVA das concentrações de DNA seguida pelo teste F. Para os caracteres quantitativos foi observada uma boa divergência genética. Na análise qualitativa foi constatado um baixo número de classes, o que evidencia uma alta uniformidade das cultivares para os caracteres avaliados. Três protocolos de extração de DNA apresentaram boas concentrações de DNA, e foram selecionados cinco iniciadores com melhores perfis eletroforéticos e bandas de DNA mais nítidas.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea*. Diversidade genética. Parque Cafeeiro.

ANALYSIS OF MOLECULAR AND MORPHOAGRONOMIC IFES GAY CAMPUS COFFEE CULTIVARS

ABSTRACT

Coffee is one of the most cultivated species and marketed the world. The morfoagronômico and molecular study is very useful for analysis of genetic diversity is important for the knowledge and use of culture. The objectives of this study were: i) perform morfoagronomic and through characterization of this estimate the genetic divergence of coffee cultivars, and ii) select the most efficient DNA extraction method and primers suitable for the molecular characterization of coffee cultivars . The survey was conducted in coffee plantations of the Coffee Park IFES *Campus Alegre* with eight cultivars, five Arabica (*Coffea arabica* L.) and three conilon (*C. canephora* P.). The cultivars were characterized by specific morphological descriptors for the genus *Coffea*. For the molecular analysis of DNA were tested five extraction protocols and after selecting the appropriate protocol, screening was performed with ten ISSR in order to ascertain the generated polymorphism. The statistical-genetic analysis of quantitative morphological characteristics were performed using the program Genes and the group obtained by the UPGMA method. For molecular analysis, ANOVA was performed of DNA concentrations followed by F test for the quantitative traits a good genetic divergence was observed. Qualitative analysis was found a low number of classes, which shows a high uniformity of the cultivars for the traits. Three DNA extraction protocols showed good DNA concentrations, and we selected five primers best electrophoretic profiles and sharper DNA bands.

KEYWORDS: *Coffea*. Genetical diversity. Coffee Park.

INTRODUÇÃO

O café é nativo das regiões tropicais da América do Sul, Ásia e África. Pertence ao gênero *Coffea* da família Rubiaceae. Este gênero é composto por cinco grupos distintos, porém apenas o grupo *Eucoffea* contém espécies que apresentam importância comercial, o *Coffea arabica* Linn (café arábica) e o *Coffea canephora* Pierre (café conilon) (RONCAL et al., 2015).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (JACOMINI et al., 2015), sendo que os estados de Minas Gerais e do Espírito Santo destacam-se como maiores produtores nacionais de café arábica e café conilon, respectivamente (FERRÃO et al., 2015).

O cafeeiro apresenta variabilidade em relação às características morfológicas de folhas, flores e frutos, aos caracteres agrônômicos, moleculares e bioquímicos, haploidia e reprodução (AGUIAR et al., 2004). Para um estudo a cerca da diversidade genética é importante uma análise das características morfoagronômicas e moleculares. A caracterização de café é de fundamental importância para o conhecimento e uso dos acessos (DIAS et al., 2015).

Os descritores morfoagronômicos e de DNA são utilizados para disponibilização de informações de cultivares e atuam de forma complementar. Estas duas técnicas aliam a descrição do fenótipo e do genótipo, respectivamente, possibilitando a distinção de fenótipos morfológicamente similares, mas geneticamente diferentes (HEALEY et al., 2014).

A caracterização morfoagronômica e molecular de cultivares de café são importantes porque a planta apresenta base genética estreita, sendo difícil e

complexa a discriminação fenotípica e a identificação de acessos específicos em um banco de germoplasma (DIAS et al., 2015).

O fundamento do melhoramento genético tradicional do cafeeiro é constituído pela seleção genética com base em dados fenotípicos avaliados em campo, tanto para definir novos cruzamentos a serem realizados, com o intuito de gerar novos genótipos, como na identificação dos melhores indivíduos a serem usados comercialmente (FERRÃO et al., 2015).

A extração de DNA para a caracterização molecular de cultivares de café é considerada complexa devido o cafeeiro ser uma planta sujeita a muita oxidação, principalmente nas folhas e nos frutos. Compostos fenólicos como o ácido 5-cafeoilquínico, também conhecido como ácido clorogênico (CGA), principal substrato da polifenoxidase (PFO) estão presentes em quantidades expressivas nesses tecidos e, em geral, prejudicam a extração de DNA (PEREIRA et al., 2009).

Os objetivos do presente trabalho foram: i) realizar a caracterização morfoagronômica e por intermédio desta estimar a divergência genética de cultivares de café presentes no Parque Cafeeiro do Ifes, *Campus* de Alegre, e ii) selecionar o método de extração de DNA mais eficiente e os iniciadores adequados para a caracterização molecular das cultivares de café.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada nas lavouras de café do Parque Cafeeiro do Instituto Federal do Espírito Santo (Ifes) - *Campus* de Alegre, com oito cultivares, sendo cinco arábicas (*C. arabica* L.) e três conilon (*C. canephora* P.) (Quadro 1). O Ifes *Campus* de Alegre fica localizado no município de Alegre, ES, Brasil, nas coordenadas geográficas de 20°45' 30" S e de 41° 27' 23" W.

QUADRO 1. Espécies e cultivares de cafés (*C. arabica* e *C. canephora*) do Parque Cafeeiro do Ifes, *Campus* de Alegre.

Espécie	Cultivar
<i>C. arabica</i>	'Catuaí amarelo'
<i>C. arabica</i>	'Catuaí vermelho'
<i>C. arabica</i>	'Obatã'
<i>C. arabica</i>	'Topázio'
<i>C. arabica</i>	'Tupi'
<i>C. canephora</i>	'Robustão'
<i>C. canephora</i>	'Robusta Tropical'
<i>C. canephora</i>	'Vitória'

Fonte: acervo pessoal dos autores, 2015.

Caracterização morfoagronômica

As cultivares foram caracterizadas por descritores morfoagronômicos essenciais específicos para o gênero *Coffea*, altamente discriminantes, que estão disponíveis em *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI, *Descriptors for Coffee*, 1996). Para a caracterização morfoagronômica as cultivares de café foram identificadas e coletadas no período de junho a agosto de 2015, e foram avaliadas seis repetições de cada cultivar. Foram utilizados doze descritores, sendo

cinco quantitativos e sete qualitativos multicategóricos, sendo analisados de acordo com a tabela abaixo (Quadro 2).

QUADRO 2. Descritores utilizados para caracterização morfoagronômica.

Descritor	Análise
Altura da planta (AP)	mensurado com trena metálica a maior altura da planta em m.
Comprimento da folha (CF)	mensurado com régua o maior comprimento da folha em cm.
Comprimento do pecíolo (CP)	mensurado com régua o maior comprimento do pecíolo em cm.
Diâmetro do caule (DC)	mensurado com paquímetro o maior diâmetro do caule em cm.
Largura da folha (LF)	mensurado com régua a maior largura da folha em cm.
Cor da folha jovem (CFJ)	Analisada de acordo com uma escala de notas: (1) verde-claro; (2) verde; (3) acastanhado; (4) castanho avermelhado; (5) bronze; (6) outros.
Cor da gema jovem (CGJ)	Analisada de acordo com uma escala de notas: (1) verde; (2) marrom-escuro; (3) outros.
Cor do pecíolo (COP)	Analisada de acordo com uma escala de notas: (1) verde; (2) marrom-escuro; (3) outros.
Dominância da pilosidade (DP)	Analisada de acordo com uma escala de notas: (1) dispersa; (2) intermediária; (3) densa.
Forma da folha (FF)	Analisada de acordo com uma escala de notas: (1) abóbada ; (2) ovalada; (3) elíptica ; (4) lanceolada; (5) outras.
Forma da folha de acordo com ápice (FFA)	Analisada de acordo com uma escala de notas: (1) redonda; (2) obtusa; (3) aguda; (4) aculeada; (5) apiculada; (6) espatulada; (7) outras.
Posição da inflorescência (PI)	Analisada de acordo com uma escala de notas: (1) axial; (2) terminal.

Fonte: acervo pessoal dos autores , 2015.

Análise Molecular

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Genética do Ifes *Campus* de Alegre no período de julho a outubro de 2015, conforme as etapas descritas abaixo.

Preparo Das Amostras

Folhas jovens, sadias e em fase ativa de crescimento foram coletadas logo nas primeiras horas da manhã. Isso porque as plantas mantidas no escuro

acumulam menor teor de polifenóis (MOSLEMI et al., 2013). As folhas correspondentes a cada cultivar de café foram enroladas em papel alumínio, identificadas e imediatamente mergulhadas em N₂ líquido para que não ocorresse a degradação do DNA. Uma vez no laboratório, este material foi macerado em nitrogênio líquido até formar um pó bastante fino.

Extração do DNA

Foi realizado um ensaio prévio de forma a selecionar o melhor tipo de acondicionamento do material vegetal e protocolo que apresentasse quantidade e pureza de DNA elevadas, devido à grande quantidade de polifenóis presentes nas folhas de café, que em geral, prejudica a extração. Para isso, foram selecionados cinco protocolos segundo busca em literatura científica (Tabela 1).

TABELA 1. Metodologias de extração de DNA e formas de armazenamento foliar utilizados em ensaio de qualidade e quantidade de DNA.

Código	Artigo	Armazenamento	Repetição
1	DOYLE E DOYLE (1990), modificado por Abdelnoor (1995)	C	1
			2
			3
		N	1
			2
			3
2	DOYLE E DOYLE (1990) modificado por IAC	C	1
			2
			3
		N	1
			2
			3
3	SERENO et al. (2006)	C	1
			2
			3
		N	1
			2
			3
4	HEALEY et al. (2014)	C	1
			2
			3
		N	1
			2
			3
5	PEREIRA et al. (2009)	C	1
			2
			3
		N	1
			2
			3

Fonte: acervo pessoal dos autores, 2015. (C= material congelado a -18°C/sete dias; N= folhas coletadas momentos antes extração).

Quanto ao material para extração, parte das folhas foram coletadas previamente, sendo armazenada em freezer -18°C por uma semana, e outra parte foi colhida momentos antes da extração, com o intuito de avaliar a influência da forma de armazenamento na extração de DNA. Cada tratamento consistiu de três repetições (protocolo x material), segundo Tabela 3. Foi escolhida a cultivar 'Catuaí amarelo' para o ensaio prévio de protocolos, devido sua divergência fenotípica nas condições de campo. A extração de DNA do protocolo 1 foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

1ª etapa - Cerca de 200 mg de tecido macerado foi transferido para tubos de 1,5 mL, sendo realizado de forma rápida para evitar oxidação;

2ª etapa - Foram adicionados aos tubos contendo as amostras, 700µL do tampão de extração pré-aquecido contendo CTAB 2%, NaCl 1,4 mol L⁻¹, EDTA 20 mmol L⁻¹, Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ (pH 8,0), PVP sólido 2% e β- mercaptoetanol 0,2%, estes dois últimos necessários para remoção dos compostos fenólicos;

3ª etapa - os tubos foram incubados em banho maria a 65°C por 30-40 minutos. Durante a incubação, os tubos foram suavemente homogeneizados a cada 10 minutos. O material foi colocado em temperatura ambiente durante um período de 20 minutos;

4ª etapa - Adicionou-se ao sobrenadante 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico. Os microtubos foram agitados por inversões suaves, por aproximadamente 5 minutos até ficar turvo. A fase orgânica foi separada por centrifugações por 5 minutos a 14.000 rpm;

5ª etapa - Procedeu-se a transferência da fase superior (aquosa) para um novo tubo devidamente identificado, tendo cuidado de não transferir a interfase e a fase inferior (foi transferido aproximadamente 350µL);

6ª etapa - Foi adicionado isopropanol gelado ao sobrenadante. Inversões suaves foram realizadas e o material incubado a -20°C, por 2 a 3 horas;

7ª etapa - O material foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm, sendo removido o sobrenadante. O precipitado resultante foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 30 minutos; 8ª etapa - O precipitado foi ressuspense em 200 µL de tampão de extração contendo RNase na concentração final de 40mg/mL, e em seguida, incubado em banho maria a 37°C por uma hora e meia. Ao final deste passo o DNA está ressuspense na solução.

As condições de extração para os protocolos 2, 3, 4 e 5 seguiram da mesma forma descrita para o ensaio do protocolo 1, com as seguintes modificações (Tabela 2):

TABELA 2. Divergência entre reagentes, concentrações e procedimentos dos cinco protocolos utilizados.

Protocolos	Divergência
1	PVP sólido 2%; β-mercaptoetanol 0,2%; centrifugação 14.000rpm e incubação a 65°C por 30-40 minutos
2	PVP sólido 1% e a centrifugação 12.000rpm
3	Incubação a 55°C por 60 minutos, e foi adicionado 0.1 mg mL ⁻¹ de proteinase K após a adição do tampão de extração
4	β-mercaptoetanol 0,3% e NaCl foi 2,5mol/L
5	pH do TrisHCl foi 7,5, e na lavagem do precipitado foram realizadas duas lavagens com etanol 70%

Fonte: acervo pessoal dos autores , 2015.

Quantificação e Amplificação do DNA

Após a extração de DNA, as amostras foram quantificadas pelo equipamento *QuiBit 2.0 Fluorometer*, obtendo-se as concentrações de DNA. Em seguida, as amostras de um mesmo tratamento foram diluídas para 10 ng/μL e realizadas PCR para o iniciador UBC 890.

Foi utilizada a seguinte programação para as reações de amplificação: desnaturação inicial durante 15 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 52 °C e 1 min a 72 °C; e um passo de extensão final durante 7 minutos a 72 °C. Os produtos de reação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% imerso em tampão TBE 1X (89 mM base Tris, 89 mM ácido bórico, EDTA 2,23 mM) sob tensão constante (110 V) durante 3 h. Um marcador 100pb foi usado como controle positivo na etapa de coloração. A coloração foi efetuada com nitrato de prata 0,2%, sendo fotografado com o uso do fotodocumentador *Biorad XR⁺*.

Em seguida, as bandas de DNA de cada amostra foram observadas e averiguadas sua integridade. Sendo que o protocolo de extração considerado satisfatório foi o que apresentou maior número de bandas definidas, dentre os cinco protocolos e duas condições de armazenamento (congelado e natural).

Seleção dos Iniciadores

Após escolha do protocolo adequado, foi realizada a extração de DNA das oito cultivares de café. Para seleção dos iniciadores, foi realizada uma triagem com dez ISSR (*University of British of Columbia - UBC, Vancouver, Canadá*) (Tabela 3), com o intuito de averiguar o polimorfismo gerado. Foram escolhidos para triagem dois genótipos de café, sendo um de café arábica ('Catuaí Amarelo') e um de conilon ('Robustão'), que apresentam características morfológicas divergentes, e um de jabuticaba (controle positivo). As concentrações dos reagentes e condições para PCR seguiram da mesma forma descrita para os ensaios de teste dos protocolos.

TABELA 3. Identificação e sequência dos iniciadores ISSR utilizados no estudo.

Nome	Sequência
UBC 810	(GA) ₈ T
UBC 813	(CT) ₈ T
UBC 818	(CA) ₈ G
UBC 824	(TC) ₈ G
UBC 843	(CT) ₈ RA
UBC 845	(CT) ₈ RG
UBC 868	(GAA) ₆
UBC 889	DBD(AC) ₇
UBC 890	DBD(AC) ₇
UBC 859	(TG) ₈ RG

Fonte: acervo pessoal dos autores , 2015.

Os produtos da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% imerso em tampão TBE 1X sob tensão constante de 110 V durante 3 h. Um marcador 100 pb foi usado para distinguir e estimar a massa molecular dos fragmentos de DNA. A coloração foi realizada com brometo de etídio (0,25ng/μL), sendo a imagem obtida com o uso de um fotodocumentador *Biorad XR⁺*.

Análise Estatística

As análises estatístico-genéticas das características morfoagronômicas foram realizadas com auxílio do programa Genes (CRUZ, 2008). A estimativa da matriz de distância genética por meio das variáveis quantitativas foi obtida com base na distância de Mahalanobis. O agrupamento dos acessos foi obtido pelo método *Unweighted Paired Group Method using Arithmetic averages* (UPGMA). Para as análises moleculares, foi realizado ANOVA das concentrações de DNA seguida pelo teste F.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização Morfoagronômica

Para os caracteres quantitativos foi observada elevada discrepância entre os valores mínimos e máximos (Tabela 4), o que evidenciou uma boa divergência genética entre as cultivares de café avaliadas.

TABELA 4. Médias das variáveis morfoagronômicas quantitativas das cultivares de café do Ifes *Campus* de Alegre.

Espécie	Cultivar	AP (m)	CF(cm)	CP(cm)	DC(cm)	LF(cm)
<i>C. arabica</i>	'Catuaí amarelo'	2,36 \pm 0,23	14,48 \pm 0,49	1,39 \pm 0,15	6,03 \pm 0,73	6,34 \pm 0,30
<i>C. arabica</i>	'Catuaí vermelho'	2,24 \pm 0,21	13,56 \pm 0,46	1,22 \pm 0,12	6,35 \pm 0,27	5,64 \pm 0,22
<i>C. arabica</i>	'Obatã'	-	15,31 \pm 0,44	1,27 \pm 0,09	6,25 \pm 0,24	6,57 \pm 0,74
<i>C. arabica</i>	'Topázio'	-	13,46 \pm 0,56	1,19 \pm 0,16	5,64 \pm 0,22	5,85 \pm 0,25
<i>C. arabica</i>	'Tupi'	1,84 \pm 0,28	14,74 \pm 0,69	1,28 \pm 0,10	5,41 \pm 0,34	6,38 \pm 0,30
<i>C. canephora</i>	'Robustão'	2,38 \pm 0,27	15,07 \pm 0,62	1,49 \pm 0,20	4,02 \pm 0,18	6,48 \pm 0,36
<i>C. canephora</i>	'Robusta Tropical'	2,07 \pm 0,18	14,28 \pm 1,50	1,05 \pm 0,09	4,61 \pm 0,19	6,05 \pm 0,75
<i>C. canephora</i>	'Vitória'	2,24 \pm 0,16	14,59 \pm 1,56	1,18 \pm 0,15	3,44 \pm 0,23	6,17 \pm 0,64

AP: Altura da planta; CF: comprimento da folha; CP: comprimento do pecíolo; DC: diâmetro do caule; LF: largura da folha. Fonte: acervo pessoal dos autores, 2015.

Para a altura da planta foi obtida uma variação média de 1,84m a 2,38m, sendo representados pelas cultivares 'Tupi' e 'Robustão', respectivamente. As cultivares 'Obatã' e 'Topázio' sofreram uma recepa (corte para possibilitar a renovação total da parte aérea da lavoura) dias antes desta pesquisa, por isso não foi avaliado o descritor altura da planta para estas e as mesmas não foram consideradas para a análise estatística.

DIAS et al. (2014) ressaltam que plantas com alturas superiores a 3,5 metros, dificultam a colheita mecanizada dos frutos da parte superior da planta, restando nas

plantas, em média, 22% da carga pendente. Neste sentido, o melhoramento de café tem priorizado a seleção de cultivares café arábica e conilon de porte baixo. Entretanto podem haver correlações positivas entre altura de plantas de café e a produtividade. CARVALHO et al. (2010) destacam a altura como uma das características que apresentaram maior correlação fenotípica com a produtividade.

AGUIAR et al. (2004) ao estudarem nove cultivares de café encontraram variações de altura entre 1,54m a 2,98m. Segundo os autores as cultivares de café arábica tendem a sofrer maiores variações no descritor altura da planta do que as cultivares de café conilon, pois as cultivares arábicas são mais influenciadas pelo ambiente.

O comprimento da folha variou de 13,46cm a 15,31cm, sendo o menor observado para a cultivar 'Topázio' e o maior para 'Obatã'. AGUIAR et al. (2004) constataram valores bastante abaixo ao obtido neste trabalho, relatando uma variação de 7,97cm a 11,15cm.

Para a largura da folha a variação foi de 5,64cm a 6,48cm para as cultivares 'Catuaí Vermelho' e 'Robustão', respectivamente. Segundo TOMAZ et al. (2015), a área da superfície foliar de uma planta café é a base do rendimento potencial da cultura, o que indica que folhas de maiores extensões são favoráveis a produção, sendo desejável para a seleção de cultivares folhas de maior área foliar.

O comprimento e largura da folha estão relacionados à maior produtividade, pois uma maior área foliar implica em maior superfície de interceptação de luz, o que poderá resultar em taxas fotossintéticas mais elevadas e melhor conversão de carboidratos em grãos de café. Em geral, o café arábica possui folhas maiores que o café conilon, entretanto no presente trabalho os tamanhos de folhas foram muito similares, o que provavelmente está relacionado às condições climáticas da área de estudo, que é quente e seco.

Para o descritor comprimento do pecíolo foram encontrados valores de 1,05cm a 1,49cm para as cultivares 'Robusta Tropical' e 'Robustão', respectivamente. O diâmetro do caule variou entre 3,44cm a 6,35cm, sendo que a cultivar 'Vitória' apresentou o menor diâmetro e a 'Catuaí Vermelho' o maior. MALLER et al. (2011) ao estudar duas cultivares de café no estado de Minas Gerais, encontraram valores de 3,78cm e 4,06cm para esse descritor.

Características morfológicas como o diâmetro do caule estão relacionadas a uma melhor absorção da água e nutrientes. Neste sentido, a maioria das cultivares possuem diâmetro superior a 3,00 cm. Maller et al. (2011) destacam que há poucos trabalhos na literatura com recomendações específicas sobre diâmetro do caule para absorção de nutrientes e conversão em taxa de crescimento da planta.

No dendograma dos dados morfoagronômicos quantitativos, foram gerados quatro grupos distintos, com um corte a uma distância de 10 (Figura 1). Observou-se uma grande similaridade entre os genótipos 4-6 e 2-5, sendo considerados duplicatas para os caracteres quantitativos avaliados. Estes dois grupos encontram-se também muito similares ao genótipo 1. Assim, estes cinco genótipos possuem pequeno percentual de dissimilaridade entre si, o que não ocorre com o genótipo 3, que distancia-se dos materiais anteriores.

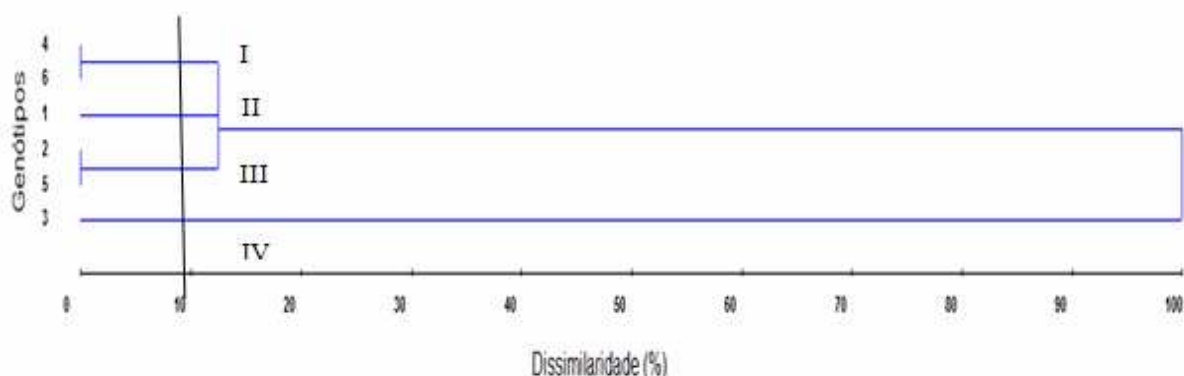


FIGURA 1 – Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade entre seis cultivares encontradas no Parque Cafeeiro do Ifes *Campus* de Alegre. Cultivar 1 ‘Catuaí amarelo’, cultivar 2 ‘Catuaí vermelho’, cultivar 3 ‘Robustão’, cultivar 4 ‘Robusta Tropical’, cultivar 5 ‘Tupi’ e cultivar 6 ‘Vitória’. Fonte: acervo pessoal dos autores , 2015.

O grupo I foi composto pelas cultivares ‘Robusta Tropical’ e ‘Vitória’ que se caracterizam por possuírem os menores comprimentos do pecíolo e diâmetro do caule. O grupo II compreendeu apenas a cultivar ‘Catuaí Amarelo’ que apresentou os valores altos de altura da planta e comprimento do pecíolo.

No grupo III foram alocados as cultivares ‘Catuaí Vermelho’ e ‘Tupi’ que apresentaram valores médios de comprimento de folha e comprimento de pecíolo. O grupo IV, constituído apenas pelo cultivar ‘Robustão’, se diferenciou por apresentar de uma forma geral valores elevados para a maioria dos descritores.

O dendrograma quantitativo agrupou as variedades de forma satisfatória, o que evidencia a eficácia das mensurações de características de herança quantitativa ou polimérica. Pode-se observar que as cultivares designadas como cultivar 4 (‘Robusta Tropical’) e cultivar 6 (‘Vitória’) foram alocadas em um mesmo grupo e pertencem a espécie *C. Canephora*, o mesmo ocorre com a cultivar 2 (‘Catuaí vermelho’) e a cultivar 5 (‘Tupi’) que também foram reunidas em um mesmo grupo, pertencem a espécie *C. arabica*, o que ressalta a similaridade entre as cultivares de mesma espécie. Conforme mostrado no dendrograma a cultivar 1 (‘Catuaí amarelo’), que é arábica, ficou disposta próxima ao grupo III. Apenas a cultivar 3 (‘Robustão’), tipo conilon, apresentou-se mais distante, por apresentar os maiores valores para os descritores estudados.

Na análise qualitativa das cultivares foi observada um baixo número de classes, o que infere uma baixa diversidade genética e alta uniformidade das cultivares estudadas para os caracteres em análise. Descritores qualitativos geralmente são pouco discriminantes e sofrem influência do ambiente, o que ressalta a importância de se utilizar descritores quantitativos e moleculares, de forma a complementar as informações (WAHYUNI et al., 2013). Os descritores quantitativos ou poliméricos descrevem as cultivares com maior eficiência, mas possuem baixa herdabilidade e são bastante influenciáveis pelo ambiente.

As variáveis qualitativas analisadas foram uniformes, o que é justificável segundo alguns autores devido à base genética estreita do café, além de as cultivares serem fenotipicamente muito padronizadas para atender a demandas de produção e mercado. MALLER et al. (2011) também constataram que as características qualitativas não foram eficientes na discriminação de cultivares de

café. Descritores qualitativos geralmente são pouco discriminantes e sofrem influência do ambiente, o que ressalta a importância de se utilizar descritores quantitativos e moleculares, de forma a complementar as informações

Para os descritores cor da folha jovem, cor da gema jovem e cor do pecíolo não foi observada variabilidade fenotípica, sendo o verde a única coloração constatada. Características como a cor da folha jovem e cor do pecíolo em café são determinadas pela expressão de um gene com dominância incompleta e apresenta alta herdabilidade, e por esse motivo, em geral, as folhas jovens e pecíolos são verdes. AGUIAR et al. (2004) encontraram em estudo duas variações na cor da folha jovem, verde e bronze, e para os outros descritores foi observada apenas a coloração verde, em concordância com os dados obtidos neste trabalho.

Para o descritor dominância da pilosidade foi constatado apenas o tipo disperso. Para a forma da folha foi encontrada a forma lanceolada. Em concordância MALLER et al. (2011) constataram a forma lanceolada para os mesmos cultivares de café arábica deste estudo, exceto para o 'Tupi', que apresentou formato elíptico. Para a forma da folha de acordo com ápice foi verificado a forma aculeada. E para a posição da inflorescência encontrou-se a posição axial.

As variáveis qualitativas analisadas foram uniformes, o que é justificável segundo alguns autores devido à base genética estreita do café, além de as cultivares serem fenotipicamente muito padronizadas para atender a demandas de produção e mercado (DIAS et al., 2015). Na literatura outros estudos constataram alta discriminância das cultivares de café com base nos caracteres quantitativos e grande uniformidade para os caracteres qualitativos, podendo ser detectada, visualmente, pequena ou nenhuma variação entre as cultivares (AGUIAR et al., 2004; MALLER et al., 2011).

Extração de DNA e Seleção de Iniciadores

Para os cinco métodos de extração foram obtidas a concentração de DNA por amostra, a média por tratamento, coeficiente de variação (CV) e os valores de teste F (Tabela 5).

TABELA 5: Protocolos utilizados em ensaio de qualidade e quantidade de DNA de café para duas formas de armazenamento foliar. (C= material congelado a -18°C / sete dias; N= folhas coletadas momentos antes extração).

Código	Artigo	Armazenamento	Repetição	Concentração	Média	CV	F
1	DOYLE E DOYLE (1990)	C	1	0.1950	0.16133	0.19663	12.4706
	modificado por ABDELNOOR (1995)		2	0.1570			
			3	0.1320			
	modificado por IAC	N	1	0.0693			
			2	0.1160			
2	DOYLE E DOYLE (1990) modificado por IAC	C	3	0.0468	0.07737	0.45625	0.4505
			1	0.3090			
			2	0.7650			
	modificado por IAC	N	3	0.2840			
			1	0.3900			
2	0.7250						
3	0.3140						
3	SERENO	C	1	0.1060	0.05657	0.84969	6.6693

	et al., 2006.		2	0.0537				
			3	0.0100				
			1	1.0200				
		N	2	0.4940	0.58267	0.68724		
			3	0.2340				
4	HEALEY et al., 2014.	C	1	0.0090				
			2	0.0100	0.00900	0.11111		
			3	0.0080			-0.3333	
		N	1	0.0111				
			2	0.0086	0.00957	0.14037		
			3	0.0090				
5	PEREIRA et al., 2009.	C	1	1.4400				
			2	1.9900	1.42800	0.39783		
			3	0.8540			16.592 8	
		N	1	0.5790				
			2	0.3350	0.31767	0.85126		
			3	0.0390				

Fonte: acervo pessoal dos autores , 2015.

Foi constatado que os protocolos 2, 3 e 5 apresentaram as maiores concentrações de DNA, com médias de 0.452 e 0.476 para folhas congeladas e natural para protocolo 2, 0.582 para folha natural do protocolo 3, e 1.428 para folhas congeladas do protocolo 5. MOSLEMI et al. (2013) avaliaram quatro metodologias de extração de DNA para 15 amostras de romãs e verificaram que o protocolo adaptado para maiores quantidades de CTAB, proteinase K, PVP e 2-mercaptoetanol foram os que apresentaram maiores quantidade e qualidade do DNA, visto a redução de contaminantes na amostra, como polifenóis e polissacarídeos. No presente estudo, foi observado que a adição de proteinase K (protocolo 3) também favoreceu a quantidade e qualidade de DNA obtida.

Com relação aos protocolos que apresentaram as maiores médias de concentração de DNA (2, 3 e 5) o menor valor de coeficiente de variação foi para o tratamento com folha congelada no protocolo 5 (39,78%), isso significa que o DNA obtido a partir do material congelado neste protocolo é o mais homogêneo dentre os testados. Estudo similar foi realizado por PEREIRA et al. (2009), no qual foi constatado que o armazenamento de folhas do cafeeiro possibilitou a obtenção de um DNA de melhor qualidade quando comparado ao DNA obtido na extração realizada logo após a coleta do material.

Com relação ao valor do teste F para a hipótese independência do tipo de armazenamento da folha e quantidade de DNA por protocolo, verifica-se que para as metodologias 1, 3 e 5 os valores foram de 12.4706, 6.6693 e 16.5928 respectivamente (Tabela 8). Estes valores são maiores que o valor crítico da tabela F, que é de 4.545. Isso demonstra que o tipo de folha, juntamente com o protocolo, influenciam diretamente na quantidade de DNA extraído, e que estas variáveis devem ser levadas em conta antes da extração.

O protocolo 2 apresentou poucas diferenças para concentração de DNA em relação ao tipo de armazenamento do tecido utilizado, como pode ser visualizado pela pequena divergência no valor do coeficiente de variação do protocolo. Assim, este protocolo independe do tipo de armazenamento do tecido, o que dá certa

liberdade para armazenar o material em freezer, evitando retorno ao local de coleta quando necessária uma nova extração.

Contudo, pela análise conjunta destes dados em comparação com o gel obtido (Figura 2), verifica-se que o protocolo 3, apesar de possuir menor concentração de DNA entre os três protocolos (2, 3 e 5), e maior valor de coeficiente de variação, foi o que apresentou bandas mais nítidas em comparação com os demais protocolos, o que pode estar relacionado a adição de proteinase K. Assim, o parâmetro concentração de DNA não pode ser absoluto na escolha da metodologia de extração de uma espécie, pois a pureza do material extraído e demais componentes celulares podem estar presentes. Além disso, as análises moleculares em café são limitadas devido à presença de polifenóis e pigmentos que interferem severamente na purificação do DNA, e nesse sentido, a proteinase K é muito útil para remoção dessas moléculas (MOULIN et al., 2012).

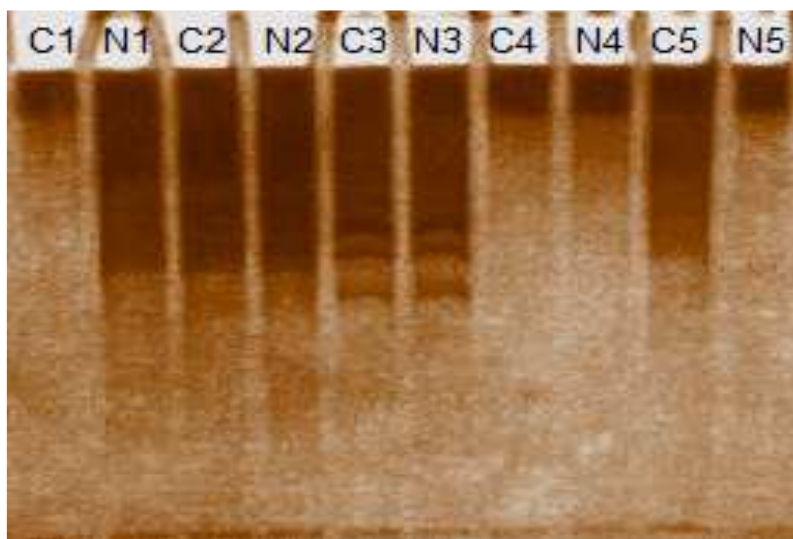


FIGURA 2: Teste de amplificação de ISSR UBC 890 para qualidade de amostras de DNA para protocolo X material. Números correspondem a protocolos e letras a material congelado (C) e natural (N).Fonte: acervo pessoal dos autores , 2015.

Foi selecionado o protocolo 3 para extração das oito cultivares de café, devido a melhor nitidez das bandas de DNA. Procedeu-se a triagem dos iniciadores a serem utilizados para posteriores estudos de diversidade entre as cultivares, dos dez iniciadores ISSR utilizados, para duas amostras de cafeeiro (cultivar 'Catuaí Amarelo' e 'Robustão') e uma de jabuticabeira (controle), os iniciadores UBC 813, 818, 824, 845 e 859 apresentaram melhores perfis eletroforéticos com maior polimorfismo e bandas de DNA mais nítidas para os três indivíduos (Figura 3). Dessa forma, estes são os mais indicados em estudos de diversidade genética, contudo todos os iniciadores podem ser utilizados para caracterização molecular das cultivares de café, por apresentarem bandas polimórficas. BORÉM & CAIXETA (2009) ressaltam que um polimorfismo elevado abrange um maior número de regiões gênicas, permitindo obtenção de um maior quantitativo de informações dos materiais trabalhados.

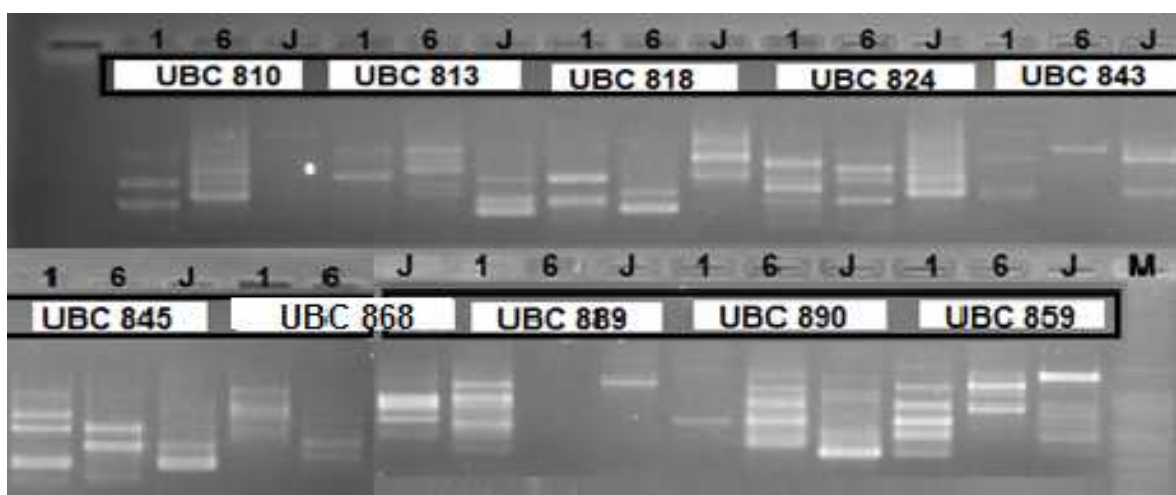


FIGURA 3: Teste de amplificação dos dez iniciadores ISSR para materiais 1 e 6 de café e J de jabuticabeira. Fonte: acervo pessoal dos autores , 2015.

CONCLUSÕES

A caracterização morfoagronômica quantitativa foi eficiente para estimar a diversidade genética entre as variedades, sendo importante ferramenta para o agrupamento das cultivares de café do lfe *Campus* de Alegre.

A caracterização morfoagronômica qualitativa não possibilitou uma distinção adequada das variedades, sendo constatada grande uniformidade para os descritores utilizados, o que evidencia a necessidade de outros tipos de caracterizações para complementar os resultados.

Para a extração de DNA, foram obtidos três protocolos satisfatórios, sendo que o protocolo 3 apresentou bandas de DNA mais nítidas. Quanto à seleção dos iniciadores para caracterização molecular, foram selecionados UBC 813, 818, 824, 845 e 859 por apresentarem maior polimorfismo.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.T.E.; GUERREIRO-FILHO, O.; MALUF, M.P.; GALLO, P.B.; FAZUOLI, L.C. Caracterização de cultivares de *coffea arabica* mediante utilização de descritores mínimos. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.2, p.179-192, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/brag/v63n2/21367.pdf>>. doi: 10.1590/S0006-87052004000200003.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2ª Ed. Viçosa, 2009. 532p.

HEALEY, A.; FURTADO, A.; COOPER, T., HENRY, R.J. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. **Plant Methods**, 2014. Disponível em: <<http://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-10-21>>. Doi: 10.1186/1746-4811-10-21.

CARVALHO, A.M.; MENDES, A. N., CARVALHO, G. R., BOTELHO, C. E., GONÇALVES, F. A., & FERREIRA, A. D. Correlação entre crescimento e produtividade de cultivares de café em diferentes regiões de Minas Gerais, Brasil. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p. 100 2016

Pesquisa agropecuária brasileira, v. 45, n. 3, p. 269-275, 2011. Disponível em: <<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/7436>>. Doi: 10.1590/S0100-204X2010000300006.

CRUZ, C.D. **Programa genes** (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 2008.

DIAS, F. P.; SOUZA, C. A. S. Caracterização de progênies do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) selecionadas em Minas Gerais: II-caracteres relacionados à produção. **Ceres**, v. 52, n. 299, 2015. Disponível em: <<http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3029>>. Doi: 10.1590/S0034-737X2011000300011

DIAS, R.E.B.A.; DA SILVA, F.M.; CUNHA, J.P.B.; AVELAR, R.C.; FERNANDES, F.C. Eficiência da colheita mecanizada do café com uso do inibidor de biossíntese de etileno. **Coffee Science**, v. 9, n. 4, p. 527-536, 2014. Disponível em: <http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/viewFile/746/pdf_135>.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

FERRAO, R. G.; DA FONSECA, A. F. A.; SEBASTIÃO, J.; SILVEIRA, M.; FERRÃO, M. A. G.; BRAGANÇA, S. M. EMCAPA 8141-robustão capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. **Ceres**, 47:273-279, 2015. Disponível em: <<http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/2622>>. Doi: 123456789/1266

HEALEY, A.; FURTADO, A.; COOPER, T., HENRY, R.J. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. **Plant Methods**, 2014. Disponível em: <<http://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-10-21>>. Doi: 10.1186/1746-4811-10-21.

IPGRI - International Plant Genetic Resource Institute.Descriptors for coffee (Coffea spp. and Psilanthus spp.). Roma, 1996.

JACOMINI, R.; BACHA, C.J.C.; FERRACIOLI, K.G. Comparação entre as políticas de café do Brasil e da Etiópia a partir de 1990. **Revista de Política Agrícola**. Ano XXIV, nº1, 2015. Disponível em: <<https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/963>>. Doi: s/doi.

MALLER, A.; REZENDE, R.; BRANDÃO, D.; TAVORE, R.V. Variação do diâmetro de caule de duas cultivares de cafeeiro sob fertirrigação e regimes hídricos. In: Alberto e Torres, A cultura cafeeira, 1ª edição, 2011.

MOSLEMI, M.; MEHDI, Z. , YOUNES, S.; GHOLAMREZA, B.K. Optimization of DNA extraction and amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of pomegranate (*Punica granatum* L.). **African Journal of Biotechnology**. V. 12(34),

pp. 5252-5257. 2013. Disponível em: <
<http://search.proquest.com/openview/b7f614431cae76e1f69f6bd3e6cbd684/1?pq-origsite=gscholar>>. Doi: 10.5897/AJB12.511.

MOULIN, M.M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A.; SUDRÉ, C.P.; GONZAGA, M.P. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Acta Scientiarum**. Agronomy (Impresso) . Vol. 34, p. 139-147, 2012. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S180786212012000200004&script=sci_arttext&tlng=es>. Doi: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v34i2.12616>.

PEREIRA, G.S.; PINHO, E.V.R.V.; PADILHA, L.; VILELA, L.R.; CARVALHO, B.L.; PINHO, I.V.V. Coleta de folhas do cafeeiro e extração de DNA genômico de alta qualidade. **VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2009. Disponível em: <
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44122/1/Coleta-de-folhas-do-cafeeiro.pdf>>.

RONCAL, J., GUYOT, R., HAMON, P., CROUZILLAT, D., RIGOREAU, M., KONAN, O. N. G., ... & DE KOCHKO, A. Active transposable elements recover species boundaries and geographic structure in Madagascan coffee species. **Molecular Genetics and Genomics**, p. 1-14, 2015. Disponível em: <
<http://link.springer.com/article/10.1007/s00438-015-1098-3>>. doi: 10.1007/s00438-015-1098-3.

SERENO, M.L.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCOSKY, R.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**. 7:13–24, 2006. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s10592-005-7568-0#page-1>>. Doi: 10.1007/s10592-005-7568-0.

TOMAZ, M. A.; SAKIYAMA, N. S.; DA MATTA, F. M.; MARTINEZ, H. E. P.; CRUZ, C. D.; PEREIRA, A. A. Efeito do porta-enxerto nas trocas gasosas, área foliar e superfície de raiz de mudas de *coffea arabica* l. **Ceres**, v. 53, n. 306, 2015. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=305226787013>>. Doi: 305226794015.

WAHYUNI, Y., BALLESTER, A. R., TIKUNOV, Y., VOS, R. C. H., PELGROM, T. B. K., MAHARIJAYA, A., SUDARMONOWATI, E., BINO, J. R., BOVY, A. G. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. **Metabolomics**, v. 9, p. 130–144, 2013. Disponível em: <
<http://link.springer.com/article/10.1007/s11306-012-0432-6#page-1>>. Doi: 10.1007/s11306-012-0432-6.