

JÚLIA ROSA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE *Coffea arabica* POR  
MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M838c  
2017  
Moreira, Júlia Rosa, 1993-  
Caracterização molecular de acessos de *Coffea arabica* por  
marcadores moleculares microssatélites / Júlia Rosa Moreira. –  
Viçosa, MG, 2017.  
x, 29f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ney Sussumu Sakiyama.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.27-29.

1. Café - Melhoramento genético. 2. Germoplasma.  
3. Marcadores moleculares. 4. Microssatélites. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de  
Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22 ed. 633.73

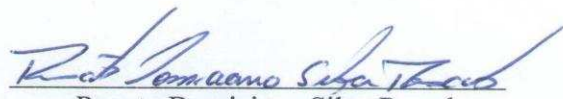
JÚLIA ROSA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE *Coffea arabica* POR  
MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES**

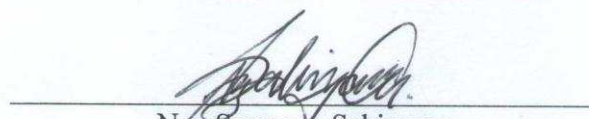
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2017.

  
Antonio Alves Pereira

  
Renato Domiciano Silva Rosado

  
Eveline Teixeira Caixeta (Coorientadora)

  
Ney Sussumu Sakiyama  
(Orientador)

“Nunca é tarde demais ou cedo demais para ser quem você quer ser.  
Não há limite de tempo. Comece quando quiser.  
Mude ou continue sendo a mesma pessoa. Não há regras para isso.  
Você pode tirar o máximo proveito ou o mínimo.  
Espero que tire o máximo. Espero que veja coisas surpreendentes.  
Espero que sinta coisas que nunca sentiu antes.  
Espero que conheça pessoas com um ponto de vista diferente.  
Espero que tenha uma vida da qual se orgulhe.  
E se não se orgulhar dela, espero que encontre forças para começar tudo de novo”.

(O Curioso Caso de Benjamin Button)

À Minha mãe,  
Meu pai,  
E meu irmão.  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos por minha mãe, minha maior espectadora, que nunca mediu esforços para me ajudar. Armanda, serei eternamente grata por tudo.

Pai, obrigada por sempre me incentivar a ultrapassar as barreiras da comodidade. Contribuiu muito para meu crescimento pessoal.

Vinícius, meu irmão, e demais familiares, gratidão por sempre desejarem o melhor para mim.

Aos amigos da minha cidade, que sempre acompanham minha trajetória, e que mesmo com a distância conseguem manter um laço intenso de amizade. Agradeço por ter vocês.

Aos amigos que Maringá me proporcionou. É muito bom saber que o que foi construído em 2011 ainda é muito sólido. É gratificante saber que posso contar sempre com vocês.

No decorrer da caminhada conheci pessoas excelentes em Viçosa, e estou cada vez mais convicta que por qualquer lugar que passemos existirão pessoas esperando por nós. Cada amizade formada deixou uma mensagem, e essa será a herança que levarei de cada um.

Tive o prazer de ser recebida no laboratório Biocafé, onde executei meu trabalho de mestrado e conheci pessoas maravilhosas. Agradeço imensamente a todos os amigos do Biocafé por todo apoio e companheirismo, e por sempre se mostrarem receptivos e dispostos a me ajudar.

Agradeço ao meu orientador Dr. Ney Sussumu Sakiyama por ter aceitado me orientar e por todo suporte dado nesse período.

Agradeço a minha coorientadora Dra. Eveline Teixeira Caixeta por estar sempre apta a nos receber, aconselhar e ajudar da melhor forma possível. Obrigada por tudo.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Antonio Carlos Baião de Oliveira por toda contribuição e engrandecimento no meu trabalho.

Agradeço ao pesquisador Dr. Antonio Alves Pereira por toda parceria, disponibilidade em nos ajudar e por ter aceitado participar da minha banca de defesa.

Agradeço ao professor Dr. Cosme Damião Cruz pela assistência com as análises estatísticas. Ao Dr. Haroldo Silva Rodrigues por toda ajuda e paciência com meus dados. E também ao Dr. Renato Domiciano Silva Rosado pela contribuição no trabalho e por ter aceitado participar da minha banca de defesa.

Agradeço à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) pela disponibilização do material vegetal do seu Banco Ativo de Germoplasma, fundamentais para a realização desse trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização do curso. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<i>2.1 Material genético .....</i>	<i>3</i>
<i>2.2 Extração de DNA.....</i>	<i>7</i>
<i>2.3 Amplificação e genotipagem com marcadores microssatélites .....</i>	<i>8</i>
<i>2.4 Análises genético-estatísticas .....</i>	<i>9</i>
<i>2.4.1 Análise de variância molecular .....</i>	<i>9</i>
<i>2.4.2 Análise discriminante.....</i>	<i>10</i>
<i>2.4.3 Redes de similaridade .....</i>	<i>10</i>
<i>2.5 Características morfoagronômicas .....</i>	<i>12</i>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>13</b>
<i>3.2 Diversidade genética entre e dentro das populações .....</i>	<i>13</i>
<i>3.3 Discriminação das populações .....</i>	<i>14</i>
<i>3.4 Redes de similaridade .....</i>	<i>17</i>
<i>3.1 Características morfoagronômicas .....</i>	<i>22</i>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>25</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>27</b>



## RESUMO

MOREIRA, Júlia Rosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Caracterização molecular de acessos de *Coffea arabica* por marcadores moleculares microssatélites.** Orientador: Ney Sussumu Sakiyama. Coorientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Antonio Carlos Baião de Oliveira.

A espécie *Coffea arabica* é autógama com base genética estreita e originada no sudoeste da Etiópia. As variedades botânicas de cafeeiros introduzidas no Brasil mais representativas foram a Típica e o Bourbon, as quais deram origem a outras variedades. A variedade Bourbon é a reconhecida internacionalmente por apresentar elevado potencial de bebida. É, por isso, valorizada nos mercados de cafés especiais. Dessa forma é essencial para programas de melhoramento que essa espécie seja conservada em Bancos de Germoplasma. O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), situado no município de Patrocínio, Minas Gerais, dá suporte aos programas de melhoramento e conta com 1596 acessos de café, destes, 140 foram registradas como Bourbon. O BAG de café da Epamig recebe o apoio do BAG de café da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situado na Área Experimental do Fundão, no município de Viçosa. Apesar de apresentarem uma ampla disponibilidade de características, esses bancos ainda não foram devidamente caracterizados, como é o caso do Bourbon, que ainda se tem muitas dúvidas sobre seus acessos, o que dificulta o uso no melhoramento e na comercialização. Para auxiliar a caracterização desses acessos, uma ferramenta útil é a utilização de marcadores moleculares, e os microssatélites são indicados para esse tipo de estudo. Diante disso, objetivou-se avaliar a diversidade genética por meio de marcadores moleculares SSR de acessos de Bourbon, além de variedades antigas e cultivadas, da coleção do BAG de café da Epamig. Esses acessos e variedades antigas e cultivadas foram denominados de populações, totalizado 14. Para as análises de variância molecular (AMOVA), discriminantes e de redes de correlação foram utilizados seis *primers* microssatélites (SSR), por apresentarem polimorfismo. Com base na AMOVA, observou-se maior variação genética dentro da população (64,88%) do que entre as populações (35,12%). Esses resultados sugerem que pode ter ocorrido polinização cruzada no local de coleta. Quanto à classificação das populações por análise discriminante observou-se que as populações tiveram similaridade com mais de uma população e algumas não tiveram similaridade com sua própria população. As populações caracterizadas pelo BAG como Bourbons foram analisadas e, por similaridade, nenhum foi identificado como Bourbon, e sim como Sumatra, Catuai Amarelo e alguns não foram bem

distintos. Além disso, foram comparadas três características morfoagronômicas das quatro populações de possíveis Bourbons com as populações já identificadas como Bourbon Vermelho e Bourbon Amarelo. Observou-se variação para cor de broto nos indivíduos para as três populações caracterizadas como Bourbon Vermelho, e variação de porte na população caracterizada como Bourbon Amarelo. Pelos resultados obtidos, concluiu-se que existe uma maior variabilidade genética dentro das populações, e as quatro com classificação duvidosa de Bourbon apresentam similaridade com outras variedades.

## ABSTRACT

MOREIRA, Júlia Rosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Molecular characterization of *Coffea arabica* accesses by microsatellite molecular markers.** Adviser: Ney Sussumu Sakiyama. Co-advisers: Eveline Teixeira Caixeta and Antonio Carlos Baião de Oliveira.

*Coffea arabica* species is an autogamous with a narrow genetic base originating in southwestern Ethiopia. The most representative botanical varieties of coffee trees introduced in Brazil were Tipica and Bourbon, which gave rise to other cultivars. The Bourbon variety is internationally renowned for its high cup quality. Therefore, it is valued in the specialty coffee market. As a result, it is essential for breeding programs that this species be conserved in Germplasm Banks. The Agricultural Germplasm Bank (BAG) of the Agricultural Research Organization of Minas Gerais (EPAMIG), located in the municipality of Patrocínio, Minas Gerais, supports coffee breeding programs and has 1596 coffee accessions, of which 140 (like Bourbon) have been registered. The Epamig coffee BAG receives the support of the BAG of the Universidade Federal de Viçosa (UFV), located in the experimental area of the UFV, no municipality of Viçosa, Minas Gerais. Although they have a wide availability of characteristics, these banks have not yet been adequately characterized, as is the case of the Bourbon group, in which still there are many doubts about their accesses, which makes difficult to use in breeding and marketing. To help characterize these accesses, a useful tool is the use of molecular markers among which microsatellites are indicated for this type of study. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity through SSR molecular markers of Bourbon accesses, as well as old and cultivated varieties, from EPAMIG's coffee BAG collection. These ancient and cultivated accesses and varieties were called populations, totaling 14 polymorphisms. For analysis of molecular variance (AMOVA), discriminant and correlation networks, six microsatellite primers (SSR) were used. Based on AMOVA, there was greater genetic variation within the population (64.88%) than among populations (35.12%). These results suggest that cross-pollination may have occurred at the collection site. As for the classification of populations by discriminant analysis, it was observed that the populations had similarity with more than one population and some did not have similarity with their own population. Populations characterized by BAG as Bourbons were analyzed and, by similarity, none were identified as Bourbon, but as Sumatra, Catuaí Amarelo and some were not very distinct. In addition, three morphoagronomic characteristics of the four populations of possible Bourbons were compared to populations already identified as Red

Bourbon and Yellow Bourbon. Variation to bud color was observed in the individuals for the three populations characterized as Red Bourbon and variation of size in the population characterized as Yellow Bourbon. From the results obtained, it was concluded that there is a greater genetic variability within the populations and the four with uncertain classification of Bourbon presented similarity with other varieties.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie de café de maior importância comercial é a *Coffea arabica* L (café arábica), pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. É uma espécie alotetraploide ( $2n=4x=44$ ) (CLARINDO e CARVALHO, 2008) e autógama, porém pode ocorrer uma taxa, em média, de 10% de fecundação cruzada (MÔNACO et al., 1963). A caracterização molecular do seu genoma nuclear tetraploide indicou suas sete possíveis espécies progenitoras diploides, com a provável mãe *Coffea eugenioides* e o provável pai *Coffea canephora* (LÓPEZ-GARTNER et al., 2009; GELETA et al., 2012).

A origem e dispersão do café arábica, associados ao fato de ser uma planta autógama, explicam a sua estreita base genética (ANTHONY et al., 2001; LASHERMES et al., 2000). A espécie é originária do sudoeste da Etiópia (TERESSA et al., 2011). No ano de 575 foi levada ao Iêmen, e tornou-se de grande importância para os árabes (OLIVEIRA et al., 2012). Em 1690, os holandeses conseguiram as primeiras mudas de café dos árabes e as levaram para uma colônia da Holanda, Ilha Java, na Indonésia, onde surgiu a variedade Típica. Em 1706, algumas mudas foram cultivadas nas estufas do jardim botânico de Amsterdã. O cafeeiro ganhava destaque no cenário europeu, e em 1713, os franceses foram presenteados com uma muda de café arábica, que foi levada ao Jardim Botânico de Paris (RODRIGUES JR et al., 1975). Em 1715, surgiu a variedade Bourbon na Ilha da Reunião ou Ilha de Bourbon (VEGA et al., 2008).

Após o conhecimento dos holandeses e franceses, o cultivo de café foi difundido para outros países europeus e também para América. No Brasil, a primeira variedade introduzida foi a Típica, em 1727, que chegou ao norte do país, no Pará, por meio da Guiana Francesa (OLIVEIRA e MALUF, 2007). Em 1859 na expectativa de se obter um café mais produtivo e de melhor qualidade que a variedade Típica, o Bourbon Vermelho foi introduzido e começou a ser cultivado no Brasil (ANTHONY et al., 2001). Com isso as principais variedades conhecidas de café arábica foram derivadas das duas formas botânicas, Típica e Bourbon (SETOTAW et al., 2013). Em 1871, foi encontrada, em Botucatu (SP), a primeira mutação da variedade Típica identificada no Brasil, chamada de Amarelo de Botucatu. A variedade Sumatra que foi introduzida em terras brasileiras em 1896 é, possivelmente, uma linhagem da variedade Típica, com características muito semelhantes, diferenciando apenas pelo porte um pouco mais alto e maior produção. A variedade Mundo Novo é originada do cruzamento entre Sumatra e Bourbon Vermelho (MENDES et al., 2008). A variedade Caturra corresponde a cafeeiros de porte baixo,

originado de provável mutação do Bourbon Vermelho (OLIVEIRA e MALUF, 2007). A variedade Catuaí originou-se da hibridação artificial entre Mundo Novo e Caturra Amarelo (MENDES et al., 2008).

Entre as espécies de café de consumo comercial, o arábica apresenta uma melhor qualidade de bebida, e a variedade Bourbon é a mais reconhecida internacionalmente por apresentar elevado potencial de bebida, com excelente sabor e aroma. É altamente valorizada nos mercados de cafés especiais (FERREIRA et al., 2013). Devido a esses fatores, é essencial para programas de melhoramento que essa variedade seja conservada em Bancos de Germoplasma. Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) conservam a variabilidade genética dos recursos genéticos vegetais entre curto e médio prazo, e evitam a erosão genética ou perda de alelos, para manutenção dos acessos. Por meio dos BAGs é possível obter informações a respeito de potenciais genitores para serem usados em programas de melhoramento (COSTA et al., 2011). Por esses motivos, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) estabeleceu um BAG de café no município de Patrocínio, Minas Gerais, que conta com 1596 acessos de café, na maioria *C. arabica*, e recebe apoio do BAG de café da Universidade Federal de Viçosa, situado no município de Viçosa, apresentam diversas características, como elevada capacidade produtiva, resistência à doenças e pragas, qualidade diferenciada de bebida, diversidade de porte e arquitetura de plantas, tamanho, formato variáveis de grãos e entre outros. Dos acessos desse BAG da Epamig, 140 correspondem a cafeeiros Bourbon, com 20 indivíduos por acesso, divididos em duas repetições (EIRA et al., 2007). Apesar de esse banco apresentar uma ampla disponibilidade de características, ele ainda não foi devidamente caracterizado, como é o caso do Bourbon, que ainda se tem muitas dúvidas sobre seus acessos, o que dificulta o uso no melhoramento e na comercialização (PESTANA, 2015).

Os marcadores moleculares são uma ferramenta que auxiliam a caracterização dos acessos dos bancos de germoplasma (COSTA et al., 2011). Eles direcionam os melhores cruzamentos a serem feitos e também os progenitores de maior potencial, além de fazer uma correta identificação dos acessos (PEREIRA et al., 2016). Os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou STR (*Short Tandem Repeat*), ou também conhecido como microssatélite por estarem presentes em todo o genoma, terem altas taxas de polimorfismo, serem codominante e multialélicos, possuírem especificidade local e reprodutibilidade são os mais indicado para estudos de diversidade genética (FERRÃO et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Pestana (2015) identificou através de marcadores moleculares SSR que alguns acessos, dos setenta e cinco utilizados e caracterizados como Bourbon no BAG da Epamig apresentaram indivíduos que foram identificados como outra variedade. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi a avaliação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares SSR de quatro desses acessos, que foram chamados de populações, considerando todos os indivíduos de cada, disponíveis no BAG de café da Epamig. Populações de Típica, Sumatra, Mundo Novo, Amarelo de Botucatu, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho, Caturra Vermelho e Caturra Amarelo também foram avaliados, pertencentes ao BAG de café da Epamig, com exceção ao Catuaí com acessos pertencentes ao BAG de café da UFV. Foram analisadas também três características morfoagronômicas das quatro populações para comparar com as das variedades antigas e cultivadas de arábica.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### ***2.1 Material genético***

Foram analisados quatro populações, MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117, caracterizados como Bourbon, sendo 11 a 16 indivíduos por população, totalizando 58 indivíduos. Foram analisados também 109 indivíduos de variedades antigas e cultivadas de café arábica. Todo material utilizado (Tabela 1) pertence ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), localizado na Fazenda Experimental de Patrocínio, no município de Patrocínio, Minas Gerais. Os indivíduos foram constituídos a partir de sementes de plantas individuais ou de misturas de sementes de várias plantas da população, que foram coletadas de instituições públicas, empresas privadas e lavouras de café de fazendas particulares nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná.

O material genético utilizado neste trabalho foi selecionado com base em dados de Pestana (2015), que caracterizou setenta e cinco acessos de Bourbon, com média de seis indivíduos por acesso. Dessa forma, no presente estudo foram analisados quatro acessos que apresentaram classificação duvidosa, sendo denominados de populações. Na tentativa de ter maior precisão, utilizou-se um maior número de indivíduos por população. Com o propósito de verificar a similaridade das quatro populações com variedades antigas e cultivadas de café, analisaram-se também populações de Típica, Sumatra, Mundo Novo, Amarelo de Botucatu, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Bourbon Amarelo, Bourbon

Vermelho, Caturra Vermelho e Caturra Amarelo. Cada uma dessas variedades, além do MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117, totalizaram 14 populações (Tabela 1).



**Tabela 1.** Informações dos acessos de cafeeiros de *Coffea arabica* dos Bancos de Germoplasmas da EPAMIG e da UFV, em Patrocínio, MG.

População	Acesso	Plantas/ acesso	Designação no local de coleta	Local de coleta
1	MG 0001	3	Típica Nacional	Fazenda Santa Elisa, Campinas-SP
	MG 0002	3	Típica UFV 536	Área Experimental do Fundão-UFV, Viçosa-MG
	MG 0003	2	Típica da Guatemala	C. Exp. Pioneiros Café do Cerrado, Patrocínio-MG
2	MG 0130	3	Sumatirão Ponta Roxa	Sítio São José, Cambira-PR
	MG 0131	2	Sumatra	Sítio São José, Dois Córregos-SP
	MG 0134	3	Sumatra Palma	Sítio São José, Cambira-PR
	MG 0135	2	Sumatra	Sítio São José, Dois Corregos-SP
	MG 0136	2	Sumatra	Sítio Coqueiral, Dois Corregos-SP
3	MG 1209	5	Amarelo de Botucatu	Fazenda Rodolfo Reis, Três Pontas-MG
4	MG 1230	5	Mundo Novo IAC 376-4	EPAMIG, Patrocínio-MG
	MG 1238	3	Mundo Novo IAC 379/19	EPAMIG, Patrocínio-MG
5	MG 1405	1	Catuaí Vermelho IAC 144	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	MG 1390	1	Catuaí Vermelho IAC 51	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2142	1	Catuaí Vermelho IAC 24	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2144	1	Catuaí Vermelho IAC 44	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2145	1	Catuaí Vermelho IAC 81	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2147	1	Catuaí Vermelho IAC 99	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2194	1	Catuaí Vermelho IAC 141	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2237	1	Catuaí Vermelho IAC 15	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
6	MG 1395	3	Catuaí Amarelo IAC 62 CPS FEPC	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2148	1	Catuaí Amarelo IAC 64	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2149	1	Catuaí Amarelo IAC 91	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2154	1	Catuaí Amarelo IAC 86	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2155	1	Catuaí Amarelo IAC 47	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
	UFV 2156	1	Catuaí Amarelo IAC 113	Fazenda Exp. de Patrocínio, Patrocínio-MG
7	MG 0009	6	Bourbon Amarelo IAC col. 19 MS	Sítio São José, Dois Córregos-SP
	MG 0019	6	Bourbon Amarelo	Campo Experimental de Café, Martins Soares-MG

**Tabela 1.** Continuação...

<b>População</b>	<b>Acesso</b>	<b>Plantas/ acesso</b>	<b>Designação no local de coleta</b>	<b>Local de coleta</b>
7	MG 0030	5	Bourbon Amarelo T1	Fazenda recreio, S. Sebastião da Grama-SP
	MG 0086	3	Bourbon Amarelo MS	Fazenda Santa Alina, S. Sebastião da Grama-SP
	MG 0109	3	Bourbon Amarelo IAC JC	Fazenda Café da Crista, Marechal Floriano-ES
8	MG 0010	6	Bourbon Vermelho	Fazenda Gromongol, Ervália-MG
	MG 0057	6	Bourbon Vermelho Pl 06	Fazenda Santa Alina, S. Sebastião da Grama-SP
	MG 0077	5	Bourbon Vermelho Pl 14	Fazenda Santa Alina, S. Sebastião da Grama-SP
	MG 0078	2	Bourbon Vermelho Pl 15	Fazenda Santa Alina, S. Sebastião da Grama-SP
	MG 0094	4	Bourbon Vermelho	Fazenda Sr. José Antonio Limeira, Manhumirim-MG
9	MG 0190	3	Caturra Vermelho	Sítio São José, Dois Córregos-MG
	MG 0192	3	Caturra Vermelho	C. Exp. Pioneiros Café do Cerrado, Patrocínio-MG
	MG 0216	2	Caturra Vermelho UFV 534 C83	Área Experimental do Fundão-UFV, Viçosa-MG
10	MG 0191	3	Caturra Amarelo	Sítio São José, Dois Córregos-MG
	MG 0193	3	Caturra Amarelo	C. Exp. Pioneiros Café do Cerrado, Patrocínio-MG
	MG 0212	2	Caturra Amarelo	Faz. Experimento de Machado, Machado-MG
11	MG 0011	16	Bourbon Vermelho	Fazenda São João Batista, Campos Altos-MG
12	MG 0064	16	Bourbon Vermelho	Fazenda São João Batista, Campos Altos-MG
13	MG 0099	11	Bourbon Vermelho VD	Fazenda São João Batista, Campos Altos-MG
14	MG 0117	15	Bourbon Amarelo	Fazenda Monte Alegre/Italiano, Alfenas-MG

\* Acessos iniciados com MG pertencem ao Banco de Germoplasma da Epamig.

\*Acessos iniciados com UFV pertencem ao Banco de Germoplasma da UFV.

## 2.2 Extração de DNA

Foram coletadas folhas saudáveis e jovens de cada indivíduo, e essas conduzidas ao laboratório de Biotecnologia do cafeeiro/ Universidade Federal de Viçosa-BioCafé/UFV. No laboratório, as folhas foram lavadas em água corrente, secadas com papel toalha, acondicionadas em tubos Falcon previamente identificados e armazenadas em freezer a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 12 horas. As amostras congeladas foram liofilizadas por três dias, trituradas em cadinhos com auxílio de pistilo e cada amostra foi identificada e armazenada em microtubos de 2,0 mL.

O DNA genômico das folhas foi extraído utilizando-se o método proposto por Diniz et al. (2005). Em microtubos de 2,0 mL, previamente identificados, adicionou-se aproximadamente 50 mg de tecido vegetal triturado de cada amostra. Dois tampões foram preparados, o primeiro denominado tampão de lise (Sorbitol 0,35 M, Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, EDTA 5 mM) e o segundo de extração (NaCl 2 M, CTAB 2%, Tris-HCl 0,2 M, EDTA 0,05 M). Os dois tampões foram misturados e acrescentou-se sarcosil (5%), bissulfito de sódio (1%), carvão ativo (0,1%) e PVP-40 (2%). Após esse preparo, a solução de extração foi pré-aquecida a  $65^{\circ}\text{C}$ , e 1,5 mL dessa solução foi adicionado em cada microtubo de 2,0 mL contendo as amostras. Os tubos foram deixados em banho-maria a  $65^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos, e homogeneizados a cada 10 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante transferido para novos tubos de 2,0 mL, com a adição de 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). As amostras no tubo foram homogeneizadas e depois centrifugados durante 10 minutos a 14000 rpm. Em microtubo de 1,5 mL transferiu-se 800  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Foi realizada uma homogeneização manual e depois os microtubos ficaram armazenados por 40 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou overnight a  $4^{\circ}$ . As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70% e 95%. O DNA foi ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 80  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e incubado em *thermomixer* a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. O DNA foi precipitado com 40  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M e 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado e incubado por 40 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou overnight a  $4^{\circ}\text{C}$ . Depois dessa etapa realizou-se uma centrifugação de 20 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet lavado com etanol 70% e 95% e ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de água.

A avaliação da qualidade do DNA foi realizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e sua concentração verificada em espectrofotômetro NanoDrop 2000. As amostras foram diluídas em água milliQ e padronizadas em 25 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$  e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3 Amplificação e genotipagem com marcadores microssatélites

Para genotipagem foram utilizados seis *primers* microssatélites (Tabela 2), selecionados por apresentarem polimorfismo em cafeeiros. Cada amostra de DNA foi amplificada de acordo com Missio et al. (2009) com um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , contendo 50 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X da enzima, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 150  $\mu\text{M}$  de cada dNTP e 0,1  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, completando o volume para 20  $\mu\text{L}$  com água milli-Q estéril. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*). Após desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 min, foram realizados 10 ciclos de *touchdown* PCR, a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, temperatura de anelamento decrescendo  $1^{\circ}\text{C}$  a cada ciclo (de  $66^{\circ}\text{C}$  até  $57^{\circ}\text{C}$ ), durante 30 segundos, e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, seguidos por mais 30 ciclos de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$ , anelamento a  $57^{\circ}\text{C}$  e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ , com 30 segundos cada etapa. A extensão final foi realizada a  $72^{\circ}\text{C}$ , por 8 min.

Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Brito et al. (2010).

**Tabela 2.** *Primers* microssatélites utilizados para genotipagem de cafeeiros de *Coffea arabica*.

Primer	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (3'→5')
CaEST 002 <sup>1</sup>	GAAGGGACAAAGACGCCTAA	CGACAGATGCAGGAATAAACT
SSR 018 <sup>2</sup>	GGCTCGAGATATCTGTTTAG	TTAATGGGCATAGGGTCC
SSR 095 <sup>3</sup>	TAAGAAGCCACGTGACAAGTAA	TATGGCCCTTCTCGCTTTAGTT
SSR 133 <sup>4</sup>	GATACAACCTATCAAACGCATC	CTGTAGGATTGGGTCATTTCC
SSR Ca 018 <sup>5</sup>	GTCTCGTTTCACGCTCTCTC	ATTTTTGGCACGGTATGTTT
SSR Ca 080 <sup>5</sup>	GTTCTTTCCGCCGTCAAT	GAGAAGAGAGAGGAAGGGAA

**Referências:** <sup>1</sup>Ferrão et al. (2015); <sup>2</sup>Combes et al. (2000); <sup>3</sup>Moncada & Mccouch (2004); <sup>4</sup>Poncet et al. (2004); <sup>5</sup>Missio et al. (2009).

## 2.4 Análises genético-estatísticas

### 2.4.1 Análise de variância molecular

Para estimar a diversidade genética entre e dentro das populações, envolvendo os acessos que constituem as populações de Bourbon e de variedade antigas e cultivadas de café, foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) segundo metodologia proposta por Excoffier et al. (1992), utilizando o *software* Genes (CRUZ, 2013). A matriz de dissimilaridade, cujos elementos são os quadrados das distâncias euclidianas entre os pares de acessos ( $D^2$ ), é calculado por:

$$Y_{ij} = U + P_i + D_{ij}$$

$Y_{ij}$  = medida de dissimilaridade entre pares de indivíduos j numa subpopulação i;

U= constante;

$P_i$ = efeito da subpopulação i;

$D_{ij}$ = efeito de dissimilaridade entre pares de indivíduos j na subpopulação i

**Tabela 3.** Análise de variância molecular (AMOVA).

FV	GL	SQ	QM	E (QM)
Entre população	g-1	SQE	QME	$\sigma_i^2 + \tilde{N} \sigma_p^2$
Dentro da população	n-g	SQD	QMD	$\sigma_i^2$
Total	n-1	SQT		$\sigma_t^2$

Onde,

$$\tilde{N} = \frac{N - \sum_i \frac{N_i^2}{N}}{g - 1}$$

sendo  $N_i$  o número de indivíduos ou haplótipos da i-ésima subpopulação.

Estimação do componente de variância que expressam as diferenças entre e dentro de subpopulação:

$$\sigma_i^2 = QMD$$

$$\sigma_p^2 = \frac{QME - QMD}{\tilde{N}}$$

Associação entre componente de variância e estatística  $\Phi_{ST}$ :

$$r = \Phi_{ST} = \frac{cov(Y_{ij}, Y_{ij'})}{\sqrt{V(Y_{ij})V(Y_{ij'})}}$$

O que reflete a correlação da diversidade de haplótipos em diferentes níveis de divisão hierárquica. O  $\Phi_{ST}$  indica a medida da diversidade relativa entre populações:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_p^2}{\sigma_t^2}$$

#### 2.4.2 Análise discriminante

Para identificar a similaridade das populações foi realizada análise discriminante com o método de vizinho médio, a partir dos valores da matriz de distância, obtidos por dados dos marcadores SSR, estabelecido pelo complemento aritmético do índice ponderado cuja similaridade é dada pela quantidade de alelo comum que dois indivíduos compartilham. O índice tem a propriedade de levar em consideração, por meio de ponderação, a quantidade de alelos que cada marcador manifesta. Essas análises foram realizadas utilizando o *software* Genes (CRUZ, 2013).

#### 2.4.3 Redes de similaridade

Neste trabalho foi proposto, para fins de interpretação, o uso da técnica gráfica de rede para representar o padrão de similaridade e dissimilaridade entre os indivíduos de cada população. Por meio das redes de similaridade foram abordadas as relações entre acessos e populações a partir de medida de similaridade considerando as informações de seis marcadores SSR codominante para café arábica. As matrizes de similaridade foram analisadas criando uma similaridade ponderada, em que as conexões entre as variáveis foram determinadas pela “Matriz adjacente”  $A = h(R)$ , com a seguinte função:  $H(rij) = \frac{1}{2} \{sgn(|rij| - \rho) + 1\}$ . Em que:  $\rho$  é o parâmetro "hard threshold", que foi definida como nula, de modo que todas as conexões entre variáveis poderiam ser vistas. A espessura das arestas foi controlada pela aplicação de um valor

de corte igual a 0,3, significando que somente  $|r_{ij}| \geq 0,3$  têm suas arestas em destaque, entretanto essa avaliação não será levada em consideração na visualização gráfica, pois apenas vamos verificar a similaridades entre os acessos e populações. O algoritmo de Fruchterman-Reingold (FRUCHTERMAN & REINGOLD, 1991) foi usado para criar um layout direcionado à força para a rede, no qual a proximidade entre os nós (traços) foi proporcional ao valor absoluto de similaridade entre esses nós. As análises foram realizadas utilizando o portal Genes versão 2017 em integração com o R Versão 3.1.2 (R CORE TEAM, 2015). Dessa forma, a integração da rede de similaridade usou o pacote "Qgraph" (EPSKAMP et al., 2012). Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* Genes (CRUZ, 2013 e CRUZ, 2016). Os indivíduos das populações dos acessos MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117 foram numerados na tabela 4.

**Tabela 4.** Numeração de cada indivíduo das populações de MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117 utilizados nas redes de similaridade.

<b>Numeração</b>	<b>Acesso</b>	<b>Planta</b>	<b>Repetição</b>	<b>Numeração</b>	<b>Acesso</b>	<b>Planta</b>	<b>Repetição</b>
110	0011	1	1	139	0064	9	1
111	0011	1	2	140	0064	9	2
112	0011	2	1	141	0064	10	2
113	0011	3	2	142	0099	1	1
114	0011	4	1	143	0099	1	2
115	0011	5	1	144	0099	2	1
116	0011	5	2	145	0099	2	2
117	0011	6	1	146	0099	3	1
118	0011	6	2	147	0099	3	2
119	0011	7	1	148	0099	4	1
120	0011	7	2	149	0099	5	1
121	0011	8	2	150	0099	6	1
122	0011	9	1	151	0099	6	2
123	0011	9	2	152	0099	10	1
124	0011	10	1	153	0117	1	2
125	0011	10	2	154	0117	2	1
126	0064	1	1	155	0117	2	2
127	0064	1	2	156	0117	3	2
128	0064	2	1	157	0117	4	1
129	0064	2	2	158	0117	4	2
130	0064	3	1	159	0117	5	1
131	0064	3	2	160	0117	5	2
132	0064	4	1	161	0117	6	1
133	0064	5	2	162	0117	6	2
134	0064	6	1	163	0117	7	1
135	0064	6	2	164	0117	7	2
136	0064	7	2	166	0117	8	1
137	0064	8	1	167	0117	9	2
138	0064	8	2	168	0117	10	1

### **2.5 Características morfoagronômicas**

Foram obtidos dados do BAG de café da Epamig de uma avaliação no ano de 2015 de três características morfoagronômicas das quatro populações, MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117. Esses cafeeiros foram plantados no BAG de café da Epamig em 2006 e ainda não foi realizado manejo da poda.

#### *Cor do fruto*

Para esta característica foi avaliado a cor dos frutos de cada planta. Foram atribuídas notas 1, 2 e 3, para cor vermelha, amarela e alaranjada, respectivamente.



### *Cor do broto*

Foi avaliado a cor dos brotos de cada planta, atribuindo notas 1, 2, 3 e 4, para cor verde, bronze claro, bronze e bronze escuro, respectivamente.

### *Altura de planta*

A medição da altura das plantas foi realizada por meio de trena métrica afixada em uma haste de madeira e os dados expressos em metros (m). Para cada população MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117 foi realizada a média aritmética, que pode ser estimada pela seguinte equação

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

onde  $n$  é o número total de valores e  $x_i$  cada valor, em que  $i=1, \dots, n$ . Analisou-se quantos indivíduos encontravam-se abaixo ou acima da média aritmética de sua respectiva população.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### ***3.2 Diversidade genética entre e dentro das populações***

Com base na AMOVA foi explorada a variabilidade genética existente dentro e entre as populações, observou-se uma variação genética maior dentro das populações, correspondente a 64,88%, do que entre as populações com 35,12 % (Tabela 5). Na tabela 5 também foi observado o coeficiente de correlação ( $\phi_{ST}$ ) correspondente a 0,35. Pelo fato do café arábica ser uma planta autógama, esperava-se que tivesse uma menor variabilidade genética dentro da população, apesar da taxa aproximada de 10% de fecundação cruzada (MÔNACO et al., 1963). Isso indica que pode ter ocorrido polinização cruzada no local de coleta, uma vez que o BAG foi formado por sementes de uma planta ou mistura de sementes de várias plantas de uma lavoura. Algumas populações de variedades antigas e cultivadas foram formadas com cafeeiros coletados em diferentes regiões, o que também pode explicar essa variação encontrada dentro da população. Resultados similares foram obtidos por Pestana (2015) que utilizou 10 marcadores SSR para estudar a diversidade genética em 75 acessos de cafeeiros Bourbons, e observou que a variabilidade genética dentro de populações (74,27) foi

maior que entre populações (25,73). Sousa et al. (2016), estudando a utilidade dos marcadores moleculares para discriminar cultivares de café arábica com alta similaridade genética, encontrou segregação entre populações, o que demonstra a eficiência dos marcadores SSR para diferenciar espécies com base genética estreita. Mas também encontrou segregação dentro de populações, indicando variabilidade genética em cada cultivar (seis plantas por cultivar).

**Tabela 5.** Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de acessos das 14 populações, utilizando seis marcadores SSR.

Fonte de variação	GL	SQ	% de variação	ØST
Entre populações	13	51,83	35,12	0,35
Dentro de populações	153	83,02	64,88	
Total	166	134,85	100,00	

### 3.3 Discriminação das populações

A discriminação das populações de acordo com os dados moleculares mostrou que cada população tem similaridade com mais de uma população (Tabela 6). As populações de Catuaí Vermelho e Bourbon Amarelo foram as que tiveram a maior similaridade com elas mesmas, o que representa maior pureza ou maior eficiência dos marcadores na sua caracterização. O Caturra Vermelho e o MG 0011 receberam mais populações similares a eles. Nenhuma população se mostrou similar a MG 0099. As populações de Sumatra, Amarelo de Botucatu, Mundo Novo, Catuaí Amarelo e a MG 0099 não apresentaram similaridade com a sua própria população. O que demonstra grande variação entre indivíduos que constituem cada uma destas populações ou deficiência dos marcadores microssatélites utilizados para caracterizá-las.

As populações Sumatra, Amarelo de Botucatu e Catuaí Amarelo tiveram maior similaridade com a MG 0011. O Mundo Novo foi mais similar ao Catuaí Vermelho. O Bourbon Vermelho foi mais similar em igual proporção ao Bourbon Amarelo, Caturra Vermelho e a ele mesmo. A população de Típica apresentou-se com a maior similaridade na mesma proporção com o MG 0011 e também a ele mesmo. Tanto o Caturra Vermelho quanto o Amarelo foram mais similares ao Caturra Vermelho.

As quatro populações que estavam identificadas como Bourbon no BAG tiveram as seguintes similaridades: a população MG 0011 não apresentou similaridade com o Bourbon Vermelho, como foi identificada no BAG. Os resultados mostraram que teve 75% similaridade com ela mesmo, 12,5 % com Sumatra, 6,25% com Caturra Vermelho

e 6,25% com MG 0117. Dessa forma apresenta maior similaridade com a sua própria população e com Sumatra. A população MG 0064 também não apresentou similaridade com o Bourbon Vermelho, como foi identificada no BAG. Os resultados mostraram que teve 62,5 % de similaridade com ela mesmo, 12,5% com Típica, 6,25% com Bourbon amarelo, 12,5% com Caturra Vermelho e 6,25% com MG 0011. O que indica maior similaridade com a sua própria população e com Caturra Vermelho. A população MG 0099 identificada como Bourbon Vermelho no BAG, apresentou a menor similaridade com esse. Os resultados mostraram que teve 27,27% de similaridade com o MG 0064, 18,18% com o Bourbon Amarelo e o MG 0117. Além de 9,09% de similaridade com o Caturra Amarelo, Bourbon Vermelho, Caturra Vermelho e MG 0011. Dessa forma apresenta maior similaridade com o MG 0064, Bourbon Amarelo e MG 0117. A população MG 0117 não apresentou similaridade com o Bourbon Amarelo, como identificada no BAG. Os resultados mostraram que teve 26,67% com ela mesmo, 46,67% com MG 0011 e 13,33% com Caturra Vermelho e MG 0064. Dessa forma apresentou maior similaridade com ela mesma e o MG 0011. Deve ser destacado que o fato de se verificar alta similaridade da população com ela própria é indicativo de se tratar de uma população com características homogêneas representando um material genético com informações genéticas exclusivas e que sua caracterização como um determinado padrão deverá ser visto de forma cautelosa considerando outras informações de interesse do melhorista.

Era esperado que as populações de variedades antigas e cultivadas, já bem caracterizadas entre os melhoristas, apresentassem 100% de similaridade com a sua própria população. No entanto, como observado na Tabela 6 nem todas populações tiveram essa similaridade com suas respectivas populações de origem. Isso está relacionado tanto ao fato dos indivíduos da mesma população serem originados de diferentes localidades ou serem possíveis híbridos, como também em relação ao fato do café arábica ter uma estreita base genética, tornando as variedades muito aparentadas e com muita similaridade entre elas.

**Tabela 6.** Análises discriminantes de populações de café arábica baseadas no método de vizinho médio, estimado por seis marcadores SSR

População	% de acessos alocados nas diferentes populações*													
	T	S	AB	MN	CV	CA	BA	BV	CAT V	CAT A	MG 0011	MG 0064	MG 0099	MG 0117
Típica (T)	<b>37,5</b>	0	0	0	0	0	25	0	0	0	37,5	0	0	0
Sumatra (S)	0	<b>0</b>	0	10	0	0	10	0	10	0	70	0	0	0
Amarelo de Botucatu (AB)	0	0	<b>0</b>	0	20	0	0	0	0	20	40	20	0	0
Mundo Novo (MN)	0	0	12,5	<b>0</b>	37,5	0	0	0	12,5	0	12,5	12,5	0	12,5
Catuaí Vermelho (CV)	0	0	0	0	<b>62,5</b>	0	0	0	25	0	12,5	0	0	0
Catuaí Amarelo (CA)	0	0	0	0	25	<b>0</b>	12,5	0	12,5	0	37,5	0	0	12,5
Bourbon Amarelo (BA)	13,04	0	4,35	0	0	0	<b>30,34</b>	13,04	26,09	0	0	13,04	0	0
Bourbon Vermelho (BV)	4,35	0	0	0	0	0	26,09	<b>26,09</b>	26,09	4,35	4,35	8,7	0	0
Caturra vermelho (CAT V)	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>62,5</b>	0	12,5	12,5	0	12,5
Caturra amarelo (CAT A)	12,5	0	12,5	0	0	0	0	25	37,5	<b>0</b>	12,5	0	0	0
MG 0011	0	12,5	0	0	0	0	0	0	6,25	0	<b>75</b>	0	0	6,25
MG 0064	12,5	0	0	0	0	0	6,25	0	12,5	0	6,25	<b>62,5</b>	0	0
MG 0099	0	0	0	0	0	9,09	18,18	9,09	9,09	0	9,09	27,27	<b>0</b>	18,18
MG 0117	0	0	0	0	0	0	0	0	13,33	0	46,67	13,33	0	<b>26,67</b>

\*Os valores em negrito referem-se à percentagem de alocação dos acessos que constituem as populações em suas respectivas populações de origem.

### ***3.4 Redes de similaridade***

Neste trabalho foi proposto o uso da técnica gráfica de rede para representar o padrão de similaridade e dissimilaridade entre os indivíduos e população. Dessa forma com o intuito de saber qual população pertence as populações MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117 que foram numeradas na Tabela 4, ou com qual variedade seus indivíduos são mais similares foi realizada a análise denominada de rede de similaridade. Por meio desta rede foi possível analisar o comportamento de cada indivíduo dessas populações que foram identificadas como Bourbon no BAG, diante aquelas populações que tiveram mais similaridade na análise discriminante.

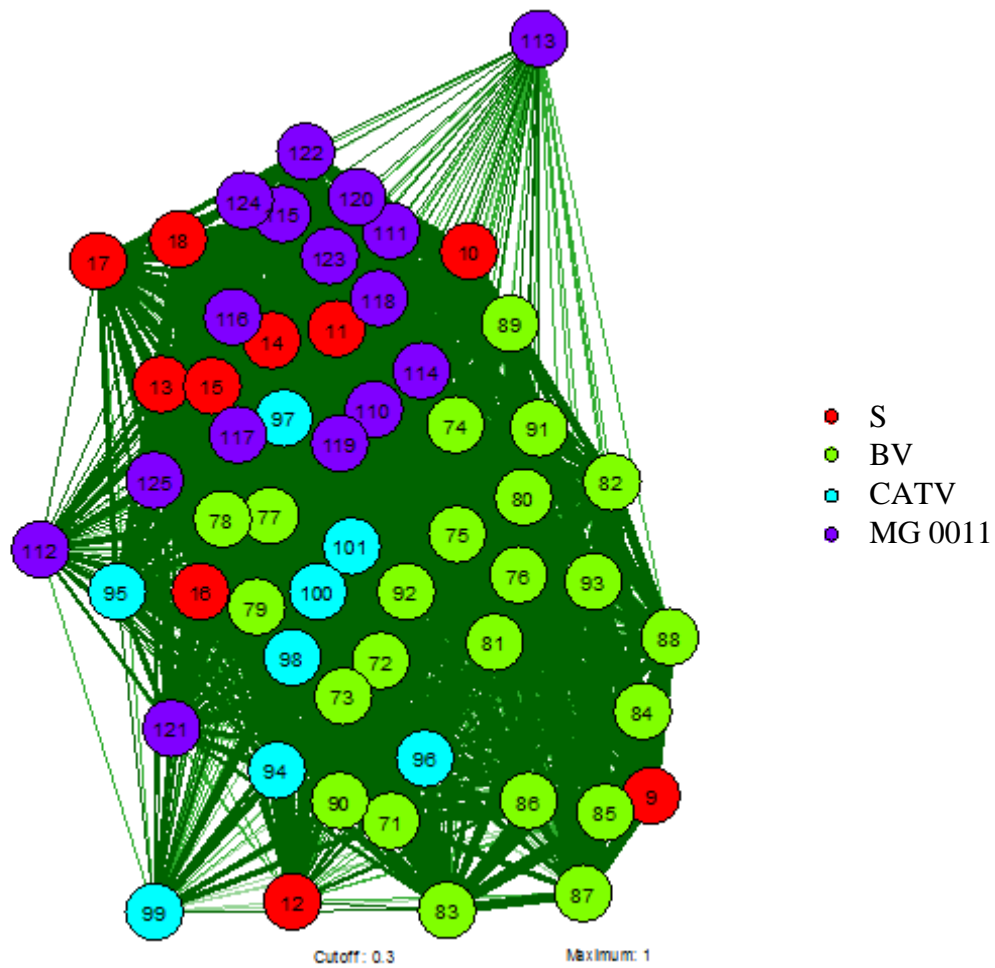
Para o MG 0011 a rede de similaridade foi realizada com as populações de Sumatra, Bourbon Vermelho e Caturra Vermelho (Figura 1). No geral todos os indivíduos da população MG 0011 foram geneticamente mais similares a população de Sumatra. Apenas os indivíduos 112, 113 e 121 se mostraram mais distantes geneticamente do restante dos indivíduos dessa população. O MG 0011 foi identificado como Bourbon Vermelho no BAG da Epamig, no entanto, na disposição da Figura 1 as populações do MG 0011 e Bourbon vermelho estão mais distantes geneticamente.

Para o MG 0064, a rede de similaridade foi realizada com as populações de Típica, Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho e Caturra Vermelho (Figura 2). De modo geral os indivíduos do MG 0064 foram mais divergentes, exceto os indivíduos 132, 133, 135, 137 e 138. A partir dessa análise os indivíduos que mais se aproximaram dessa população foram os da população de Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho e Caturra Vermelho. No BAG da Epamig o MG 0064 foi classificado como Bourbon Vermelho.

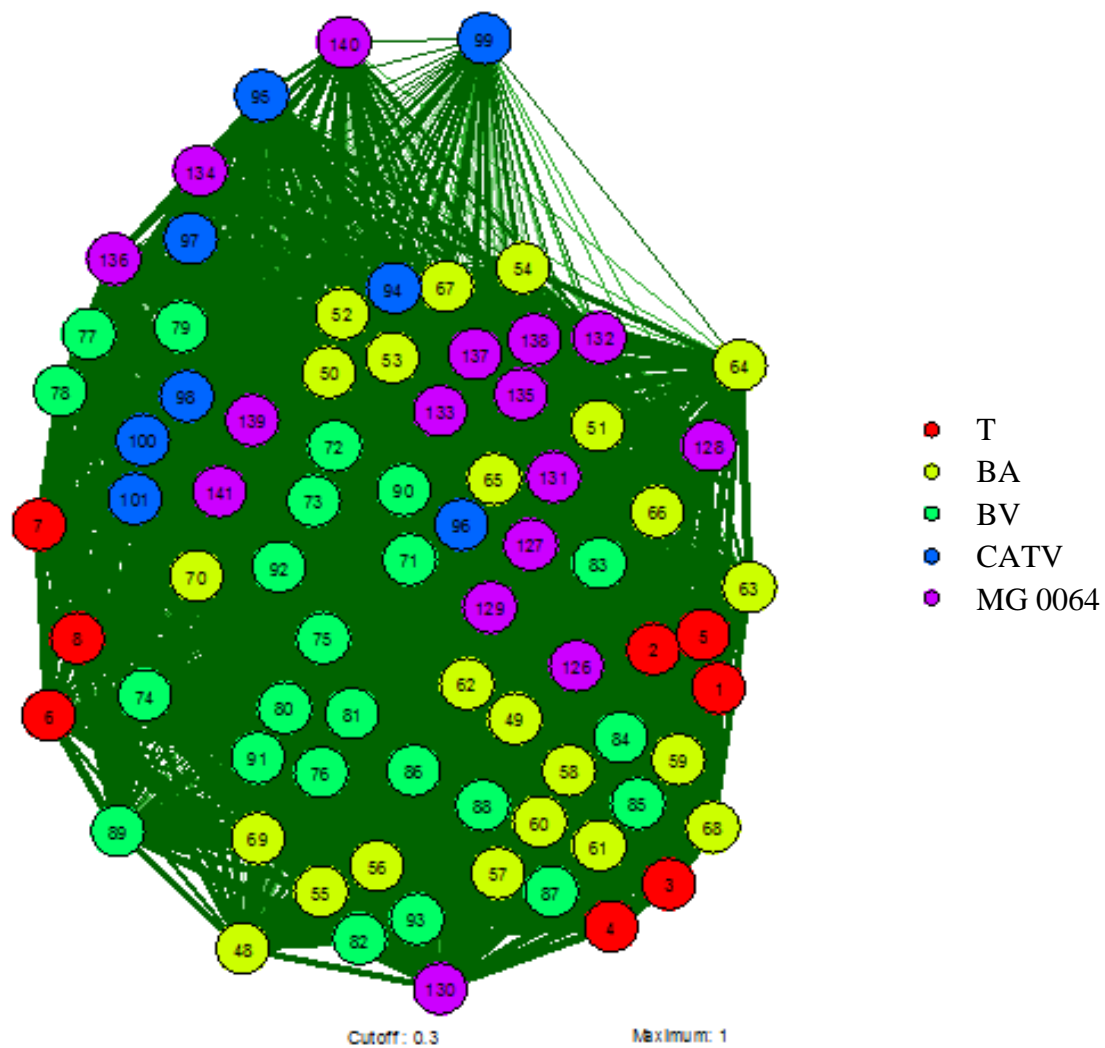
Para o MG 0099, a rede de similaridade foi realizada com as populações de Catuaí Amarelo, Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho e Caturra Vermelho (Figura 3). Os indivíduos dessa população foram divergentes entre si. Os indivíduos 143, 145, 147 e 150 foram mais similares a indivíduos da população de Bourbon Amarelo e Bourbon Vermelho. Os indivíduos 142, 148 e 149 mais similares a indivíduos da população de Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho e Caturra Vermelho. O indivíduo 152 mais similar a indivíduos da população de Bourbon Vermelho e Caturra Vermelho. E os indivíduos 144, 146 e 151 foram geneticamente distintos de todos os outros indivíduos pertencentes a essa rede. O MG 0099 está identificado como Bourbon Vermelho VD no BAG da Epamig, no entanto, na rede de similaridade os indivíduos não se apresentaram similares apenas aos Bourbon Vermelhos, mas também a outras populações.

Para o MG 0117, a rede de similaridade foi realizada com as populações de Catuaí Amarelo, Bourbon Amarelo, Caturra Vermelho e Caturra Amarelo (Figura 4). Os indivíduos dessa população foram geneticamente similares e não tiveram similaridade com os da população de Bourbon Amarelo como estavam identificados no BAG da Epamig. Os indivíduos 154, 155, 158, 161, 162 e 165 foram similares aos indivíduos da população de Catuaí Amarelo. Alguns também se mostraram similares a população de Caturra Vermelho, como os indivíduos 155, 156, 157, 163 e 166.

Esses resultados indicam que, mesmo utilizando um número maior de indivíduos do que usado por Pestana (2015), as populações MG 0011, MG 0064 e MG 0099 não pertencem a cafeeiros de Bourbon Vermelho e o MG 0117 não pertence a cafeeiros de Bourbon Amarelo. O MG 0011 possui 13 dos seus indivíduos similares a população de Sumatra. O MG 0064 e MG 0099 não se encontraram bem definidos, cada uma dessas populações, não apresentaram indivíduos geneticamente parecidos e estão próximos a mais de uma população, o que indica que essas populações contenham indivíduos híbridos, possivelmente resultantes da hibridação natural no local de coleta. Os indivíduos da população MG 0117 apresentaram maior proximidade genética entre eles e 12 dos seus indivíduos foram mais similares aos da população de Catuaí Amarelo, que é caracterizado por porte baixo.

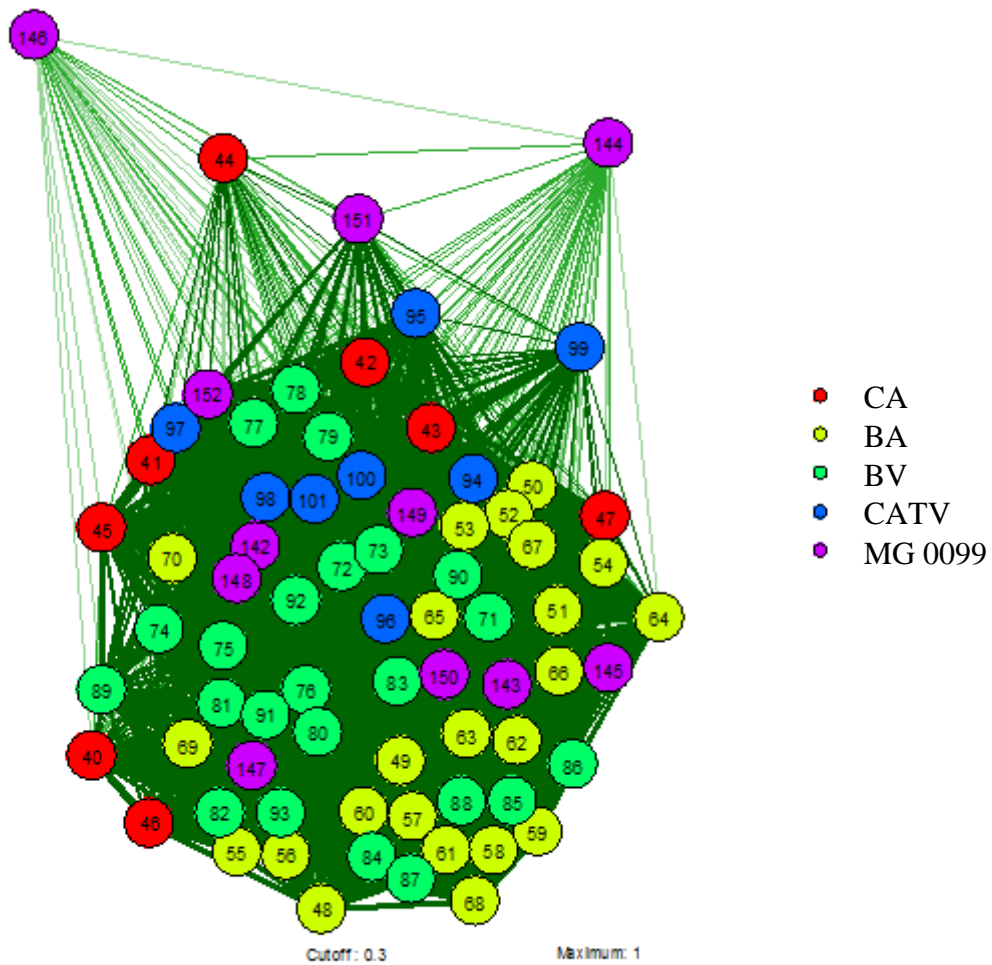


**Figura 1.** Redes de similaridade dos indivíduos MG 0011 com os indivíduos das populações Sumatra (S), Bourbon Vermelho (BV) e Caturra Vermelho (CATV).

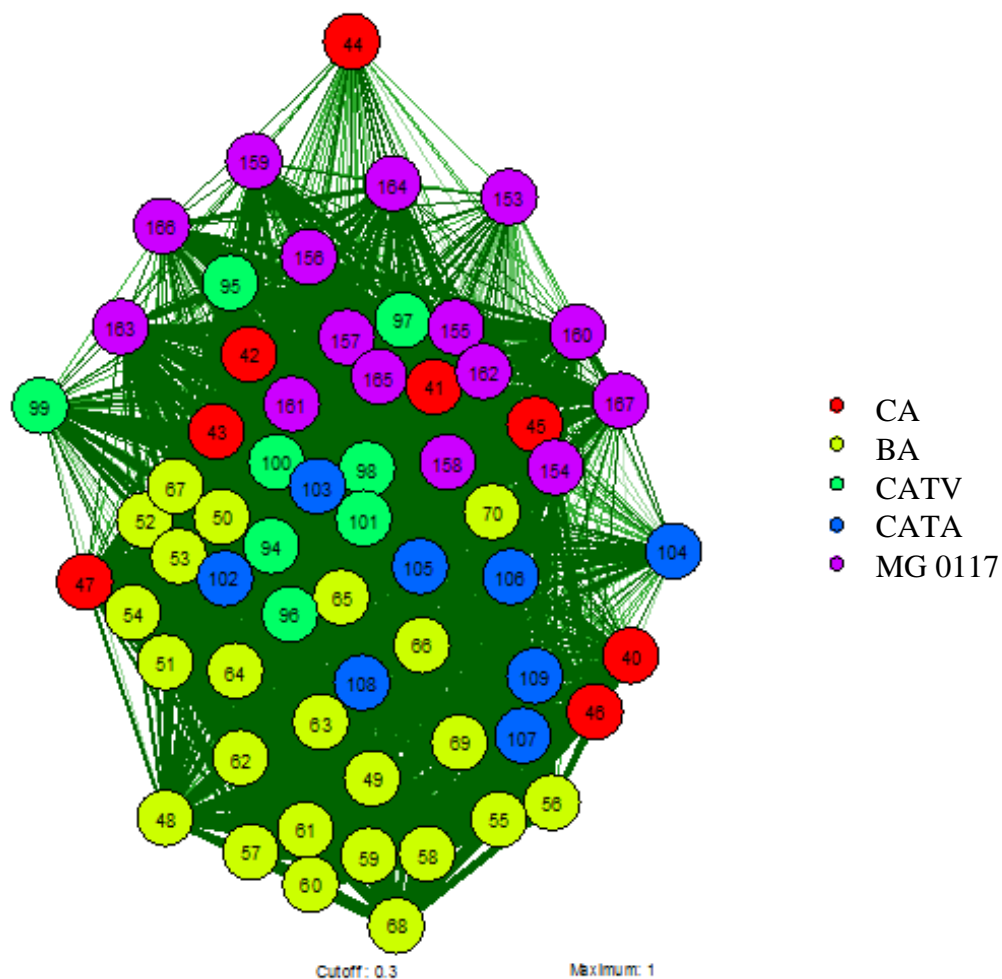


**Figura 2.** Redes de similaridade dos indivíduos MG 0064 com os indivíduos das populações Típica (T), Bourbon Amarelo (BA), Bourbon Vermelho (BV) e Caturra Vermelho (CATV).





**Figura 3.** Redes de similaridade dos indivíduos MG 0099 com os indivíduos das populações Catuaí Amarelo (CA), Bourbon Amarelo (BA), Bourbon Vermelho (BV) e Caturra Vermelho (CATV).



**Figura 4.** Redes de similaridade dos indivíduos MG 0117 com os indivíduos das populações Catuaí Amarelo (CA), Bourbon Amarelo (BA), Caturra Vermelho (CATV) e Caturra Amarelo (CATA).

### 3.1 Características morfoagronômicas

As notas atribuídas aos caracteres cor de fruto, cor de broto e altura de planta de cada indivíduo das populações MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117 estão apresentados na tabela 7.

Observou-se fruto vermelho para todos indivíduos da população MG 0011, MG 0064 e MG 0099. A cor do broto para a população MG 0011 foi verde, bronze claro, bronze e bronze escuro, com nove, dois, quatro e um indivíduos, respectivamente. Para a população MG 0064 a cor do broto foi verde, bronze claro e bronze, com seis, um e nove indivíduos, respectivamente. A população MG 0099 também teve cor de broto verde, bronze claro e bronze, com cinco, três e três indivíduos, respectivamente. Diferentemente das populações acima, todos os indivíduos da população MG 0117 apresentaram cor de fruto amarelo e cor de broto verde.

A altura média da população MG 0011 foi de 3,89 metros, oito indivíduos tiveram altura acima da média e oito abaixo. A população MG 0064 teve altura média de 4,06 metros, com dez indivíduos acima da média e seis abaixo. Já as populações MG 0099 e MG 0117 tiveram mais indivíduos abaixo das médias 3,85 metros e 3,37 metros, respectivamente, a primeira com cinco acima da média e seis abaixo e a segunda com sete acima e oito abaixo.

Diante desses resultados, as populações MG 0011, MG 0064 e MG 0099 identificadas no BAG de café da Epamig como Bourbon Vermelho, tiveram frutos vermelhos, o que corresponde a cor dos frutos dessa variedade. Os indivíduos dessas populações tiveram variação na cor do broto, e o típico para Bourbon Vermelho é broto verde. As variedades Típica e Sumatra possuem cor de broto bronze claro, e a variedade Mundo Novo a cor bronze. Isso indica que alguns indivíduos das populações MG 0011, MG 0064 e MG0099 podem pertencer a uma dessas variedades, mas também podem ser resultantes de hibridação natural. Os indivíduos da população MG 0117 tiveram seus frutos amarelos e os brotos verdes, o que é esperado para Bourbon Amarelo, e é como foi identificada no BAG de café da Epamig. Em relação a altura das plantas no geral todas as populações apresentaram porte médio a alto, exceto a população MG 0117 que teve a menor média da altura das plantas. Isso sugere que alguns indivíduos dessa população não sejam Bourbon Amarelo, e sim alguma variedade de porte mais baixo, como Catuaí e Caturra.

Comparando as características morfoagronômicas com a análise por redes de similaridades, a população MG 0011 através dessa análise apresentou maior parte dos seus indivíduos similares a população de Sumatra. E as características morfoagronômicas do MG 0011 são semelhantes as de Sumatra. A população MG 0117 por rede de similaridade foi mais similar a população de Catuaí Amarelo. As características morfoagronômicas do MG 0117 são frutos amarelos, brotos verdes e uma altura média mais baixa que as outras populações é o que não é típico de Bourbon Amarelo, evidenciando que os indivíduos da população MG 0117 podem ser Catuaí Amarelo. As populações MG 0064 e MG 0099 através da rede de similaridade não tiveram seus indivíduos similares a uma população exclusiva, dessa forma a comparação com as características morfoagronômicas é dificultada.

**Tabala 7.** Avaliação de características morfoagronômicas do BAG de café da EPAMIG (2015).

<b>Código</b>	<b>Planta</b>	<b>Repetição</b>	<b>Cor de fruto<sup>1</sup></b>	<b>Cor de Broto<sup>2</sup></b>	<b>Altura de planta (m)</b>	<b>Média (m)</b>
0011	1	1	1	4	4,00	3,89
	1	2	1	1	3,52	
	2	1	1	1	3,55	
	3	2	1	3	4,05	
	4	1	1	1	3,80	
	5	1	1	1	4,12	
	5	2	1	2	4,15	
	6	1	1	1	3,95	
	6	2	1	1	4,15	
	7	1	1	1	3,54	
	7	2	1	1	3,78	
	8	2	1	3	3,85	
	9	1	1	3	4,10	
	9	2	1	1	3,84	
10	1	1	3	3,62		
10	2	1	2	4,27		
0064	1	1	1	1	4,22	4,06
	1	2	1	3	4,15	
	2	1	1	1	4,10	
	2	2	1	3	3,70	
	3	1	1	2	4,35	
	3	2	1	3	4,10	
	4	1	1	1	4,10	
	5	2	1	3	4,14	
	6	1	1	3	4,00	
	6	2	1	3	3,80	
	7	2	1	1	3,70	
	8	1	1	1	4,00	
	8	2	1	1	4,23	
	9	1	1	3	4,22	
9	2	1	3	4,20		
10	2	1	3	4,00		
0099	1	1	1	3	3,73	3,85
	1	2	1	1	3,50	
	2	1	1	3	4,10	
	2	2	1	2	3,70	
	3	1	1	1	3,78	
	3	2	1	1	3,80	
	4	1	1	2	4,06	
	5	1	1	1	3,67	
	6	1	1	3	3,99	
	6	2	1	2	4,00	

**Tabela 7.** Continuação...

<b>Código</b>	<b>Planta</b>	<b>Repetição</b>	<b>Cor de fruto<sup>1</sup></b>	<b>Cor de Broto<sup>2</sup></b>	<b>Altura de planta (m)</b>	<b>Média (m)</b>
0099	10	1	1	1	4,00	3,85
	1	2	2	1	3,10	
	2	1	2	1	3,90	
	2	2	2	1	3,50	
	3	2	2	1	3,80	
	4	1	2	1	3,00	
	4	2	2	1	3,84	
	5	1	2	1	3,10	
0117	5	2	2	1	3,60	3,37
	6	1	2	1	3,77	
	6	2	2	1	3,00	
	7	1	2	1	2,95	
	7	2	2	1	3,00	
	8	1	2	1	3,10	
	9	2	2	1	3,75	
	10	1	2	1	3,18	

<sup>1</sup>1= Fruto de cor vermelha; 2= Fruto de cor amarela; <sup>2</sup>1= Broto de cor verde; 2= Broto de cor bronze claro; 3= Broto cor de bronze; 4= Broto de cor bronze escuro.

#### 4. CONCLUSÕES

i) As populações MG 0011, MG 0064, MG 0099 apesar de identificados no BAG de café da Epamig como Bourbon Vermelho e o MG 0117 como Bourbon Amarelo, de acordo com as características morfoagronômicas, análise discriminante e rede de similaridade não foram classificados como Bourbon Vermelho e Bourbon Amarelo, respectivamente.

ii) A análise discriminante indicou que tanto as populações de variedades antigas e cultivadas, como as MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117 possuem similaridade com mais de uma população e em alguns casos não apresentaram similaridade com a sua própria população. Para as variedades antigas e cultivadas isso indica origem diferente dos acessos que constituem as populações. Para os MG 0011, MG 0064, MG 0099 e MG 0117 indica presença de híbridos.

iii) A rede de similaridade mostrou que os indivíduos das populações MG 0011 e MG 0117 são geneticamente mais próximos, a primeira foi mais similar a variedade Sumatra

e a segunda a variedade Catuaí Amarelo Também se observou que os acessos MG 0064 e MG 0099 são mais divergentes, o que dificulta classificá-los como similares a uma variedade específica.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, v. 118, n. 1, p. 53–65, 2001.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Recursos Genéticos. In: BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013.
- BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; GALLINA, A. P.; MACIEL ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M. E. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, v. 173, p. 255-264, 2010.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. **Plant Systematics and Evolution**, v. 274, p. 237-241, 2008.
- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**. V. 38, n. 4, p. 547-552, 2016
- COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C. DA; LÉDO, A. DA S.; SANTOS, A. R. F. DOS; SILVA JÚNIOR, J. F. DA. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 5, p. 499–507, 2011.
- COMBES, M. C.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; ROVELLI, P.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. C. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1178-1180, 2000.
- DINIZ, L. E. C.; SAKIYAMA, N. S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; LOUREIRO, M. E.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Analysis of AFLP markers associated to the *Mex-1* resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 387-393, 2005.
- EIRA, M. T. S.; FAZUOLI, L. C.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B.; FERRÃO, M. A.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; SERA, T.; PEREIRA, A.A.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; CARVALHO, C. H.; PADILHA, L.; SOUZA, F. F (2007). Bancos de germoplasma de café no Brasil: base do melhoramento para produtividade e qualidade. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil, Águas de Lindóia-SP.
- EPSKAMP, A.; CRAMER, A.O.J.; WALDORP, L.J.; SCHMITTMANN, V.D.; BORSBOOM, D. qgraph: Network Visualizations of Relationships in Psychometric Data. **Journal of Statistical Software**, v. 48, n. 4, p. 1-18, 2012.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance

inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics Society of America**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FERRÃO, L. F. V.; CAIXETA, E. T.; PENA, G.; ZAMBOLIM, E. M.; CRUZ, C. D.; ZAMBOLIM, L.; FERRÃO, M. A. G.; SAKYAMA, N. S. New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. **Molecular Breeding**, v. 35, n. 1, p. 31, 2015.

FERREIRA, A. D.; CARVALHO, G. R.; REZENDE, J. C. DE; BOTELHO, C. E.; REZENDE, R. M.; CARVALHO, A. M. Desempenho agrônomo de seleções de café Bourbon Vermelho e Bourbon Amarelo de diferentes origens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 388–394, 2013.

FRUCHTERMAN, T.; REINGOLD, E. Graph drawing by force-directed placement. **Software – Practice & Experience**, 21, 11, pp. 1129-1164, 1991.

GELETA, M.; HERRERA, I.; MONZÓN, A.; BRYNGELSSON, T. Genetic Diversity of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as Estimated by Simple Sequence Repeat Markers. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B.; COMBES, M. C.; DUSSERT, S.; GRAZIOSI, G.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 100, p.139-146, 2000.

LÓPEZ-GARTNER, G.; CORTINA, H.; MCCOUCH, S. R.; MONCADA, M. D. P. Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, n. 3, p. 435–446, 2009.

MENDES, A. N. G.; CARVALHO, G. R.; BOTELHO, C. E.; FAZUOLI, L. C.; SILVAROLLA, M. B. História das primeiras cultivares de café plantadas no Brasil. In: CARVALHO, C. H. S. Cultivares de Café. Brasília, DF: Embrapa Café, 2008.

MISSIO, R. F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Development and validation of SSR markers for *Coffea Arabica* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 361-371, 2009.

MÔNACO, L. C.; CARVALHO, A.; ANTUNES FILHO, H. Cruzamento natural dentro da "cova" do cafeeiro. **Bragantia**, v. 22, n. 4, p. XI-X4, 1963.

MONCADA, P.; MCCOUCH, S. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. **Genome**, v. 47, n. 3, p. 501-509, 2004.

OLIVEIRA, A. C. B.; MALUF, M. P. Diversidade em *Coffea spp.* **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, 2007.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. Cultura de café: histórico, classificação botânica e fases de crescimento. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, p. 17-32, 2012.



PEREIRA, M. G.; RAMOS, H. C. C.; PEREIRA, T. N. S.; BATISTA, F. R. C. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2016.

PESTANA, R. K. N. Caracterização molecular de cafeeiros do germoplasma Bourbon. 2015. 121 f. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

PONCET, V.; HAMON, P.; MINIER, J.; CARASCO, C.; HAMON, S.; NOIROT, M. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea spp.*). **Genome**, v. 47, n. 6, p. 1071-1081, 2004.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015.

RODRIGUES JR, C.J.; BETTENCOURT, A. J.; RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual review of phytopathology**, v. 13, 1975.

SANTOS, D. M. C.; BESA, C. F. F.; VICTORIA, A.J. A.; CAO, E. P. Simple sequence repeat analysis of selected NSIC-registered Coffee varieties in the Philippines. **Science Diliman**, v. 28, n. 1, p. 5–16, 2016.

SETOTAW, T. A.; CAIXETA, E. T.; PEREIRA, A. A.; OLIVEIRA, A. C. B.; CRUZ, C. D.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Coefficient of parentage in *Coffea arabica* L. Cultivars Grown in Brazil. **Crop Science**, v. 53, p. 1237-1247, 2013.

SOUSA, T. V.; CAIXETA, E. T.; ALKIMIN, E. R.; OLIVEIRA, A. C. B.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. **Euphytica**, v. 213, n. 3, p. 75, 2017.

TERESSA, A.; CROUZILLAT, D.; PETIARD, V.; BROUHAN, P. Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) collections. **Ethiopian Journal of Applied Sciences and Technology**, p. 63–79, 2010.

VEGA, F. E.; EBERT, A. W.; MING, R. Coffee Germoplasm Resources, Genomics, and Breeding. **Plant Breeding Reviews**, v. 30, 2008.