

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOÃO VICTOR NUNES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS ENTRE CAFEZEIROS SENSÍVEIS E
TOLERANTES A SECA UTILIZANDO MARCADORES AFLP**

PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2018

JOÃO VICTOR NUNES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS ENTRE CAFEEIROS SENSÍVEIS E
TOLERANTES A SECA UTILIZANDO MARCADORES AFLP**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia

Prof(a). Dr(a). Terezinha Aparecida Teixeira

PATOS DE MINAS – MG

DEZEMBRO DE 2018

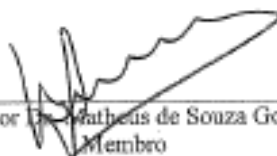
Identificação de polimorfismos entre cafeeiros sensíveis e tolerantes a seca utilizando marcadores AFLP

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Banca examinadora:



Professora Dra. Terezinha Aparecida Teixeira
Presidente



Professor Dr. Mathheus de Souza Gomes
Membro



Professor Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes
Membro

Patos de Minas, 03 de Dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a família por todo apoio prestado em minha vida;

Ao meu já falecido pai pelos ensinamentos e apoio durante o seu tempo presente;

Ao meu amigo de adolescência Ângelo Borges de Melo Neto pela ajuda durante o curso e a vida;

À professora Dr(a). Terezinha Aparecida Teixeira pela oportunidade de trabalho, apoio em laboratório e disponibilidade de tempo;

Ao corpo docente da Universidade Federal de Uberlândia pelas aulas ministradas e conhecimentos compartilhados;

Ao corpo técnico do Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) e dos demais laboratórios da UFU Patos de Minas os quais contribuíram para a pesquisa;

Aos meus colegas de sala e de outras turmas os quais me ajudaram durante o curso;

À Empresa de Pesquisa de Minas Gerais (EPAMIG) e ao Centro Universitário do Cerrado Patrocínio (UNICERP) pelo fornecimento do material biológico para estudo.

RESUMO

O cafeeiro é uma planta bem distribuída em todo mundo e constitui um dos principais produtos agrícolas do Brasil, ocupando posições de destaque em produção e consumo. Entretanto, a alta demanda por nutrientes e água faz com que esse organismo apresente quadros de estresse, os quais contribuem para quedas significativas na produção. Com isso, o vegetal desenvolveu caracteres morfológicos e moleculares para lidar com esse cenário, os quais são explorados no melhoramento. Para a seleção e obtenção de cultivares com características agronômicas de interesse utilizam-se de marcadores fenotípicos e moleculares. Desse modo, o presente trabalho objetivou obter híbridos tolerantes a seca, resistentes à ferrugem e detentores de qualidade de bebida por meio de cruzamento entre os parentais Siriema AS1 e Catiguá MG2, bem como a obtenção de polimorfismos entre eles por meio da técnica AFLP. Os cruzamentos foram satisfatórios com a germinação de 78 das 92 sementes obtidas e a qualidade do DNA foi determinada por leitura em espectrofotômetro e corrida em gel de agarose 0.8%. A análise dos géis após a amplificação com quatro combinações de *primers* (E-AAC/M-CAA, E-ACT/M-CAA, E-ACC/M-CAG e E-AAC/M-CTG) revelou 14 bandas polimórficas de um total de 82 bandas amplificadas, as quais podem estar relacionadas com características que diferem os parentais, dentre elas a tolerância ao estresse hídrico. A associação das bandas polimórficas com a tolerância ao estresse hídrico demanda o avanço de gerações e a análise das plantas das populações segregantes quanto a tolerância ao estresse hídrico.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Catiguá MG2. Siriema AS1. Marcadores moleculares

ABSTRACT

The coffee tree is a well distributed plant by the planet and constitutes one of the main agricultural products in Brazil making him occupy spotlight positions in production and consumption. However, the high demand of nutrients and water makes this organism presents stress conditions which contribute for quite significant falls in the production. Thereby, the vegetable developed morphological and molecular characters to deal with this scenario, which are explored for breeding. For the selection and obtainment of cultivars with agronomic traits of interest is used phenotypic and molecular markers. Thus, the present work objected the obtainment hybrids that are drought tolerant, leaf rust resistant and holders of beverage quality by crossing Siriema AS1 and Catiguá MG2 parental, as well as the obtainment of the polymorphisms between them trough the AFLP technique. The crosses were satisfactory with the germination of 78 in 92 obtained seeds and the DNA quality was determined by reading in spectrophotometer and running in 0.8% agarose gel. The gel analysis after the amplification with four primers combinations (E-AAC/M-CAA, E-ACT/M-CAA, E-ACC/M-CAG e E-AAC/M-CTG) revealed 14 polymorphic bands of a total of 82 amplified bands, which may be related with characters that differ the parental, among them the drought stress tolerance. The association of polymorphic bands with the drought tolerance demands the advancement of generations and the analysis of the plants in the segregating population as drought stress tolerance.

Keywords: Coffea arabica. Catiguá MG2. Siriema AS1. Molecular markers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA : ácido abscísico

AP2/EREBP : Apetala2/proteína elemento de ligação responsivo a etileno

ABFs : Fatores de ligação dependentes de ácido abscísico

AREBs : Proteínas elemento de ligação dependentes de ácido abscísico

abf3 : Fator de ligação dependente de ácido abscísico 3

areb1: Proteína elemento de ligação dependente de ácido abscísico 1

areb 2 : Proteína elemento de ligação dependente de ácido abscísico 2

AFLP : Polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados

CDPKs : Proteínas kinases dependentes de cálcio

°C : Graus célsius

CIA: Clorofórmio álcool isoamílico

cm : centímetros

CTAB: Brometo de Cetrinônio

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNTps : deoxirribonucleotídeo

DREBs : Elementos de ligação responsivos a desidratação

DREB1D : Elemento de ligação responsivo a desidratação 1D

EDTA : Ácido etilenodiamino tetra-acético

g : Grama

HCL : Ácido clorídrico

L : Litros

M : Molar

m: Mili (10^{-3})

MAPKS : Proteínas kinases mitogênicas

mg : Miligrama

min : Minutos

mL : Mililitro

mm: Milímetros

n : Nano (10^{-9})

Na2 : Sódio

NaCl : Cloreto de sódio

ng : Nanograma

nM : Nanômetro

pb : Pares de bases

PCR : reação em cadeia da polimerase

pH : Potencial hidrogeniônico

PVP : Polivinilpirrolidona

RADP : Polimorfismo randômico de DNA amplificado

ROS : Espécies reativas de oxigênio

s : Segundos

SSRs : Repetições simples de sequências (microsatélites)

TBE : Tris Borato EDTA

TE : Tris EDTA

U : Unidades

V : Volts

μL : Microlitros (10^{-6})

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Café: generalidades e estatísticas.....	11
2.2 Café: questão da água e estresse.....	12
2.3 Café: melhoramento genético.....	15
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Cruzamentos e extração de DNA.....	19
4.2 Digestão do DNA genômico e ligação dos adaptadores	20
4.3 Reações de pré amplificação e amplificação	21
4.4 Montagem do gel de poliacrilamida e eletroforese	22
4.5 Revelação com nitrato de prata	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Resultados dos cruzamentos.....	24
5.2 Extração, digestão, pré amplificação e amplificação.....	24
5.3 Padrão de bandas e polimorfismos.....	25
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país prioritariamente agrícola e, devido a isso, figura entre as posições de destaque no quesito produção e consumo de produtos agrícolas. Entre as commodities produzidas o café se destaca, visto que, está sempre presente entre os dez principais produtos exportados, o que faz com que o Brasil seja referência mundial quanto à sua produção e exportação. Diante desse cenário, o café foi responsável por movimentar 5,2 bilhões de dólares em 2017, oriundos de uma produção proveniente de propriedades distribuídas em estados do sudeste, norte, centro-oeste e nordeste as quais somaram 2 milhões de hectares em 1900 municípios, envolvendo cerca de 300 mil produtores, desde grande a pequenos (MAPA, 2018).

Como todo organismo vivo, o cafeeiro está sujeito a efeitos do ambiente que o cerca respondendo de forma diferente, de acordo com as condições às quais esta submetido, necessitando, portanto, cuidados para atingir a produção ótima. A planta sofre com os chamados estresses abióticos, os quais prejudicam consideravelmente a atividade produtiva. Dentre eles, o estresse hídrico, estresse abiótico causado por respostas do organismo em falta de água, merece destaque. Dessa forma, é preciso realizar cultivo irrigado a fim de fornecer esse recurso para o cafeeiro, onde são empregados maquinários com alto custo de aquisição e manutenção e isso, aliado ao custo da água propriamente dita, o que tira a competitividade de pequenos e médios produtores.

A alternativa mais viável para redução de custos seria o desenvolvimento de programas de melhoramento genético à fim de se buscar materiais resistentes ao estresse hídrico, que possam produzir normalmente, reduzindo o custo com irrigação e, buscando outras características como qualidade de bebida, resistência ao bicho mineiro e à ferrugem. Diante disso, técnicas biotecnológicas para auxílio aos programas de melhoramento são utilizadas a fim de otimizar a atividade possibilitando a obtenção de novas cultivares em menores períodos de tempo. Dentre essas metodologias destaca-se o emprego de marcadores de seleção, buscando características de interesse como os marcadores AFLP, à fim de se conhecer os polimorfismos, os quais são de extrema importância em programas de melhoramento genético vegetal.

Sendo assim, é importante a identificação de polimorfismos entre cultivares de café Catiguá MG2 e Siriema AS1, que posteriormente poderão ser ligados às características de interesse, como tolerância a seca e resistência ao bicho mineiro, para aplicações em programas de melhoramento genético do cafeeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Café: generalidades e estatísticas

O cafeeiro é uma planta pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, o qual compreende cerca de 124 espécies dispersas em várias partes do planeta e cultivadas em mais de 60 países. Dentre essas espécies existem duas que se destacam no cenário mundial no quesito produção e consumo que são *Coffea arabica* e *Coffea canephora* as quais representam 70 % e 30 %, respectivamente, do mercado mundial movimentando valores consideráveis como em 2009/2010, quando 15.9 bilhões de dólares foram registrados (BUDZINSKI et al., 2010; RAZAFINARIVO et al., 2012).

No Brasil, o cenário atual contribui de maneira significativa para esses números, visto que, o grão de café figura entre os principais produtos agrícolas do mercado ocupando posição de destaque nas exportações, onde oscila entre os dez principais produtos. Devido a isso, o país recebe reconhecimento na produção e comércio desse produto alcançando números expressivos como em 2017 quando, o produto foi responsável por levar o país ao primeiro lugar no quesito produção e exportação e à segunda colocação quanto ao consumo desse recurso, movimentando 5.2 bilhões de dólares provenientes da produção de 1900 municípios em diversos estados e envolvendo cerca de 300 mil produtores.(MAPA., 2018).

As formas de utilização do café são diversas, porém, a mais comum delas é na produção da bebida, a qual figura entre as mais apreciadas pela população mundial (POOLE et al., 2017). Nesse aspecto, o grão de *C. arabica* é preferido por ser capaz de dar origem a uma infusão com maior acidez e qualidade superior à aquela originada pelos grãos de *C. canephora* e isso explica por que há uma diferença considerável na comercialização dessas espécies (PERROIS et al., 2015). Essa qualidade de bebida é atribuída a alguns de seus mais de 1000 componentes dos quais fazem parte lipídeos, proteínas e cafeína. A cafeína juntamente com o ácido clorogênico, também presente em níveis interessantes, são responsáveis por garantir amargor que, aliado a características de sabor, provenientes da interação entre sacarose e aminoácidos, constituem parâmetros interessantes para garantir excelência ao produto e justificar a sua grande procura (PERROIS et al., 2015; POOLE et al., 2017).

Para o cultivo do cafeeiro deve-se atentar a particularidades no que diz respeito ao ambiente utilizado. Diante disso, para que plantas de *C. arabica* se desenvolvam bem é preciso ter temperaturas variando entre 18 °C e 23 °C com índices pluviométricos bem definidos, variando de 1600 a mais de 2000 mm e altitudes de 1500 a 2800 metros, condições essas, semelhantes às do seu local de origem. Já para indivíduos da espécie *C. canephora* são demandadas áreas com temperaturas entre 22 °C e 26 °C, altitudes que não ultrapassem 800 metros e índices pluviométricos bem superiores a 2000 mm. Portanto, *C. canephora* é uma espécie mais tolerante a altas temperaturas e capaz de crescer em altitudes bem menores (CAMARGO, 2010).

Outro aspecto bastante relevante na implantação da lavoura cafeeira é a questão da nutrição do vegetal, a qual se apresenta como fator limitante para a obtenção de sucesso nessa atividade. Devido a isso, embora o aspecto nutricional seja preponderante e capaz de contribuir para alta ou baixa produtividade, ele não se trata apenas de um item quantitativo, onde grandes quantidades de nutrientes vão garantir produções elevadas, esse apresenta também um caráter qualitativo. Em consequência disso, a lavoura de café é classificada como uma que demanda uma alta exigência nutricional a qual é composta por minerais como Ferro, Magnésio, Cobre e Zinco e outros nutrientes mais relevantes como o Nitrogênio e Potássio e que, juntamente com os demais, serão utilizados para a manutenção das atividades do organismo e desenvolvimento de novos ramos, folhas, frutos e raízes (VALARANI, 2005).

2.2 Café: questão da água e estresse

De todos os recursos demandados para o desenvolvimento vegetal, sejam eles de escala macro ou micro, a água figura entre os principais deles. Estima-se que cerca de 80 % a 90 % do peso das plantas seja composto por água e isso é reflexo do ambiente celular vegetal o qual, em grande parte de seu volume, também é composto pela água. Devido a isso, o organismo vegetal desenvolveu formas para obter uma captação eficiente dessas moléculas a qual é feita por meio de suas raízes capazes de adquirir água até mesmo em solos visualmente secos e transporta-la até as folhas com o auxílio do xilema. Desse modo, o vegetal consegue o aporte desse recurso de maneira satisfatória para a realização de atividades fotossintéticas e metabólicas além de conseguir estabelecer suporte estrutural para suas células (LUMEN, 2018).

Diante dessa importância, a disponibilidade de água também se apresenta como fator limitante para o estabelecimento de um cultivo vegetal de qualidade, visto que, caso haja falta desse recurso ocasionada por condições ambientais ou falhas no planejamento de sistemas de

irrigação, pode-se ocasionar perdas de cerca de 30 % ou superiores a esse número na lavoura, o que representa um prejuízo bastante considerável (ALI et al., 2018). Para a implantação de uma lavoura cafeeira capaz de obter nível de produção considerável aliado a uma boa qualidade dos grãos, é normal utilizar esses sistemas de irrigação. Isso fica evidente quando Assis et al. (2014) fizeram uso da irrigação por gotejamento, aumentando o número de plantas por hectare na área, de 14000 para 15125, no sudoeste de Minas Gerais, ocasionando um aumento de 27 % na produção total. Os resultados demonstram o impacto desse recurso para o cafeeiro e possibilita visualizar como a disponibilidade de água pode determinar a distribuição das plantas pelo ambiente, visto que, aumentou-se o número de indivíduos em função da maior disponibilidade de água.

Embora a implantação de sistemas de irrigação em lavouras cafeeiras seja importante, trata-se de uma atividade bastante onerosa. No Brasil existem opções de maquinário que variam de 1300 a 3300 dólares por hectare, preço que se apresenta inviável para o pequeno e médio produtor. Sendo assim, esses produtores ficam impossibilitados de produzir com maior qualidade e quantidade, visto que, não possuem capital para a implementação desses sistemas (FERNANDES,; LIMA, 2005). Além disso, é necessário realizar um planejamento detalhado a fim de se verificar a viabilidade do local e a maneira como será implementado o sistema de irrigação, sendo importante informações a respeito de topografia, disponibilidade hídrica, características físicoquímicas do solo e aspectos socioeconômicos. Logo, esses pontos constituem em mais uma dificuldade a ser considerada para estabelecer o maquinário na região e garantir que ele opere da melhor maneira possível, além de demandar mais recursos financeiros para se realizar o levantamento das informações, contribuindo ainda mais para o custo da operação final (CARVALHO et al., 2005).

Entende-se, de maneira simplista, que estresse seja uma situação de desequilíbrio que cause danos ao organismo. Diante disso, o ambiente no qual ele está estabelecido exerce papel fundamental para a manutenção da atividade fisiológica normal ou o desenvolvimento dos chamados estresses ambientais ou abióticos. Nesse grupo merecem destaques os desequilíbrios causados por baixas ou altas temperaturas e falta ou excesso de água, sendo que, a escassez pode ocasionar quedas de até 80 %, como ocorre em áreas as quais sofrem com longos períodos de seca (DAMATTA,; RAMALHO, , 2006; CHESEREK,; GICHIMU, , 2012). Isso ocorre devido ao dano celular desencadeado por desequilíbrio osmótico aliado ao desenvolvimento de estresse oxidativo, ao qual, juntamente com os anteriores, irão acarretar alteração no quadro iônico do organismo e, consequentemente, afetando proteínas e membranas (DAMATTA,; RAMALHO, 2006).

Devido a essas condições o organismo vegetal desenvolveu ao longo da evolução estratégias para lidar com as situações de estresses e minimizar os danos por elas causados. Para o estresse hídrico tem-se como uma das manifestações morfológicas mais marcantes o fechamento dos estômatos a fim de evitar maiores perdas de água e conservar esse recurso no interior do organismo por mais tempo. Entretanto, a absorção de gás carbônico ocorre pela mesma passagem a qual se faz a saída de água. Logo, uma menor quantidade desse gás é absorvida pela planta e, como se trata de um reagente limitante para a ocorrência da fotossíntese, observam-se quedas nas taxas fotossintéticas (SILVA et al., 2017).

Outro aspecto bastante marcante observado em plantas, que apresentam maior tolerância ao estresse hídrico, compreende as características do sistema radicular que se apresenta como sendo profundo, vigoroso e com maior capacidade de fornecer suprimento de água ao vegetal e manter o equilíbrio favorável desse recurso (KUMAR et al., 2017; DAMATTA; RAMALHO, 2006). Entretanto, as análises do perfil radicular não são tão simples como parecem, visto que, existem outras implicações envolvidas, como a absorção de outros nutrientes que também é feita pelas raízes. Sendo assim, sistemas radiculares maiores e menos ramificados são capazes de assimilar maior quantidade de nutrientes para o seu crescimento próprio, o que prejudica o desenvolvimento do restante do organismo vegetal. Diante disso, estudos indicam que a maior tolerância da planta ao estresse hídrico estaria associada a um sistema radicular mais ramificado e profundo e não apenas ao tamanho em peso seco propriamente dito (DAMATTA; RAMALHO, 2006).

Por outro lado, têm-se outras características fisiológicas que estão atreladas à morfologia do vegetal e que devem ser levadas em consideração, visto que, garantem maior resistência ao estresse hídrico. São elas: eficiência no uso da água por parte do organismo, eficiência na extração desse recurso por parte do sistema radicular e condutibilidade hidráulica. Essas características, aliadas a uma área foliar modulada e consideravelmente menor, e um comportamento dos estômatos favorável, permitem alcançar equilíbrio na manutenção fisiológica do organismo sob condição de estresse e, conseqüentemente, chegar a níveis de produções interessantes quando comparados aos vegetais sensíveis (CHESEREK; GICHIMU, 2012).

Em nível molecular e transcricional também é possível observar características capazes de garantir maior resistência ao estresse hídrico em um organismo vegetal. Sabe-se que existem mediadores que desempenham papéis em vias de sinalizações diversas como ABA (ácido abscísico), íons cálcio e ROS (espécies reativas de oxigênio). Pois, em vegetais que estão submetidos ao estresse é comum encontrar alta atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e catalase (KUMAR et al., 2017; FANG; XIONG, 2014). Além

disso, em resposta ao estresse hídrico, tem-se proteínas envolvidas em: proteger estruturas como membranas celulares e proteínas de valor ao organismo; atuar em vias de sinalização e regulação de processos celulares, como kinases e fatores de transcrição propriamente ditos; e associar ao balanço de íons no ambiente celular compreendendo o transporte deles e de água, como as aquaporinas e as proteínas transportadoras de açúcares (FANG; XIONG, 2014).

Diante dessa conjuntura, trabalhos buscando identificar genes e seus respectivos produtos, bem como, o papel desses em vias de regulação e processos celulares ganharam força, conseguindo resultados bastante expressivos. Como consequência desse fato, tem-se conhecimento de vários genes envolvidos na expressão de proteínas ricas em glicina, proteínas heat-shock, acorbato peroxidase, e de fatores capazes de atuar em mais de um alvo, como o DREB1D (elemento de ligação responsivo a desidratação), bem como aqueles envolvidos em codificar proteínas kinases como CDPKs (proteínas kinases dependentes de cálcio) e MAPKs (proteínas kinases mitogênicas). Além disso, tem-se conhecimento, oriundo desses trabalhos, de genes relacionados com fatores de transcrição como o AP2/EREBP (Apetala2/proteína elemento de ligação responsivo a etileno) e genes responsivos a desidratação como os DREBs, sendo todos esses previamente citados e reportados como sendo participativos em mecanismos de estresse hídrico (MOFATTO et al., 2016; FANG; XIONG, 2014).

Em questão hormonal o ABA (Ácido abscísico) apresenta papel importante em contribuir para tolerância ao estresse hídrico. Isso ficou evidente quando os AREBs/ABFs (proteínas/fatores de ligação dependentes de ABA) tiveram funções em sinalização sob estresse hídrico reportadas e, juntamente com o desenvolvimento de mutantes com genes *areb1*, *areb2* e *abf3*, sendo todos eles pertencentes a essa subfamília, apresentaram resistência ao hormônio o que acarretou em diminuição da resistência ao estresse hídrico. Além disso, ainda levando a sinalização por ácido abscísico em questão, análises em genes participantes dessas vias bem como fatores de transcrição e reguladores negativos de repressores desses fatores estimulantes mostraram alta na regulação positiva de fatores de transcrição para receptores do hormônio, em genes codificantes de transportadores desse mediador e em genes correlacionados com a expressão do ácido. Em contrapartida, também observaram aumento na quantidade de reguladores negativos de repressores da transcrição do hormônio em plantas submetidas a estresse hídrico indicando que de fato o ácido abscísico tem papel fundamental nesse mecanismo (FANG; XIONG, 2014; KUMAR et al., 2017).

2.3 Café: melhoramento genético

Visto que, o genoma é capaz de garantir características de interesse, o melhoramento genético surge como uma alternativa para contornar situações adversas. Devido a isso, o melhoramento genético tem como objetivo o aumento de produtividade e adaptabilidade dos indivíduos aos ambientes desfavoráveis, por meio da identificação de organismos superiores em uma determinada população e cruzamento desses com cultivares existentes, buscando agregar, o máximo possível, caracteres de interesse. Esses esforços tiveram início em 1920, quando começaram a aparecer as primeiras doenças, que arrasaram as plantações, e isso exigiu que plantas que apresentavam não só vigor ou produção, mas sim resistência a esses patógenos, fossem observadas e levadas em consideração (MISRHA; SLATER, 2012).

Diante desse cenário, o melhoramento genético clássico iniciou sua busca por características de interesse contra pragas e doenças dentro dos programas de melhoramento genético do cafeeiro. Com as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, as principais do mercado de produção, obteve-se resultados interessantes, como o Híbrido de Timor, que possui tolerância a ferrugem, nematóide e doença das cerejas de café. Outras espécies menos relevantes, como o *C. liberica* e *C. racemosa*, também forneceram material genético para atuar contra ferrugem da folha e bicho mineiro respectivamente (MISRHA; SLATER, 2012; LEROY et al., 2006).

Para o estresse hídrico o melhoramento também busca soluções e, devido a essa busca, alguns conhecimentos importantes foram elucidados. Diante disso, sabe-se que a variedade Kouilou apresenta maior resistência ao estresse hídrico do que algumas cultivares de *C. canephora* e *C. arabica*, entretanto, o alto grau de polimorfismo que a variedade apresenta quando relacionada a essas espécies apresenta-se como uma dificuldade a ser considerada em programas de melhoramento. Com base nisso, cultivares consideradas resistentes são aquelas que possuem informações genéticas capazes de codificar as características fisiológicas, morfológicas e moleculares previamente citadas e que por isso podem suportar ambientes submetidos a seca e conseguir produções consideráveis (DAMATTA; RAMALHO, 2006).

Diante do exposto, em seus experimentos Mazaferri e Carvalho (1987), demonstraram que as cultivares BA-10 de origem indiana, X321 da Tanzânia e BE-5 proveniente da Costa Rica são detentoras de boa tolerância ao estresse hídrico, quando avaliadas para produtividade e desempenho em campo. Entretanto, algumas progêies apresentaram tolerância ao estresse hídrico, porém, baixa produtividade.

Outras características podem ser agregadas originando um material detentor de mais de um item de interesse econômico como é a cultivar Siriema AS1, a qual é derivada da hibridação entre *C. racemosa* e *C. arábica* com posterior retrocruzamento com a cultivar Mundo Novo. Essa cultivar exibe resistência ao bicho mineiro, resistência à ferrugem e boa tolerância a seca. Seguindo a mesma linha de raciocínio, outras cultivares com múltiplas

características também foram desenvolvidas, como as Catiguá MG1, MG2 e MG3, as quais exibem resistência a ferrugem e boa qualidade de bebida, evidenciando a importância do melhoramento para a aquisição de vários itens de interesse e a possibilidade de contornar adversidades (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ., 2011).

Embora o melhoramento genético clássico se apresente como uma alternativa bastante viável para lidar com problemas presentes na atividade de cultivo existem pontos deficientes os quais devem ser considerados. Dentre esses deve-se destacar o tempo para a obtenção de uma nova cultivar, que pode chegar a 30 anos. Pois, demandam etapas de análise detalhada dos parentais, planejamento preciso de como serão feitos os cruzamentos e como serão avaliadas as progênies. Além disso, o tempo de geração do café no campo, os custos de manutenção dos experimentos, aliados a problemas de ploidia e a dificuldade na incorporação das características de resistência por métodos convencionais, constituem os principais gargalos do melhoramento clássico (MISRHA; SLATER, 2012).

Devido a isso, há a necessidade de se utilizar métodos que permitam fazer distinção entre as características de interesse de maneira clara e objetiva, possibilitando inferir a respeito da diversidade genética. Em decorrência desse fato, pode-se usar marcadores fenotípicos os quais são baseados em características físicas diferentes em diversos estágios do desenvolvimento vegetal como semente, fruto, vegetal adulto e juvenil. Embora seja uma metodologia mais fácil e barata, a identificação por marcadores fenotípicos é extremamente sensível ao ambiente ao qual os vegetais se encontram podendo ser diretamente influenciada por ele e, além disso, demanda mais tempo em certos organismos vegetais como o café devido à necessidade de se acompanhar todo o longo desenvolvimento vegetativo da planta, o que aumenta o custo também (ALEMAYEHU, 2017).

Uma alternativa ao uso dos marcadores fenotípicos, que se apresenta como sendo mais promissora e exibe resultados melhores, é o uso de marcadores moleculares. Isso se dá pelo fato desses marcadores não serem influenciados pelo ambiente ao qual o vegetal se encontra e de demandarem bem menos tempo para serem aplicados do que os fenotípicos. Os diferentes tipos de marcadores moleculares apresentam vantagens e desvantagens dependendo da proximidade que os indivíduos a serem analisados apresentam logo, o quanto mais próximo for os elementos, mais discriminatória deverá ser a técnica escolhida nessa abordagem molecular (ALEMAYEHU, 2017). Eles podem ser classificados pelo modo de ação do marcador se é dominante ou co-dominante, pelo método de detecção deles se é por hibridização ou PCR ou até mesmo pelo modo de transmissão desse marcador se é dado por herança de organela maternal ou herança nuclear biparental (NADEEM et al., 2017).

Entre os marcadores moleculares destaca-se aqueles baseados em PCR por utilizarem essa metodologia baseada em amplificação com pouca quantidade de material genético e emprego de *primers*, a qual já é bastante caracterizada no meio científico. Diante disso, os componentes desse grupo de marcadores são RADP, SSRs, também conhecidos como microssatélites, e AFLP. O AFLP consiste em realizar uma amplificação seletiva por PCR de fragmentos oriundos da digestão de todo o DNA genômico alvo fazendo uso de adaptadores e os sítios de restrição enzimáticos como um direcionamento para que os *primers* se anelem. Esses *primers* tem a capacidade de se estender até os sítios de restrição amplificando apenas essas regiões onde eles são complementares com nucleotídeos flanqueadores desses locais possibilitando a visualização de vários sítios de restrição sem se ter o conhecimento de suas respectivas sequências de nucleotídeos, além de permitir a amplificação simultânea desses fragmentos independentemente da complexidade e tamanho do DNA original (NADEEM et al., 2017; VOS et al., 1995).

No desenvolvimento de marcadores AFLP são utilizadas duas enzimas de restrição, adaptadores e *primers*. Uma das enzimas é de corte frequente e a outra de corte raro, as quais produzirão fragmentos que se ligarão aos adaptadores, que são oligonucleotídeos preparados para se ligarem as pontas coesivas produzidas pelas enzimas. Os *primers* possuem sequências complementares aos adaptadores e são utilizados para as etapas de pre-amplificação e amplificação (NADEEM et al., 2017). Essa técnica apresenta aplicações diversas, como monitoramento de herança genética em programas de melhoramento, tanto vegetal como animal, diagnóstico de doenças ligadas a herança e até mesmo a capacidade de ser utilizado no *screening* de marcadores de DNA ligados a características genéticas. Além disso, apresenta vantagens como a boa reprodutibilidade, capacidade de identificação de polimorfismos em todo o genoma e possibilidade de emprego diante de DNAs de diversos organismos, como vegetais, animais e até microrganismos, o que caracteriza o AFLP como uma técnica universal para detecção de variações e *fingerprinting* (BLEARS et al., 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter híbridos tolerantes a seca, resistentes a ferrugem e detentores de qualidade de bebida, e identificar polimorfismos moleculares entre os parentais.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar cruzamentos entre cafeeiros sensível e tolerante a seca;
- Extrair DNA a partir de folhas dos parentais utilizados para os cruzamentos;
- Otimizar protocolo para obtenção de marcadores AFLP para o cafeeiro;
- Obter polimorfismos entre os parentais utilizados nos cruzamentos por meio de marcadores AFLP

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cruzamentos e Extração de DNA

Os cruzamentos foram efetuados na fazenda experimental do Centro Universitário do Cerrado Patrocínio (UNICERP), município de Patrocínio - MG. Desse modo, foi realizada hibridação simples entre uma planta da cultivar Siriema AS1 (resistente ao bicho mineiro, tolerante a seca e resistente a ferrugem), a qual foi escolhida como parental masculino, e outras três plantas pertencentes à cultivar Catiguá MG2 (alta produção de grão, resistente a ferrugem e alta qualidade de bebida), que se comportaram como parental feminino. Feito isso, colheu-se folhas jovens das plantas genitoras separando-as em quatro tubos falcon de 50 mL, os quais foram transportados, sob temperatura ambiente, até as dependências do Laboratório de Genética Molecular (LAGEM), da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas. Em seguida as folhas foram armazenadas durante 24 horas em freezer a -80 °C e posteriormente liofilizadas por 48 horas.

As folhas liofilizadas foram trituradas, com o auxílio de pistilo e cadinho, até formarem partículas minúsculas. A partir das folhas trituradas deu-se início ao processo de extração do ácido desoxirribonucleico (DNA), segundo o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990), modificado com a adição de bissulfito de sódio, carvão ativo e polivinilpirrolidone (PVP). A folha triturada de cada planta parental foi transferida para tubo tipo eppendorf de 2 mL, devidamente identificado. Em seguida foram acrescentados 1,5 mL da solução de extração contendo tampão de extração (0,35 M de sorbitol, 0,10 M de tris base, 5 mM EDTA Na₂ e pH 7,5), tampão de lise (0,2 M de tris base, 0,05 M EDTA Na₂, 2 M NaCl e 2 % CTAB), 0,02 M de bissulfito de sódio, 1 g/L de carvão ativo e 1,5 % de polivinilpirrolidone (PVP) .

Os tubos foram agitados no vortex por 30 segundos e colocados em banho maria a 65 °C por 60 minutos, sendo invertidos de 15 em 15 minutos. Após os 60 minutos os tubos foram

retirados do banho maria e deixados em repouso até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm durante cinco minutos e os sobrenadantes transferidos para outros tubos eppendorfs de mesmo volume. Aos sobrenadantes foram adicionados igual volume de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1) gelado. Os tubos foram invertidos manualmente durante 15 minutos, até a formação de solução homogênea, para posterior centrifugação a 15000 rpm por 5 minutos. Feito isso, os sobrenadantes foram novamente recolhidos e transferidos para outros eppendorfs de mesmo volume e adicionou-se igual volume de álcool isoamílico, invertendo novamente os tubos até a obtenção de solução homogênea. O material foi armazenado overnight no freezer a -20 °C, submetido a outra centrifugação a 15000 rpm por cinco minutos, sobrenadante descartado, pellets lavados com álcool 70 % e pellets ressuspensos em 200 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM).

O DNA extraído foi quantificado e qualificado em espectrofotômetro de microvolume a 260 nM, 280 nM e 230 nM. Foi também realizada qualificação em gel de agarose 0,8 %. Após a quantificação e qualificação o DNA foi diluído para 50 ng/µL. As alíquotas de DNA na concentração de 50 ng/µL foram armazenadas no freezer a - 20 °C para posteriores análises.

4.2 Digestão do DNA genômico e ligação dos adaptadores

De posse do DNA isolado a próxima etapa realizada foi a digestão desses ácidos para possibilitar a ligação dos adaptadores. Desse modo, foram transferidos, após homogeneização por 40 vezes, 8 µL (50 ng/µL totalizando 400 ng) do DNA de cada planta para tubos eppendorfs previamente identificados de 1 a 4. Em seguida foi preparado um mix para quatro reações contendo 1 X o tampão da enzima MseI, 1,5 U da enzima EcoRI, 3,3 U da enzima MseI e o volume completado para 18 µL com água ultrapura para. O mix foi distribuído entre os quatro eppendorfs (4,5 µL para cada tubo) com o DNA de cada planta. Portanto, cada tubo tinha 8 µL do DNA e 4,5 do mix, totalizando 12,5 µL.

Os tubos foram colocados em banho maria, previamente aquecido a 37 °C, e deixados por 6 horas. Em seguida foram transferidos para outro banho maria, previamente aquecido a 70 °C, e deixados por 15 minutos para a inativação das enzimas. Retirados do banho maria foram rapidamente colocados em gelo e centrifugados no spin obtendo o material devidamente digerido para as análises posteriores.

Logo após o término da digestão foi realizada a preparação e ligação dos adaptadores ao material genético digerido. Primeiro foi feito a preparação dos adaptadores com a obtenção

de dois mix para quatro reações. O primeiro mix contendo 28 ng/ μ L do adaptador EcoRI 1, 28 ng/ μ L do adaptador EcoRI 2, 1 X o tampão da T4 ligase e o volume completado para 2,0 μ L com água ultrapura. O segundo mix foi composto por 266 ng/ μ L do adaptador MseI 1, 233 ng/ μ L do adaptador MseI 2, 1 X o tampão da T4 ligase e o volume completado para 2,0 μ L com água ultrapura. Os tubos foram colocados no termociclador e submetidos ao seguinte programa: 10 minutos a 65 °C, 10 minutos a 37 °C e 10 minutos a 25 °C.

Em seguida foi realizada a etapa de ligação dos adaptadores aos DNAs previamente digeridos. Um novo mix foi preparado misturando 2,0 μ L de cada mix da etapa anterior, 1 X do tampão da T4 DNA ligase, 1 U de T4 DNA ligase e o volume completado para 50,0 μ L com água ultrapura. O mix foi distribuído entre os quatro tubos (12,5 μ L para cada tubo) com os 12,5 μ L de DNA previamente digerido. O material ficou em repouso por 3 horas a temperatura ambiente.

O DNA digerido e ligado aos adaptadores foi diluído na proporção de 1:10. Para tal pipetou-se 10 μ L de cada uma das amostras de DNA ligadas aos adaptadores para outros recipientes os quais receberam 90 μ L de tampão TE. Após a diluição o DNA foi armazenado a - 20 °C para posteriores etapas de pré amplificação e amplificação .

4.3 Reações de pré amplificação e amplificação

Para a etapa de pré amplificação foi preparado um mix para quatro reações o qual foi composto por 1,5 ng/ μ L do *primer* Eco + A, 1,5 ng/ μ L do *primer* Mse I + C, 0,25 mM de cada dNTP, 1 X do tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq (Invitrogen) e o volume foi completado para 90 μ L com água ultrapura. O mix foi distribuído em quatro tubos para PCR, sendo 22,5 μ L para cada tubo, onde continha 2,5 μ L de DNA diluído 1:10. Esses tubos foram levados ao termociclador e submetidos a PCR em 23 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por um minuto. O DNA pré amplificado foi diluído na proporção 1:10 (10 μ L do DNA pré amplificado e 90 μ L de água ultrapura) e armazenado a - 20 °C até a amplificação.

O DNA pré amplificado e diluído de cada planta foi amplificado seletivamente com os *primers* com as sequências E-ACA, E-AAC, E-ACT e E-ACC em todas as combinações com os *primers* com as sequências M-CAA, M-CAG e M-CTG, totalizando 12 combinações de *primers*. As sequências dos *primers* está de acordo com Dessalegn et al (2008). O volume de cada reação foi de 20,0 μ L, com as seguintes condições: 5 μ L do DNA pré amplificado e diluído, 1,25 ng/ μ L do primer E-ANN, 1,5 ng/ μ L do primer M-CNN, 0,25 mM de cada dNTP, 1 X o tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA polimerase e o

volume completado para 20,0 μ L com água ultrapura. A programação do termociclador para as amplificações seletivas consistiu de: a) um ciclo de 94 °C por 30 s, seguido de 65 °C durante 30 s e de 72 °C por 60 s, repetido 13 vezes e com a temperatura de anelamento de 65 °C diminuindo em 0,7 °C em todo ciclo subsequente; b) 32 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C durante 30 s e 72 °C por 60 s. As amostras foram aquecidas durante 3 min a 94 °C, em presença de azul de formamida (98 % de formamida, 10 mM EDTA, 1 mg/mL de azul de bromofenol e 1 mg/mL de xileno cianol), e foram imediatamente refrigeradas a -20°C antes da aplicação nos géis de poliacrilamida.

4.4 Montagem do gel de poliacrilamida e eletroforese

A montagem do gel de poliacrilamida foi realizada entre duas placas de vidro com dimensões 33 x 41 cm. Uma das placas tem um recorte e por isso é chamada de placa menor. A placa maior foi limpada três vezes com álcool 70 % usando papel higiênico e movimentando-o tanto na horizontal quanto na vertical, logo após isso, ela foi deixada para secar durante poucos minutos. O mesmo procedimento foi realizado com a placa menor.

Após a limpeza e a secagem da superfície da placa maior aplicou-se uma solução previamente preparada em um tubo de 2 mL a qual era composta por 1,1 mL de solução álcool 95 % e 0,5 % de ácido acético e 2,2 μ L de Bind Silane homogeneizados em vortex. Feito isso, deixou-a secar por 10 minutos e efetuou-se nova limpeza com álcool 70 % e movimentos leves com o papel higiênico obtendo então a placa maior pronta para a continuação do processo. Já na placa menor o papel higiênico foi embebido com Sigmacote e passado na face interna deixando-a secar durante 10 minutos e, ao término da secagem, a superfície em questão foi novamente higienizada com álcool 70 % por três vezes.

Com as duas placas preparadas, a placa grande foi colocada com a face tratada com a solução Bind Silane para cima e nas bordas laterais e na inferior foi aplicada graxa de silicone de maneira a cobrir toda a extensão dessas superfícies. Feito isso, colocou-se nas bordas laterais os espaçadores, os quais também entraram em contato com graxa de silicone nas duas faces. A placa menor foi colocada sobre a placa maior, deixando a face tratada com Sigmacote voltada para a placa maior. As bordas laterais e inferior foram revestidas com fita para marcação de solo para total vedação.

Após a montagem e vedação das placas foi preparada a solução de persulfato de amônia 10 % (0,05 g de persulfato de amônia e 500 μ L de água ultrapura) em um eppendorf e agitados no vortex. Foram preparadas 100 mL de solução de poliacrilamida 6 % (100 mL de acrilamida 6 %, 500 μ L de persulfato de amônia 10 % e 100 μ L de Temed). A solução de

acrilamida 6 % (7,5 M de uréia, TBE 1 X e 6 % de bis acrilamida) foi preparada previamente e armazenada na geladeira. Os 100 mL da solução de poliacrilamida foi vertida entre as duas placas de maneira contínua de devagar para evitar a formação de bolhas, deixando-as levemente inclinadas (5°) por duas horas para a polimerização do gel.

Ao término da polimerização do gel realizou-se a limpeza dos poços com auxílio de pequenas tiras de papel de maneira a não danificá-los e posteriormente as placas foram levadas até a cuba de eletroforese a qual se encontrava em posição nivelada e segura e foram dispostas de maneira em que a placa menor ficou voltada para dentro e a extremidade inferior do gel na base da cuba e, posteriormente, foram presas com auxílio de grampos. Com isso, colocou-se cerca de 500 mL de tampão TBE 1X na câmara inferior e superior da cuba deixando-a preparada para receber as amostras.

As amostras de DNA previamente desnaturadas com azul de formamida foram aplicadas no gel de poliacrilamida polimerizado. Em cada poço foram aplicados 8 µL de cada amostra de DNA com o azul de formamida e nos dois últimos poços foram aplicados 6 µL de marcador de peso molecular de 100 pb e 1000 pb. A eletroforese foi realizada em 15 horas com a voltagem de 300 V.

4.5 Revelação com nitrato de prata

Ao término da eletroforese as placas foram retiradas da cuba e a placa menor foi separada da placa maior. O gel ficou aderido a placa maior e esta foi colocada em uma bandeja com a solução de fixação (etanol 10 % e ácido acético 1 %), onde permaneceu em agitação por 10 minutos. Em seguida foi descartada a solução de fixação e fez-se a lavagem do gel com 2 L de água ultrapura por 1 minuto. Procedeu-se a pré coloração com uma solução de ácido nítrico 1,5 % por 3 minutos. A solução de pré coloração foi descartada e o gel lavado com 2 L de água ultrapura por 1 minuto. A coloração foi realizada com uma solução de nitrato de prata 0,2 % por 20 minutos. A solução de nitrato de prata foi descartada e o gel lavado duas vezes com 2 L de água ultrapura por 30 segundos. A revelação das bandas de DNA ocorreu com a solução de desenvolvimento (60 g de carbonato de sódio, 750 µL de formaldeído 37 % e 2 L de água ultrapura). Assim que as bandas ficaram nítidas foi adicionada a solução stop (ácido acético 1,5 %). Após 5 minutos o gel foi lavado com água destilada e colocado para secar, para posterior análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultado dos cruzamentos

Dos cruzamentos realizados utilizando a planta de Siriema AS1 como doadora de grão de pólen e três indivíduos representantes da cultivar Catiguá MG2 como receptores desse material foram obtidos um total de 92 sementes. Dessas 92 sementes 78 germinaram e encontram-se no viveiro. Esses números indicam que a hibridação foi bem sucedida, visto que retornou um número de plantas F₁ satisfatório e confirmou a eficiência do método.

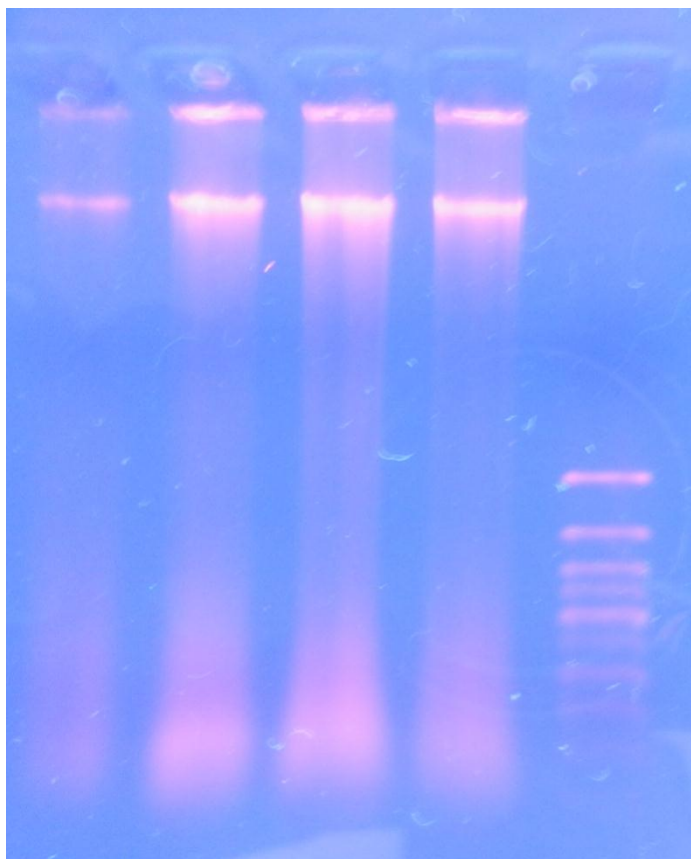
5.2 Extração , digestão, pré amplificação e amplificação

Analisando os resultados obtidos da quantificação através do Espectrofotômetro de Microvolumes – L - Quant Loccus (Tabela 1), observa-se que as relações A260/280 (concentração de DNA em relação às proteínas) e A260/230 (concentração de DNA em relação a metabolitos secundários e componentes do tampão) estão dentro do padrão desejado, exceto para o DNA da planta Siriema AS1. O padrão desejado para a relação A260/280 é de 1,8 a 2,2 e o obtido esteve entre 2,1 e 2,7, o que significa que apenas o DNA da planta Siriema AS1 ficou acima da relação desejada. Uma explicação para o valor acima de 2,2 para a relação A260/280 pode ser a contaminação com compostos fenólicos. Para a relação A260/230 o desejado é de 2,0 a 2,2 e o obtido ficou entre foi 1,6 e 1,9, entretanto, a possível contaminação com compostos fenólicos e componentes do tampão não influenciou na ação das enzimas de restrição e amplificação do DNA nas reações de PCR. A concentração de DNA de cada amostra foi suficiente para as análises posteriores. A eletroforese em gel de agarose 0,8 % confirmou que o DNA extraído de todas as plantas era de qualidade (Figura 1).

Tabela 1 - Resultado da quantificação de DNA em espectrofotômetro, apresentando as razões 260/280 nm e 260/230 nm e concentração do DNA em ng/μL para os genótipos de Catiguá MG2 e Siriema AS1.

Genótipos	260/280nm	260/230nm	Concentração (ng/μL)
Siriema AS1	2.7	1.9	58.0
Catiguá MG2-1	2.2	1.6	131.5
Catiguá MG2-2	2.1	1.7	453.9
Catiguá MG2-3	2.2	1.7	233.5

Figura 1 - Gel de agarose 0,8 % mostrando a qualidade do DNA extraído das quatro plantas de café. Da esquerda para a direita são apresentados o DNA das plantas Siriema AS1, Catiguá MG2-1, Catiguá MG2-2, Catiguá MG2-3 e marcador de peso molecular 50 pb.



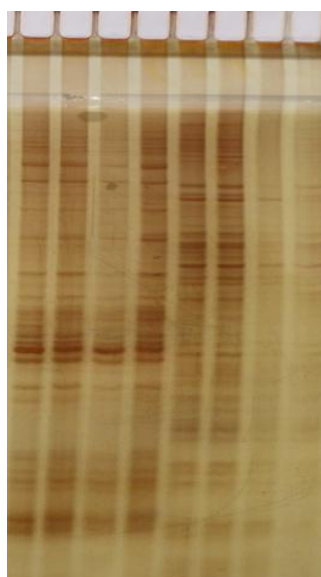
A digestão com as enzimas EcoRI e MseI foi verificada com a eletroforese em gel de agarose 1 % e a análise do gel mostrou que todo o DNA foi digerido. Após a ligação dos adaptadores e a pré amplificação também foi verificado que o procedimento foi eficiente, pois, os fragmentos da pré amplificação foram observados em gel de agarose 1 %. Desse modo, foi possível visualizar no gel o padrão de corrida esperado ao término dessas etapas em que se observou o sucesso das respectivas fases. Isso indicou que essas realizações foram bem sucedidas e, portanto, houve a pré amplificação dos fragmentos digeridos e ligados aos adaptadores e que posteriormente poderão ser utilizados para a amplificação seletiva desses fragmentos.

5.3 Padrão de bandas e polimorfismos

O gel de poliacrilamida obtido, após a coloração, revelou o padrão de bandas compreendendo todos os quatro genótipos e as 12 combinações de *primers* empregadas no

trabalho. Entretanto, apenas quatro combinações exibiram uma quantidade de bandas com qualidade que possibilitou a análise. Essas quatro combinações foram: EcoRI-AAC/MseI-CAA, EcoRI-ACT/MseI-CAA (Figura 2), EcoRI-ACC/MseI-CAG e EcoRI-ACA/MseI-CTG. As demais combinações de *primers* foram excluídas da análise por não revelarem bandas visíveis em qualidade suficiente. Também foi excluído da análise o genótipo 2, que corresponde a planta 1 da cultivar Catiguá MG2, por não apresentar padrão de amplificação de qualidade satisfatória.

Figura 2 - Padrão de bandas obtido para as combinações de dois pares de *primers*. Da esquerda para a direita encontram-se as três plantas da cultivar Catiguá MG2 e a cultivar Siriema AS1, sendo as quatro primeiras para a combinação EcoRI-AAC/MseI-CAA e as quatro últimas para a combinação EcoRI-ACT/MseI-CAA.



O padrão de bandas revelou 26 bandas visíveis para a combinação de primer EcoRI-AAC/MseI-CAA, sendo três polimórficas e 23 monomórficas. A combinação de *primer* EcoRI-ACT/MseI-CAA amplificou 31 bandas, das quais cinco foram polimórficas e 26 bandas monomórficas. O padrão de bandas visíveis para a combinação de *primer* EcoRI-ACC/MseI-CAG revelou 13 bandas, sendo cinco polimórficas e oito monomórficas. A combinação de *primer* EcoRI-ACA/MseI-CTG amplificou 12 bandas, das quais uma foi polimórfica e 11 monomórficas. Portanto, as quatro combinações de *primers* amplificaram 82 bandas, das quais 14 foram polimórficas, representando 17 % de bandas polimórficas. Das bandas polimórficas 10 bandas foram capazes de diferenciar o parental tolerante a seca Siriema AS1 do parental sensível Catiguá MG2. Espera-se que em estudos posteriores, utilizando a população F2 desse cruzamento, uma dessas esteja associada a tolerância a seca.

Diante desse cenário as combinações EcoRI-AAC/MseI-CAA e EcoRI-ACT/MseI-CAA apresentam-se como mais adequadas para evidenciar uma maior quantidade de bandas. Esses resultados estão de acordo com Dessalegn et al. (2008), que utilizaram esses *primers* para analisar variedades de *Coffea arabica* da Etiópia. Esses autores tiveram como resultado uma maior quantidade de bandas para essas combinações, com a amplificação de 108 e 71 bandas, respectivamente. Ainda de acordo com esses autores, em relação a quantidade de bandas polimórficas, a combinação EcoRI-AAC/MseI-CAA foi a que revelou o maior número com 39, seguidas da EcoRI-ACC/MseI-CAG com 24, da EcoRI-ACT/MseI-CAA com 21 e da EcoRI-ACA/MseI-CTG com apenas 17.

Ainda levando em consideração as bandas polimórficas, Steiger et al (2002) trabalharam com as combinações EcoRI-AAC/MseI-CAA e EcoRI-ACC/MseI-CAG evidenciando uma grande superioridade da primeira em relação a segunda sendo 67 bandas contra apenas 27 bandas. Essa conjuntura não corrobora com os resultados obtidos, visto que o padrão de bandas revelou 5 bandas polimórficas apresentadas pela combinação EcoRI-ACC/MseI-CAG contra 3 promovidas pela combinação EcoRI-AAC/MseI-CAA, embora a quantidade total de bandas seja muito maior que na primeira citada.

Com base nisso, é possível indicar que os *primers* pertencentes as combinações EcoRI-AAC/MseI-CAA e EcoRI-ACT/MseI-CAA são mais adequados para uma maior quantidade de bandas e para bandas polimórficas que diferenciem os genótipos dos parentais, embora a combinação EcoRI-ACC/MseI-CAG tenha apresentado maior número de bandas polimórficas. Além disso, a alta quantidade de bandas monomórficas apresentadas indica que não há uma diferença genética muito grande entre as cultivares do trabalho e isso pode ser explicado devido a origem delas a qual carrega genética das duas espécies de café mais comercializadas *Coffea arabica* e *Coffea canéfora*. Além da homogeneidade da estrutura genética promovida pelos ciclos de seleção devido ao alto nível de autogamia dessas espécies o que contribui ainda mais para a redução dos polimorfismos (ANTONHY et al., 2002).

As bandas monomórficas comuns em todos os genótipos podem indicar características presentes em ambos como a resistência a ferrugem, a qual se faz marcante nas cultivares. Entretanto, esse padrão monomórfico também pode estar ligado a características que não garantem tolerância, mas participam de processos vitais do organismo vegetal como absorção de água, desenvolvimento de frutos e folhas dentre outras. Diante disso, as bandas polimórficas encontradas entre os materiais de Siriema AS1 e Catiguá MG2 compreendem as diferenças genéticas presentes entre eles que, por mais que sejam pequenas, são extremamente relevantes, pois, podem estar relacionadas com a resistência ao bicho mineiro e ao estresse

hídrico, visto que esses traços agronômicos não se fazem presentes nos genótipos de Catiguá MG2.

Seguindo essa hipótese, as bandas polimórficas encontradas entre os genótipos de Catiguá MG2 para a combinação de *primers* EcoRI-ACC/MseI-CAG, possivelmente, são frutos de material genético que ainda não entrou em homozigose completa com o avanço das gerações e, portanto, constitui diferença genética entre materiais provenientes da mesma cultivar. Ainda sob esse ponto de vista, as bandas que diferem esses indivíduos não se faz presente no genótipo de Siriema AS1, logo elas podem estar associadas a caracteres os quais essa não apresenta, como a qualidade de bebida, por exemplo.

6 CONCLUSÃO

A metodologia AFLP possibilitou a identificação de polimorfismos entre os genótipos analisados e de acordo essas bandas conclui-se que há pequena diferença genética, o que evidencia uma proximidade genética entre as cultivares. As bandas polimórficas podem estar relacionadas com as características de interesse que diferenciam os materiais, como a tolerância ao estresse hídrico e qualidade de bebida. Entretanto, devem-se avançar gerações para possibilitar a confirmação dessa hipótese e atribuir a essas bandas a função de marcador molecular.

REFERÊNCIAS

- ALI, S. et al. Soil amendments strategies to improve water-use efficiency and productivity of maize under different irrigation conditions. **Agricultural Water Management**, v. 210, p. 88–95, nov. 2018.
- BLEARS, M. J. et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 99–114, 1 set. 1998.
- BUDZINSKI, I. G. F. et al. Expression patterns of three α -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development: *Coffea* expansins. **Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 462–471, maio 2011.

CAMARGO, M. B. P. DE. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 239–247, 2010.

CARVALHO, D. F. DE et al. Estimativa do custo de implantação da agricultura irrigada, utilizando o sistema de informação geográfica. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n. 2, p. 395–408, ago. 2005.

CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ. Catiguá MG1, MG2 E MG3. Disponível em: <<http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/tecnologias/cultivares/497-catigua-mg1-mg2-e-mg3>> Acesso em: 10 ago. 2018.

D., S. et al. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, n. 2–3, p. 209–215, 1 ago. 2002.

DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 55–81, mar. 2006.

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

F., A. et al. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 5, p. 894–900, 1 abr. 2002.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 673–689, fev. 2015.

GUTIÉRREZ, A. P. A., ENGLE, N. L., DE NYS, E., MOLEJÓN, C. E MARTINS, E. S. Drought preparedness in Brazil. Weather And Climate Extremes. Elsevier BV, [s.l], v. 3, p.95-106, jun. 2014.

J.J, CHESEREK; B.M, GICHIMU. Drought and heat tolerance in coffee: a review. **International Research Journal Of Agricultural Science And Soil Science**. Ruiru, p. 498-501. dez. 2012.

KUMAR, P., ROUPHAEL, Y., CARDARELLI, M. E COLLA, G. Vegetable Grafting as a Tool to Improve Drought Resistance and Water Use Efficiency. *Frointers Media : Frointers In Plant Science*, [s.l], v. 8, p.8-1130, 30 jun. 2017.

LEROY, T. et al. Genetics of coffee quality. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, n. 1, p. 229–242, mar. 2006.

LUMEN. Nutritional Requirements of Plants. Disponível em: <<https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/nutritional-requirements-of-plants/>>. Acesso em: 10 ago. 2018.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Café no Brasil. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/política-agricola/cafe/cafeicu Ltura-brasileira](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/política-agricola/cafe/cafeicu-Ltura-brasileira)>. Acesso em: 10 ago. 2018.

MAZZAFERA, P.; CARVALHO, A. Produção e tolerância à seca de cafeeiros. *Bragantia*, v. 46, n. 2, p. 403–415, 1987

MENEZES-SILVA, P. E., SANGULARD, L. M. V. P., ÁVILA, R. T., MORAIS, L. E., MARTINS, S. C. V., NOBRES, P., PATREZE, C. M., FERREIRA, M. A., ARAÚJO, W. L., FERNIE, A. R. E DAMATTA, F. M. Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. Oxford University Press: *Journal Of Experimental Botany*, [s.l.], v. 68, n. 15, p.4309-4322, 10 jul. 2017.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent Advances in the Genetic Transformation of Coffee. *Biotechnology Research International*, v. 2012, p. 1–17, 2012.

MOFATTO, L. S. et al. Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars. *BMC Plant Biology*, v. 16, n. 1, dez. 2016.

NADEEM, M. A. et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 32, n. 2, p. 261–285, 4 mar. 2018.

PERROIS, C. et al. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). **Planta**, v. 241, n. 1, p. 179–191, jan. 2015.

POOLE, R. et al. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. **BMJ**, p. j5024, 22 nov. 2017.

RAZAFINARIVO, N. J. et al. Genetic structure and diversity of coffee (*Coffea*) across Africa and the Indian Ocean islands revealed using microsatellites. **Annals of Botany**, v. 111, n. 2, p. 229–248, fev. 2013.

Review on Genetic Diversity of Coffee (*Coffea Arabica* .L) in Ethiopia. **International Journal of Forestry and Horticulture**, v. 3, n. 2, 2017.

VALARINI, VALDEMAR. **Demanda de Macronutrientes pelas folhas e frutos em cultivares de café arabica de porte baixo**. 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agricultura Tropical, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2005.

VOS, Pieter et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Oxford University Press: **Nucleic Acids Research**., Wageningen, v. 23, n. 21, p.4407-4414, 14 jun. 1995.