



GABRIELA ESTER FERRAZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS PROMISSORES
E ACESSOS DE CAFÉ ARÁBICA**

LAVRAS – MG

2020

GABRIELA ESTER FERRAZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS PROMISSORES E ACESSOS DE
CAFÉ ARÁBICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Mestre.

Prof.^a Flavia Maria Avelar Gonçalves
Orientadora

Prof. Antonio Chalfun Junior
Coorientador

LAVRAS – MG

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ferraz, Gabriela Ester.

Diversidade genética de genótipos promissores e acessos de
café arábica. / Gabriela Ester Ferraz. - 2020.

49 p.

Orientador(a): Flavia Maria Avelar Gonçalves.

Coorientador(a): Antonio Chalfun Junior.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Análise sensorial. 2. Marcadores moleculares. 3.
Variabilidade genética. I. Gonçalves, Flavia Maria Avelar. II.
Junior, Antonio Chalfun. III. Título.

GABRIELA ESTER FERRAZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS PROMISSORES E ACESSOS DE
CAFÉ ARÁBICA**

**GENETIC DIVERSITY OF PROMISING GENOTYPES AND ARABIC COFFEE
ACCESS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 02 de outubro de 2020.

Dr. Cleiton Lourenço de Oliveira, UFLA.

Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho, EPAMIG.

Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Avelar Gonçalves

Orientadora

Prof. Phd Antonio Chalfun Junior

Coorientador

LAVRAS – MG

2020

Aos amigos fraternos Elber, Cleiton, Fran e Luiz.

Aos meus pais e meu noivo, amores da minha vida...

À cafeicultura, projeto da minha vida!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, professores Flávia e Chalfun, por todo conhecimento acadêmico e por acreditarem na minha capacidade.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) da cidade de Lavras/MG, que colaborou com as análises sensoriais e o material vegetal para realização das análises moleculares, em especial aos professores Marcelo Malta e Gladyston Rodrigues Carvalho.

Ao Laboratório de Culturas Perenes Sustentáveis, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA – USA) pela realização das análises moleculares, na pessoa do pesquisador Dapeng Zang.

Ao amigo Ricardo Sebastião dos Santos, extensionista da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER), que em todos os momentos de dúvidas me auxiliou e que contribuiu dando todo apoio técnico.

A todos os colegas de laboratório e amigos de classe, pelos ensinamentos, apoio e companheirismo. Em especial aos amigos Danilo Alves Pereira e Marlon Henrique Lopes.

Ao professor Vinícius Quintão Carneiro, por toda ajuda com as análises estatísticas referentes aos dados fenotípicos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia que contribuem para manutenção da instituição, oportunizando as melhores condições para que eu pudesse adquirir os conhecimentos que tenho hoje.

Ao programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade de me capacitar e adquirir conhecimento para levar àqueles que carecem.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao Programa de Pós Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio da concessão de bolsa de estudos.

*“Para mim o sabor do café não vem do paladar,
vem do coração...”*

(Gabriela Ester Ferraz)

RESUMO

O café é a segunda bebida mais consumida no Brasil, ficando atrás apenas da água. Assim, é constante a busca dos produtores por cultivares com alta qualidade sensorial de bebida, para atender às diversas preferências dos consumidores, almejando um maior valor agregado. A análise sensorial, nos últimos anos, passou por mudanças em sua forma de avaliação, uma vez que o mercado está mais exigente com relação a qualidade de bebida do café. Neste contexto, objetivou-se identificar genótipos de *Coffea arabica* L. com qualidade de bebida superior e verificar a existência de diversidade genética por meio de marcadores SNPs. Os genótipos avaliados tinham aproximadamente dez anos de idade e apresentavam alta diversidade morfológica, destacando-se quanto ao porte, cor dos brotos, frutos grandes de coloração vermelha, com elevada porcentagem de grãos com tamanho de peneira igual ou superior a 16. Para verificar a qualidade dos grãos os genótipos foram analisados quanto à qualidade sensorial de acordo com a metodologia proposta pela *Specialty Coffee Association* (SCA). A diversidade genética foi estimada com o auxílio de marcadores moleculares SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Para a extração de DNA, foram coletadas folhas totalmente expandidas de 15 genótipos e 62 acessos pertencentes ao banco de germoplasma da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Culturas Perenes Sustentáveis, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Serviço de Pesquisa Agrícola (USDA – USA). Um total de 288 SNPs candidatos foram selecionados. A estrutura genética da população foi determinada usando o software de análise de agrupamento Bayesiano STRUCTURE v2.3.422. Além disso, uma análise de agrupamento usando o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) foi realizada para examinar melhor a relação genética entre os genótipos com os acessos. O dendrograma UPGMA foi gerado a partir da matriz de distância resultante usando o programa de computador PHYLIP versão 3.697. Os marcadores SNPs utilizados se mostraram eficientes, permitindo o agrupamento de acessos semelhantes em características fenotípicas e/ou genealógicas. Os 15 genótipos possuem variabilidade genética intraespecífica, bem como apresentam alta similaridade genética com o acesso Mundo Novo. Os genótipos de café avaliados apresentam alta qualidade sensorial, classificados como especiais pela metodologia SCA, com pontuação acima de 80, categorizados como muito bom e excelente. O genótipo 7 se destacou quanto à qualidade sensorial, se mostrando promissor na obtenção de progênies para futuros programas de melhoramento.

Palavras-chave: Análise sensorial; Marcadores moleculares; Variabilidade genética; *Coffea arabica*.

ABSTRACT

Coffee is the second most consumed beverage in Brazil behind only water. Thus, a search for cultivars with high sensory quality of drink is constant by producers to serve the various categories of consumers, aiming at greater added value. A sensory analysis, in recent years, has undergone changes in its form of evaluation, since the market is more demanding with regard to the quality of coffee drink. In this context, the objective was to identify genotypes of *Coffea arabica* L. with superior drink quality and to verify the existence of genetic diversity through SNPs of markers. The genotypes are approximately ten years old and have morphological diversity, with emphasis on the size, color of the sprouts, large red fruits with a high percentage of grains with a sieve size 16 and above. To check the quality of the beans, genotypes were analyzed for sensory quality according to the methodology proposed by the Specialty Coffee Association (SCA). Genetic diversity was estimated with the help of molecular markers SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). For the extraction of DNA, fully expanded leaves were collected from 15 genotypes and 62 accessions belonging to the germplasm bank of the Agricultural Research Corporation of Minas Geras. Later as sent to the Laboratory of Sustainable Perennial Crops, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA - USA). A total of 288 candidate SNPs selected. The genetic structure of the population was provided using the Bayesian STRUCTURE v2.3.422 cluster analysis software. In addition, a cluster analysis using the UPGMA (Unweighted peer group method with arithmetic mean) was performed to better examine the genetic relationship between genotypes and accessions. The UPGMA dendrogram was generated from the resulting distance matrix using the computer program PHYLIP version 3.697. The SNPs markers used here are excellent for grouping similar accessions in phenotypic and / or genealogical characteristics. The 15 genotypes have intraspecific genetic variability, as well as high genetic similarity with the Mundo Novo access. The formulated coffee genotypes have high sensory quality, classified as special by the SCA methodology, obtaining scores above 80 categorized as very good and excellent. Genotype 7 stands out in terms of sensory quality, showing promise in obtaining programs for future breeding programs.

Keywords: Sensory analysis; Molecular markers; Genetic variability; *Coffea arabica*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA de 62 acessos e 15 genótipos do gênero *Coffea* utilizando 288 marcadores SNP..... 38
- Figura 2 - Análise da estrutura genética de 62 acessos e 15 genótipos (números de 1 a 15) obtida por meio do software Structure com K=2 baseado em 288 marcadores SNPs..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontuação total segundo a metodologia SCA, obtida em análise sensorial univariada para seis genótipos e duas cultivares controle (Catuaí vermelho e Mundo Novo) referentes ao ano safra 2018/2019.....	35
Tabela 2 - Nuances identificadas por três provadores com base na metodologia descrita pela SCA em seis genótipos e duas cultivares controle.....	35

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 O melhoramento genético na espécie <i>Coffea arabica</i>	15
2.2 Qualidade da bebida do café	16
2.3 Marcadores moleculares	20
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2 - ARTIGO	26
1 INTRODUÇÃO	28
2 MÉTODOS	30
2.1 Localização e implantação do experimento.....	30
2.2 Análises sensoriais	30
2.3 Avaliação de diversidade genética	31
2.3.1 Material vegetal e extração de DNA	31
2.3.2 Seleção e genotipagem de marcadores SNP	32
2.4 Análises estatísticas	33
2.4.1 Dados sensoriais.....	33
2.4.2 Dados moleculares	33
3 RESULTADOS	34
3.1 Avaliação sensorial	34
3.2 Avaliação da diversidade genética	36
4 DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE	49

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O café é a segunda bebida mais consumida no Brasil, ficando atrás apenas da água. Assim, é constante a busca dos produtores por cultivares com alta qualidade sensorial de bebida, para atender as diversas preferências dos consumidores (UFER; LIN; ORTEGA, 2019). Os consumidores buscam por produtos com especificações singulares que promovam experiências únicas com relação ao sabor (CARVALHO; PAIVA; VIEIRA, 2016), ou uma oportunidade de estreitamento das relações sociais ao saborear um café (HAMON *et al.*, 2017). Já os produtores almejam um maior valor agregado ao seu produto (BACELAR *et al.*, 2020), pelo aumento da qualidade aliada ao desenvolvimento tecnológico.

Nesse contexto, as pesquisas visando o melhoramento para qualidade de bebida se tornam extremamente importantes (CONCEIÇÃO; ELLERY JUNIOR; CONCEIÇÃO, 2019). Produtores e pesquisadores da área buscam por cultivares que apresentem, frequentemente, nuances e sabores específicos e primordiais (FIGUEIREDO *et al.*, 2018), ou até mesmo espécies diferentes com potencialidades de novos sabores (DAVIS *et al.*, 2020).

Todavia, é grande a complexidade envolvida da determinação da qualidade da bebida do café (LEROY *et al.*, 2006). Fatores genéticos (SCHOLZ *et al.*, 2011) e ambientais (BERTRAND *et al.*, 2012) afetam o sucesso dos processos fisiológicos da planta que determinarão a formação de compostos químicos como proteínas, óleos, açúcares em diferentes combinações e níveis (MALTA; CHAGAS, 2009). Estas combinações, após o processamento de pós-colheita e torra, formarão compostos voláteis e não voláteis determinantes na constituição do aroma e sabor do café (SUNARHARUM; WILLIAMS; SMYTH, 2014).

Sabe-se que cafés que apresentam boa qualidade de bebida possuem elevados índices de trigonelina (CAMPA *et al.*, 2004; FARAH *et al.*, 2006), lipídeos (SANT'ANA *et al.*, 2018) e sacarose (BORÉM *et al.*, 2016; CAMPA *et al.*, 2004; FARAH *et al.*, 2006). Além destes, existem compostos que apresentam potencial de uso como discriminantes de cultivares promissoras para alta qualidade de bebida, tais como o ácido araquídico e o ácido esteárico para o grupo Bourbon; os ácidos mirístico e linoléico e sacarose para o grupo exótico (Pacamara, Laurina, Guesha, dentre outros); e os ácidos láurico, palmitoléico e oleico, e o teor de proteínas para o grupo Híbrido de Timor (MALTA *et al.*, 2020). Já os ácidos clorogênicos e cafeína em quantidades elevadas proporcionam cafés de baixa qualidade (BARBOSA *et al.*, 2019) como ocorre em *C. canephora* (KOSHIRO *et al.*, 2007).

Apesar dos esforços para obter uma metodologia complementar, a forma mais utilizada de se classificar as amostras de café é pela avaliação sensorial por meio da “prova de xícara”.

Dentre as diversas opções, a metodologia da *Specialty Coffee Association* (SCA) é a mais utilizada para o mercado de cafés especiais. Essa metodologia busca valorizar os diversos aromas e sabores apresentados pelos cafés. A classificação quanto aos defeitos é rigorosa, há processos cuidadosos de torra e moagem fazendo com que, apenas amostras de cafés elite alcancem boas pontuações (POLTRONIERI; ROSSI, 2016).

Diante desse cenário, é crescente a necessidade da obtenção de cultivares que apresentem qualidade de bebida superior. Para isso, uma ferramenta interessante no melhoramento genético do cafeeiro são os marcadores moleculares. Estudos têm revelado marcadores que estão associados a compostos indicadores de qualidade de bebida como os lipídeos (SANT'ANA *et al.*, 2018), trigonelina, cafeína (TRAN *et al.*, 2018) e ácidos clorogênicos (IVAMOTO *et al.*, 2013).

Além do mais, os marcadores permitem diversas outras aplicações, como a análise de parentesco para controle de qualidade, rastreabilidade genética no apoio de produção de cultivares elite para mercados *premium*, e direito de propriedade intelectual na proteção de cultivares (ZHOU *et al.*, 2016). Nessa conjuntura, os marcadores de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNP) vem sendo muito utilizados, em razão de apresentarem ampla distribuição no genoma, serem codominantes e bialélicos, fornecendo uma fonte ilimitada de informações (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017).

O presente trabalho teve como objetivo identificar genótipos de café com qualidade de bebida superior, e verificar a existência de diversidade genética entre os genótipos por meio de marcadores SNPs.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O melhoramento genético na espécie *Coffea arabica*

As primeiras plantas de cafeeiro foram introduzidas no Brasil por volta de 1727. Essas plantas pertenciam à espécie *Coffea arabica* e a cultivar era denominada Típica. Essa cultivar foi responsável pelo desenvolvimento inicial da cafeicultura brasileira. Algumas mutações na cultivar Típica deram origem às cultivares Amarelo de Botucatu e Maragogipe. Com a necessidade de ampliar as opções de cultivares com maior produtividade, foi introduzida a cultivar Bourbon Vermelho, originária da Ilha de Reunião - Antiga Bourbon, considerada de boa qualidade e elevada produtividade para a época (CARVALHO, 2007; PESTANA, 2015).

Grande parte da produção mundial de café arábica baseia-se em cultivares desenvolvidas a partir do melhoramento da cultivar Típica e genótipos de Bourbon, ou de plantas originárias de cruzamentos como, por exemplo, a cultivar Mundo Novo que, possivelmente, resultou de um cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho (CARVALHO, 2008). Atualmente, o mercado já dispõe de cultivares bem mais modernas e produtivas que as Bourbons comparando-as em altitudes mais baixas, uma vez que, em elevadas altitudes (acima de 1000 metros em média) e baixas temperaturas, as Bourbons ainda fazem parte das cultivares que produzem bebidas com maior qualidade (BORÉM *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2011).

A espécie *C. arabica* é a única dentro do gênero *Coffea* que é alotetraploide, $2n = 4x = 44$ (MENDES, 1946), e apresenta autopolinização. É considerada uma espécie de base genética estreita, devido à sua origem ter ocorrido de um evento de poliploidização, evolutivamente recente, a partir do cruzamento de duas espécies alógamas e diploides, *Coffea canephora* e *Coffea eugenioides*, do histórico de sua distribuição geográfica pelos países no mundo dar-se pela migração de poucas sementes que originaram as cultivares arábicas utilizadas e por ser autógama apresenta altas taxas de endogamia (SCALABRIN *et al.*, 2020).

Estudos realizados por Setotaw *et al.*, (2013) constataram que apenas sete ancestrais colaboraram em 97,55% para a base genética das cultivares brasileiras de *C. arabica*. Sendo que 52,76%, 19,05% e 11,59% do *pool* gênico das cultivares existentes vieram das cultivares Bourbon Vermelho, Sumatra e Híbrido de Timor, respectivamente. Segundo Van der Vossen, Bertrand e Charrier (2015), situação parecida, relacionada à variabilidade genética, ocorre em países da América Latina que, conjuntamente ao Brasil, correspondem por aproximadamente 85% da produção mundial de café arábica.

O conhecimento da diversidade genética existente na espécie permite aos melhoristas uma melhor caracterização da cultura, conseqüentemente, uma definição mais assertiva das estratégias de melhoramento genético a serem utilizadas (FERRÃO *et al.*, 2015). O melhor conhecimento dos grupos com maior similaridade genética possibilita uma tomada de decisão mais acertada, por exemplo, na escolha de genitores, visto que, quanto mais contrastantes forem os genitores, maior a variabilidade genética na população, e a probabilidade da obtenção e seleção de indivíduos transgressivos superiores é aumentada (PEREIRA *et al.*, 2013).

Na espécie *C. arabica* foi verificada a presença de planta macho estéril, o que facilitará a obtenção de híbridos. Georget *et al.* (2019) obtiveram o híbrido F₁ Starmaya a partir do cruzamento de plantas de clones advindas do mutante natural CIR-SM01, macho estéril, com plantas doadoras de pólen da cultivar Marsellesa. Esse híbrido se mostrou viável para propagação por sementes e apresentou melhores características agrônômicas em termos de tamanho de grãos, produtividade média e vigor, do que sua cultivar genitora Marsellesa e Caturra vermelho, usada como controle. Além disso, o híbrido apresentou também bom desempenho para qualidade de bebida quando comparado com outras cultivares.

Inicialmente, os programas de melhoramento do cafeeiro focaram principalmente na obtenção de cultivares com maior produtividade, precocidade de maturação e resistência à doenças, características que eram importantes para que o país conseguisse avançar para novos mercados. No entanto, as exigências do mercado hoje visam atender aos interesses dos consumidores quanto à qualidade física e sensorial dos cafés, agregando mais valor e possibilitando que o mercado brasileiro aumente sua competitividade (GUERREIRO-FILHO; MALUF, 2019). Sendo assim, produtores e pesquisadores da área buscam por cultivares que apresentam nuances e sabores específicos e primordiais (FIGUEIREDO *et al.*, 2018), ou até mesmo a descoberta de espécies com potencialidades de novos sabores (DAVIS *et al.*, 2020).

2.2 Qualidade da bebida do café

Uma das formas de se verificar a qualidade do café é por meio da diversidade de aromas e sabores que eles apresentam. Quanto mais raros e diversificados, melhor é a qualidade sensorial (GIOMO; BORÉM, 2011). Para ser classificado como especial, o café precisa ter aromas e sabores com notas e atributos singulares como, por exemplo, os florais e frutados, muito característicos de bebidas de alta pontuação nas escalas de avaliação (FASSIO *et al.*, 2019).

Essa diversidade de sabores é determinada de acordo com a composição química

presente no grão cru (BORÉM, 2008). As combinações, após o processamento de pós-colheita adequado e torra, formarão compostos voláteis e não voláteis determinantes na constituição do aroma e sabor do café (SUNARHARUM; WILLIAMS; SMYTH, 2014). Por isso, o café também pode ser qualificado pela quantificação de seus compostos químicos, demonstrando assim, sua qualidade de bebida.

É grande a complexidade envolvida da determinação da qualidade de bebida do café (LEROY *et al.*, 2006). Uma vez que envolve a constituição genética da cultivar (SCHOLZ *et al.*, 2011), os fatores climáticos como a temperatura (BERTRAND *et al.*, 2012), a localização geográfica, o manejo em campo, o espaçamento, o ciclo bienal de produção, a ocorrência de parasitas desfolhantes e o fornecimento de nutrientes no cafeeiro afetam o sucesso dos processos fisiológicos da planta que determinarão a formação de compostos como proteínas, óleos, açúcares em diferentes combinações e níveis (MALTA; CHAGAS, 2009).

Há diferentes formas de avaliar a qualidade de bebida do café. Durante muitos anos a prioridade era a degustação que separava as bebidas brasileiras nas categorias: mole, dura, riada e rio (SILVA; CORTEZ, 1998). Variáveis destas categorias também foram criadas, no entanto, esta forma de análise era muito limitada e extremamente subjetiva. Em meados da década de 80 começa a ser divulgado o termo de café especial, que foi trazido por Erna Knutsen, da *Knutsen Coffee Ltd*, em um discurso em 1978 (QUINTÃO; BRITO; BELK, 2017).

Logo após, foi criada nos Estados Unidos a *Specialty Coffee Association of America* - SCAA. Essa associação propagou o termo de cafés especiais pelo mundo. Atualmente, a SCAA também inclui o continente Europeu, e passou a ser denominada de *Specialty Coffee Association* – SCA. Essa é uma associação que traz junto da sua criação uma metodologia de análises sensoriais que buscam valorizar os diversos aromas e sabores apresentados pelos cafés, e tem por interesse estabelecer uma análise mais objetiva por meio de pontuações de 0 a 10 em 10 quesitos importantes apresentados pelo café, totalizando 100 pontos. A SCA apresenta também uma metodologia de classificação rigorosa quanto aos defeitos apresentados pelas amostras de café, processos cuidadosos de torra e moagem que fazem com que, apenas amostras de cafés elite alcancem boas pontuações (POLTRONIERI; ROSSI, 2016).

Um dos primeiros trabalhos buscando uma alternativa menos subjetiva às provas de xícara foi o estudo realizado por Carvalho *et al.* (1994). Os autores buscaram estabelecer os principais componentes químicos relacionados à boa bebida do café, para serem usados na avaliação e seleção das melhores cultivares e amostras, com o intuito da obtenção de métodos mais simples e de maior reprodutibilidade, trazendo um resultado mais completo. Algumas metodologias estabelecidas por esses autores ainda são utilizadas na determinação de

componentes químicos relacionados à qualidade de bebida dos cafés.

Muitos estudos se baseiam em pesquisas que buscam uma metodologia alternativa à prova de xícara, uma vez que ela é questionada quanto ao grau de subjetividade. Até o momento, o que se tem são compostos com potencial de uso como discriminantes de cultivares promissoras para alta qualidade de bebida, tais como o ácido araquídico e o ácido esteárico para o grupo Bourbon; os ácidos mirístico e linoleico e a sacarose para o grupo exótico (Pacamara, Laurina, Guesha, dentre outros); e os ácidos láurico, palmitoleico e oleico, além do teor de proteínas para o grupo Híbrido de Timor (MALTA *et al.*, 2020), ou como indicador de qualidade de bebida (BORÉM *et al.*, 2016). Contudo, ainda não está totalmente elucidado como eles se relacionam entre si na determinação da qualidade.

Sabe-se que boas bebidas apresentam altos índices de trigonelina (CAMPA *et al.*, 2004; FARAH *et al.*, 2006), lipídeos (SANT'ANA *et al.*, 2018) e sacarose (BORÉM *et al.*, 2016; CAMPA *et al.*, 2004; FARAH *et al.*, 2006), e que ácidos clorogênicos e cafeína em quantidades elevadas são encontrados em bebidas de baixa qualidade (BARBOSA *et al.*, 2019) como ocorre em *C. canephora* (KOSHIRO *et al.*, 2007). Entretanto, isso não é uma regra geral. O fato de não se ter uma receita pronta para determinados padrões de qualidade ocorre devido à elevada interação genótipos x ambientes (VAN DER VOSSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015), e ao grande número de compostos envolvidos na determinação da qualidade de bebida. Esses aspectos devem ser considerados uma vez que possuem interferência direta na formulação de compostos químicos durante todo o processo de formação dos frutos.

O que já se sabe é que fatores e condições que geram a abundância de recursos necessários durante um período mais longínquo de maturação, refletem positivamente na qualidade organoléptica dos frutos e que plantas com menor quantidade de frutos apresentam melhor qualidade (BOTE; VOS, 2017). A altitude também é um fator ambiental que influencia, por exemplo, no processo de maturação, pois para que a maturação aconteça em um maior espaço de tempo, o que favorece a qualidade de bebida (CAMPAROTTO; CAMARGO; MORAES, 2012), é preciso uma menor amplitude térmica que comumente ocorre em ambientes com altitudes acima de 1000 metros, proporcionando grãos de maior qualidade (BORÉM *et al.*, 2019).

O que tem ficado evidente é que não é necessariamente a quantidade de cada composto, mas sim, a combinação entre eles, que proporciona uma bebida diferenciada, um “efeito sinérgico”, termo usado por Bandeira *et al.* (2009) quando relacionam a qualidade de bebida a defeitos apresentados pelas amostras de grãos, onde a contribuição dos fatores em conjunto é maior que a soma de suas contribuições individualmente. O sinergismo é um termo usado na

farmacologia, mas se enquadra muito bem no contexto da qualidade de bebida do café, pois se trata da adição ou potenciação dos efeitos de componentes químicos combinados entre si (DO VALE, 1994). Por isso, faz-se necessário mais estudos e pesquisas para identificação de quais composições químicas melhor arranjadas entre si promovem a melhor bebida. Contudo, devido à grande quantidade de compostos envolvidos, esses resultados tendem a ser elucidados a um longo prazo.

Ante ao exposto, é possível hipotetizar que a origem de uma boa qualidade de bebida está na composição do material genético, ou melhor, de que exista uma combinação gênica que responda, constantemente, de maneira positiva às diferentes condições ambientais as quais o genótipo é submetido, garantindo maior plasticidade diante de seu habitat, propiciando alta qualidade sensorial. Contudo, não se trata de alta diversidade genética, pois em estudo realizado por Scalabrin *et al.* (2020), os autores comprovaram que a base genética de *C. arabica* é estreita e até menor do que era esperado. Assim, a qualidade de bebida é a combinação favorável do *background* que a cultivar possui. Segundo Giomo e Borém (2011), cultivares do grupo Bourbon apresentam elevada estabilidade genética para qualidade de bebida.

Segundo Montagnon, Marraccini e Bertrand (2012), no melhoramento do cafeeiro podem ser utilizadas estratégias de seleção que visam o incremento da característica estudada, produtividade e/ou resistência à doenças e o aumento de qualidade dos cafés, simultaneamente. Os autores comentam que a qualidade pode ser uma característica da cultivar, sendo um diferencial de mercado, concedendo maior exclusividade ao que lhe é produzido. Sendo assim, o melhoramento deve ser uma prioridade para os envolvidos nesse setor, pois o mercado que visa qualidade de bebida do café se encontra em constante crescimento e os consumidores estão cada dia mais conscientes do que estão consumindo (MONTAGNON; MARRACCINI; BERTRAND, 2012).

Visando atender à crescente demanda de cultivares que possuem um diferencial de qualidade de bebida, diversos estudos buscam encontrar marcadores moleculares que estão associados a genótipos que exibem excelente qualidade de bebida (TRAN *et al.*, 2018; SANT'ANA *et al.*, 2018; IVAMOTO *et al.*, 2013). Dentre os marcadores moleculares mais utilizados em estudos de diversidade em café estão os SNPs (SOUSA *et al.*, 2017a) e as sequências simples repetidas (*Simple Sequence Repeats* – SSR) também chamadas de microssatélites (SÁNCHEZ *et al.*, 2020). O uso de marcadores é uma ferramenta interessante, que junto à fenotipagem, é muito vantajosa para a seleção de genótipos com maior qualidade sensorial.

2.3 Marcadores moleculares

O uso de marcadores baseados no DNA vem contribuindo para o melhoramento do cafeeiro, uma vez que facilitam a análise do material genético, possibilitando acesso direto ao genoma, e isolando a variação genética da variação ambiental (MOTTA *et al.*, 2014). Os marcadores moleculares podem ser classificados como sequências de pares de bases nucleotídicas do tipo microssatélites (SSR), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polimorphic DNA* - RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP), hibridização *in situ* por fluorescência (*Fluoresce in situ hybridization* - FISH), hibridização genômica *in situ* (*Genomic In Situ Hybridization* - GISH) (CARVALHO, 2008), dentre outros.

Como já citado, os marcadores podem ser também formados de um único nucleotídeo, os SNPs, que podem ser originados por mutações pontuais no DNA, como as transversões e transições, ou a adição e deleção de nucleotídeos. Os SNPs são abundantes e amplamente distribuídos no genoma, podem estar presentes em praticamente todos os *loci* gênicos, tanto em regiões codantes (éxons), quanto em regiões não-codantes (íntrons e regiões intergênicas), fornecendo um número ilimitado de informações no genoma, facilitando a verificação de relações entre genótipo e fenótipo. Ademais, os SNPs são codominantes, possibilitando a diferenciação de indivíduos homozigóticos dos heterozigóticos (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017).

Devido aos benefícios e a praticidade da utilização dos SNPs, estes marcadores vêm sendo usados para associação à qualidade do café. Já estão descritos estudos que identificaram *loci* de genes relacionados às vias metabólicas que afetam o conteúdo de trigonelina e cafeína (TRAN *et al.*, 2018), bem como genes candidatos envolvidos na determinação de lipídeos (SANT'ANA *et al.*, 2018) e ácidos clorogênicos (IVAMOTO *et al.*, 2013). Esses marcadores podem contribuir para redução da duração dos ciclos de seleção, sendo utilizados como preditores moleculares (o que já é feito em outras culturas) para características relacionadas à qualidade do café, causando um impacto positivo na diminuição dos custos de avaliação fenotípica. No entanto, por ser uma tecnologia recente, ainda está sendo aperfeiçoada (TRAN *et al.*, 2016).

Resultados importantes foram obtidos com marcadores SNPs em estudos relacionados à estrutura populacional. Sousa *et al.* (2017a) avaliaram progênies derivadas do cruzamento das cultivares de *C. arabica* Catuaí e Híbrido de Timor, agrupando-as de acordo com sua genealogia e trouxeram uma discussão sobre o impacto da estrutura genética na obtenção de cultivares

melhoradas com relação à resistência à ferrugem em *C. arabica*.

Nos estudos de diversidade genética, o DNA *fingerprinting* (impressão digital) é uma metodologia que vem alcançando grande utilização. Essa se refere a identificação das diferentes ordens, composições e comprimento das sequências de DNA entre os diferentes organismos, e recebe este nome por assemelhar-se a especificidade da impressão digital humana (TIAN *et al.*, 2015), possibilitando uma diferenciação de organismos geneticamente relacionados, como é o caso das cultivares de *C. arabica*, que tem sua variabilidade genética reduzida (SETOTAW *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2017b).

Desse modo, para que seja mapeado o número e a distribuição dos SNPs da espécie em estudo, é necessário a realização do sequenciamento de seu genoma. Para tanto, diversos métodos estão disponíveis e, dentre eles, está a abordagem de genotipagem por sequenciamento (*Genotyping by Sequency* - GBS), sendo uma opção, principalmente, para organismos com genomas grandes e/ou diversos. Ela se baseia, por exemplo, no uso de enzimas de restrição no preparo da biblioteca para o sequenciamento e consiste, basicamente, das seguintes etapas: extração, quantificação e qualidade do DNA genômico; fragmentação do DNA de todas as amostras com enzimas de restrição e ligação de adaptadores com código de barras; após, é feita uma reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) para que aconteça o agrupamento e a amplificação das amostras. Nessa etapa, apenas amostras curtas (<1 kb) são amplificadas; em seguida é feito o sequenciamento e a análise das sequências com ou sem suporte de um genoma de referência, e identificação dos SNPs (DAVEY *et al.*, 2011; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017).

O sequenciamento GBS é interessante por não necessitar do desenvolvimento prévio de marcadores, por demandar de uma quantidade pequena de DNA por amostra e permitir que as amostras de vários indivíduos sejam genotipadas simultaneamente (sistema “multiplex”), porque, nessa metodologia, a amostra de cada indivíduo recebe a sequência indexadora de quatro a nove pares de bases junto ao adaptador, conhecida como código de barras ou “barcode”. Sendo assim, cada amostra terá sua própria sequência permitindo sua identificação na hora do sequenciamento, possibilitando a análise dos SNPs. A metodologia GBS possibilita análises muito mais completas em estudos de diversidade genética, de genômica populacional, seleção genômica em programas de melhoramento, filogenia e filogeografia. (DE FARIA; GRATTAPAGLIA, 2014).

REFERÊNCIAS

- BACELAR, A. C. B. *et al.* Análise do Potencial de Indicação Geográfica (IG) Para o Café de Vitória da Conquista/BA. **Revista INGI-Indicação Geográfica e Inovação**, v. 4, n. 3, p. 875-888, 2020.
- BANDEIRA, R. D. C. C. *et al.* Volatile composition of intrinsic defective coffee beans by GC/MS-headspace. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 309-314, 2009.
- BARBOSA, M. de S. G. *et al.* Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. **Food chemistry**, v. 292, p. 275-280, 2019.
- BERTRAND, B. *et al.* Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2575-2583, 2012.
- BORÉM, F. M. **Pós-colheita do Café**. 1º ed. Lavras: UFLA, 2008. 631 p
- BORÉM, F. M. *et al.* The relationship between organic acids, sucrose and the quality of specialty coffees. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 8, p. 709-717, 2016.
- BORÉM, F. M. *et al.* Meteorological variables and sensorial quality of coffee in the Mantiqueira region of Minas Gerais. **Coffee Science**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 38 - 47, 2019.
- BOTE, A. D.; VOS, J. Tree management and environmental conditions affect coffee (*Coffea arabica* L.) bean quality. **NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 83, p. 39-46, 2017.
- CAMPA, C. *et al.* Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. **Food chemistry**, v. 88, n. 1, p. 39-43, 2004.
- CAMPAROTTO, L. B.; CAMARGO, M. B. P. de; MORAES, J. F. L. de. Época provável de maturação para diferentes cultivares de café arábica para o Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 594-599, 2012.
- CARVALHO, A. Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil. **Documentos IAC**, v. 34, p. 1-8, 2007. Disponível em: <http://ciiagro.iac.sp.gov.br/publicacoes/arquivos/iac/doc34.pdf>. Acesso em: 13 out. 2020.
- CARVALHO, C. H. S. (Ed). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Embrapa Café. 1ª ed. 2008.
- CARVALHO, G. R. *et al.* Melhoramento genético do café visando a qualidade da bebida. **Informe Agropecuário**, EPAMIG, Belo Horizonte, v.32, n. 261, p.30-38, 2011.
- CARVALHO, J. M.; PAIVA, E. L.; VIEIRA, L. M. Quality attributes of a high specification product: Evidences from the speciality coffee business. **British Food Journal**, v. 118, n. 1, p. 132-149, 2016. doi: 10.1108/BFJ-02-2015-0059

CARVALHO, V. D. *et al.* Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n.3, p.449-454, 1994.

CONCEIÇÃO, J. C. P. R.; ELLERY JUNIOR, R. G. de; CONCEIÇÃO, P. H. Z. Cadeia agroindustrial do café no Brasil: agregação de valor e exportação. **Boletim de Economia e Política Internacional (BEPI)**, n. 24, 2019.

DAVEY, J. W. *et al.* Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 7, p. 499-510, 2011.

DAVIS, A. P. *et al.* Lost and found: *Coffea stenophylla* and *C. affinis*, the forgotten coffee crop species of west Africa. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

DE FARIA, D. A.; GRATTAPAGLIA, D. Milhares de SNPS genotipados por sequenciamento de alto desempenho (GBS-" *Genotyping By Sequencing*") em espécies de *Eucalyptus*. **Heringeriana**, v. 6, n. 1, p. 23-25, 2014.

DO VALE, N. B. Princípios de farmacodinâmica de drogas anestésicas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 44, n. 1, p. 13-23, 1994.

FARAH, A. *et al.* Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FASSIO, L. de O. *et al.* Sensory profile of arabica coffee accesses of the germplasm collection of Minas Gerais–Brazil. **Coffee Science**, v. 14, n. 3, p. 382-393, 2019.

FERRÃO, R. G. *et al.* Melhoramento genético de *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R. G. *et al.* (eds). **Café Conilon**. Vitoria, ES: Incaper, cap. 5, p. 120-163, 2015.

FIGUEIREDO, L. P. *et al.* Sensory analysis and chemical composition of ‘bourbon’ coffees cultivated in different environments. **Coffee Science**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 122 - 131, 2018.

GEORGET, F. *et al.* Starmaya: The first arabica F1 coffee hybrid produced using genetic male sterility. **Frontiers in Plant Science**. v.10. 2019. doi: 10.3389/fpls.2019.01344.

GIOMO, G. S.; BORÉM, F. M. Cafés especiais no Brasil: opção pela qualidade. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 32, n. 261, p. 7-16, 2011.

GUERREIRO-FILHO, O.; MALUF, M. P. Breeding Strategies. In: FARAH, A. (Ed.). **Coffee: Production, Quality and Chemistry**. Royal Society of Chemistry. cap. 3, p. 89-99, 2019.

HAMON, P. *et al.* Genotyping-by-sequencing provides the first well-resolved phylogeny for coffee (*Coffea*) and insights into the evolution of caffeine content in its species: GBS coffee phylogeny and the evolution of caffeine content. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 109, p. 351-361, 2017.

IVAMOTO, S. T. *et al.* Diversidade nucleotídica de genes envolvidos na biossíntese de ácidos clorogênicos de cafeeiros. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 148-156, 2013.

- KOSHIRO, Y. *et al.* Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 9-10, p. 731-742, 2007.
- LEROY, T. *et al.* Genetics of coffee quality. **Brazilian journal of plant physiology**, v. 18, n. 1, p. 229-242, 2006.
- MALTA, M. R.; CHAGAS, S. J. R. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região Sul de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 1, 2009.
- MALTA, M. R. *et al.* Discrimination of genotypes coffee by chemical composition of the beans: potential markers in natural coffees. **Food Research International**, p. 109219, 2020.
- MENDES, A. J. T. Partenogênese, partenocarpia e casos anormais de fertilização em *Coffea*. **Bragantia**, v. 6, n. 6, p. 265-272, 1946.
- MONTAGNON, C.; MARRACCINI, P.; BERTRAND, B. Breeding for coffee quality. In: **Specialty Coffee: Managing Quality**. International Plant Nutrition Institute, Southeast Asia Program, cap. 2, p. 93-122, 2012.
- MOTTA, L. B. *et al.* Molecular characterization of arabica and Conilon coffee plants genotypes by SSR and ISSR markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 728-735, 2014.
- PEREIRA, T. B. *et al.* Eficiência da seleção de progênies de café F₄ pela metodologia de modelos mistos (REML/BLUP). **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 3, p.230-236, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/brag.2013.031>.
- PESTANA, R. K. N. **Caracterização molecular de cafeeiros do germoplasma bourbon**. 2015. 121 p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
- POLTRONIERI, P.; ROSSI, F. Challenges in specialty coffee processing and quality assurance. **Challenges**, v. 7, n. 2, p. 19, 2016.
- QUINTÃO, R. T.; BRITO, E. P. Z.; BELK, R. W. Comunidade de Consumo de Apreciação e Sua Dinâmica. **Revista Brasileira de Gestão de Negócios**, v. 19, n. 63, p. 48-64, 2017.
- SÁNCHEZ, E. *et al.* Microsatellite DNA fingerprinting of *Coffea* sp. germplasm conserved in Costa Rica through singleplex and multiplex PCR. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, n. 1, 2020.
- SANT'ANA, G. C. *et al.* Genome-wide association study reveals candidate genes influencing lipids and diterpenes contents in *Coffea arabica* L. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.
- SCALABRIN, S. *et al.* A single polyploidization event at the origin of the tetraploid genome of *Coffea arabica* is responsible for the extremely low genetic variation in wild and cultivated germplasm. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- SCHOLZ, M. B. S. *et al.* Características físico-químicas de grãos verdes e torrados de

- cultivares de café (*Coffea arabica* L.) do IAPAR. **Coffee Science**, v.6, n. 3, p. 245-255, 245-255, 2011.
- SETOTAW, T. A. *et al.* Coefficient of parentage in *Coffea arabica* L. cultivars grown in Brazil. **Crop Science**, v. 53, n. 4, p. 1237-1247, 2013.
- SILVA, L.F.; CORTEZ, J. G. A qualidade do café n Brasil: histórico e perspectivas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 65-91, 1998.
- SOUSA, T. V. *et al.* Population structure and genetic diversity of coffee progenies derived from Catuaí and Híbrido de Timor revealed by genome-wide SNP marker. **Tree Genetics & Genomes**, v. 13, n. 6, p. 124, 2017a.
- SOUSA, T. V. *et al.* Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. **Euphytica**, v. 213, n. 3, p. 75, 2017b.
- SUNARHARUM, W. B.; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. **Food Research International**, v. 62, p. 315-325, 2014.
- TIAN, H. *et al.* Development of maize SNP3072, a high-throughput compatible SNP array, for DNA fingerprinting identification of Chinese maize varieties. **Molecular breeding**, v. 35, n. 6, p. 136, 2015.
- TRAN, H. T. M. *et al.* Advances in genomics for the improvement of quality in coffee. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 10, p. 3300-3312, 2016.
- TRAN, H. T. M. *et al.* SNP in the *Coffea arabica* genome associated with coffee quality. **Tree Genetics & Genomes**, v. 14, n. 5, p. 72, 2018.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C. *et al.* Polimorfismo de Nucleotídeo único (SNP): metodologias de identificação, análise e aplicações. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al (Orgs.) **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. cap. 8, 181 p.
- UFER, D.; LIN, W.; ORTEGA, D. L. Personality traits and preferences for specialty coffee: Results from a coffee shop field experiment. **Food Research International**, v. 125, p. 108504, 2019.
- VAN DER VOSSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. **Euphytica**, v. 204, n. 2, p. 243-256, 2015.
- ZHOU, L. *et al.* Developing single nucleotide polymorphism (SNP) markers for the identification of coffee germplasm. **Tropical Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 82-95, 2016.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS PROMISSORES E ACESSOS DE CAFÉ ARÁBICA

RESUMO

A análise sensorial nos últimos anos passou por mudanças em sua forma de avaliação, uma vez que o mercado aumentou as exigências de qualidade de bebida do café. Diante deste cenário, é crescente a necessidade da obtenção de cultivares que apresentem qualidade superior, tanto dos grãos, como da bebida. Objetivou-se identificar genótipos de *Coffea arabica* L. com qualidade de bebida superior e verificar a existência de diversidade genética entre eles. Foi realizada a avaliação da qualidade por meio de classificação sensorial de acordo com a metodologia proposta pela *Specialty Coffee Association* (SCA). A diversidade genética foi estimada com o auxílio de marcadores moleculares SNPs. Foi utilizado o DNA das folhas de 15 genótipos e 62 acessos pertencentes ao banco de germoplasma da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Um total de 288 SNPs foram selecionados. A estrutura genética da população foi determinada pelo software de análise de agrupamento Bayesiano STRUCTURE v2.3.422. O dendrograma UPGMA foi gerado a partir da matriz de distância resultante usando o programa PHYLIP 3.697. Os marcadores SNPs utilizados se mostraram eficientes agrupando acessos semelhantes em características fenotípicas e/ou genealógicas. Os 15 genótipos possuem variabilidade genética intraespecífica, bem como apresentam alta similaridade genética com o acesso Mundo Novo. Os genótipos de café avaliados apresentam alta qualidade sensorial, classificados como especiais pela metodologia SCA, obtendo pontuação acima de 80, categorizados como muito bom e excelente. O genótipo 7 se destaca quanto à qualidade sensorial, se mostrando promissor na obtenção de progênies para futuros programas de melhoramento.

Palavras-chave: Análise sensorial; Marcadores moleculares; Variabilidade genética, *Coffea arabica*.

ABSTRACT

Sensory analysis in recent years has undergone changes in the way it is evaluated once the market has increased the quality requirements of coffee drink. In view of this scenario, there is a growing need for obtaining cultivars that present superior quality in both grains and drink. The objective of this study was to identify genotypes of *Coffea arabica* L. with superior drink quality and to verify the existence of genetic diversity among them. Quality assessment was performed through sensory classification according to the methodology proposed by the Specialty Coffee Association (SCA). Genetic diversity was estimated with the help of SNPs molecular markers. DNA from the leaves of 15 genotypes and 62 accessions belonging to the germplasm bank of the Agricultural Research Corporation of Minas Gerais was used. A total of 288 SNPs were selected. The genetic structure of the population was determined by the Bayesian cluster analysis software STRUCTURE v2.3.422. The UPGMA dendrogram was generated from the resulting distance matrix using the PHYLIP 3,697 program. The SNPs markers used here proved to be efficient, grouping similar accessions in phenotypic and / or genealogical characteristics. The 15 genotypes have intraspecific genetic variability, as well as

high genetic similarity with the Mundo Novo access. The evaluated coffee genotypes have high sensory quality, classified as special by the SCA methodology, obtaining scores above 80 categorized as very good and excellent. Genotype 7 stands out in terms of sensory quality, showing promise in obtaining progenies for future breeding programs.

Keywords: Sensory analysis; Molecular markers; Genetic variability, *Coffea arabica*.

1 INTRODUÇÃO

O café é a segunda bebida mais consumida no Brasil, ficando atrás apenas da água. Assim, a busca por estratégias que resultem em cafés de alta qualidade sensorial é constante pelos produtores, visando atender às diversas preferências dos consumidores (UFER; LIN; ORTEGA, 2019). Os consumidores buscam por produtos de especificações singulares que promovam experiências únicas com relação ao sabor (CARVALHO; PAIVA; VIEIRA, 2016), ou uma oportunidade de estreitamento das relações sociais ao saborear um café (HAMON *et al.*, 2017). Já os produtores almejam um maior valor agregado ao seu produto (BACELAR *et al.*, 2020), procurando aumentar a qualidade aliada ao desenvolvimento tecnológico.

É grande a complexidade envolvida na determinação da bebida do café (LEROY *et al.*, 2006). Fatores genéticos (SCHOLZ *et al.*, 2011) e ambientais (BERTRAND *et al.*, 2012) afetam o sucesso dos processos fisiológicos da planta que determinarão a formação de compostos químicos como proteínas, óleos, açúcares em diferentes combinações e níveis (MALTA; CHAGAS, 2009). Essas combinações, após o processamento de pós-colheita e torra, formarão compostos voláteis e não voláteis determinantes na constituição do aroma e sabor do café (SUNARHARUM; WILLIAMS; SMYTH, 2014).

Sabe-se que cafés que apresentam boa qualidade de bebida possuem elevados índices de trigonelina (CAMPA *et al.*, 2004; FARAH *et al.*, 2006), lipídeos (SANT'ANA *et al.*, 2018) e sacarose (BORÉM *et al.*, 2016; CAMPA *et al.*, 2004; FARAH *et al.*, 2006). Já os ácidos clorogênicos e cafeína em quantidades elevadas proporcionam cafés de baixa qualidade (BARBOSA *et al.*, 2019), como ocorre em *Coffea canephora* (KOSHIRO *et al.*, 2007).

Por mais que a quantificação de componentes químicos se apresente como uma metodologia complementar promissora na avaliação de qualidade do café, a forma mais utilizada de se classificar as amostras é a avaliação de sua qualidade sensorial, por meio da “prova de xícara”, devido à sua praticidade e ao baixo custo de avaliação. Dentre as diversas opções, a metodologia da *Specialty Coffee Association* (SCA) é a mais utilizada para o mercado

de cafés especiais. Essa metodologia busca valorizar os diversos aromas e sabores apresentados pelos cafés. A classificação quanto aos defeitos é rigorosa, a granulometria dos frutos é uniforme e há processos cuidadosos de torra e moagem fazendo com que apenas amostras de cafés elite alcancem boas pontuações (POLTRONIERI; ROSSI, 2016).

Na metodologia SCA, pontuações no quesito total acima de 80 são consideradas especiais e se dividem em: muito boas (80 a 84,99 pontos), excelentes (85 a 89,99 pontos) e excepcionais (acima de 90 pontos) (SCA, 2020). Pontuações categorizadas como excelentes e excepcionais têm um maior grau de dificuldade para serem conquistadas, pois a cada ponto superior a 85 existe uma maior harmonização das qualidades apresentadas pelo café (qualidade do grão, composição química, processos de torra, moagem). Consequentemente, cafés que alcançam pontuações acima de 90 se destacam em grandes concursos e conquistam preços recordes de mercado (BSCA, 2020). Ademais, cafés com elevada pontuação apresentam aromas e sabores com notas e atributos singulares como, por exemplo, os florais e frutados, determinantes para diferenciação das amostras (FASSIO *et al.*, 2019).

É crescente a necessidade de obter cultivares que apresentem qualidade superior tanto dos grãos, como da bebida. Produtores e pesquisadores da área buscam por cultivares que apresentem, frequentemente, nuances e sabores específicos e primordiais (FIGUEIREDO *et al.*, 2018), ou até mesmo espécies diferentes com potencialidades de novos sabores (DAVIS *et al.*, 2020).

Estudos buscam conhecer a diversidade genética do cafeeiro, tanto ao nível de espécies (HUANG *et al.*, 2020), como de variedades (MEKBIB *et al.*, 2020). Esse conhecimento auxilia na escolha das melhores estratégias de condução das populações segregantes, dentre elas a identificação de genitores contrastantes e complementares para as características almejadas. Assim sendo, é possível aliar boa produtividade, qualidade e bons índices de diversidade genética.

Para o avanço na obtenção de cultivares promissoras em qualidade de bebida, uma ferramenta interessante no melhoramento genético do cafeeiro são os marcadores moleculares. Esses marcadores permitem diversas aplicações, como em análises de diversidade genética, anteriormente citada, para identificação de melhores genitores (PEREIRA *et al.*, 2013), análise de parentesco para controle de qualidade, rastreabilidade genética no apoio da produção de cultivares elite para mercados *premium*, e direito de propriedade intelectual na proteção de cultivares (PRUVOT-WOEHL *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2016).

Estudos têm revelado marcadores associados a compostos indicadores de qualidade de bebida como os lipídeos (SANT'ANA *et al.*, 2018), trigonelina, cafeína (TRAN *et al.*, 2018) e

ácidos clorogênicos (IVAMOTO *et al.*, 2013). Nessa conjuntura, os marcadores de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNP) vêm sendo muito utilizados, em razão de apresentarem ampla distribuição no genoma, serem codominantes e bialélicos, fornecendo uma fonte ilimitada de informações (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017).

O presente trabalho teve como objetivo identificar genótipos de café com qualidade de bebida superior e verificar a existência de diversidade genética entre os genótipos por meio de marcadores SNPs.

2 MÉTODOS

2.1 Localização e implantação do experimento

Foram utilizados 15 genótipos de café oriundos de um programa de melhoramento genético iniciado no Sítio Gabriela, localizado no município de Inconfidentes, Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. A média anual de precipitação no município é de 1471,6 mm, apresentando estações de verões úmidos e invernos secos (CAETANO; BARBOSA, 2019). A área possui relevo de Mares de Morros e está localizada em um recorte da Serra da Mantiqueira que faz parte do Bioma Mata Atlântica (SOUZA; SILVA, 2016). A altitude da propriedade é de 1007 m e o solo é classificado em sua classe textural como argilo-arenoso.

Os genótipos foram selecionados dentro de um talhão da cultivar Mundo Novo por apresentarem características morfológicas distintas das demais plantas, característica de plantas segregantes. As plantas selecionadas destacaram-se quanto ao porte, cor dos brotos e frutos grandes de coloração vermelha com elevada porcentagem de grãos retidos em peneiras de tamanho igual ou superior a 16 (média de 91,4% em avaliação realizada no ano de 2015 – dados não mostrados). O experimento foi instalado em dezembro de 2009 com espaçamento de 1,5 m entre plantas e 2,5 m entre linhas, em delineamento inteiramente casualizado. A implementação e condução foram realizadas de acordo com recomendações técnicas para a cultura do cafeeiro.

2.2 Análises sensoriais

Devido à segregação, houve a alternância da bienalidade de produção apresentada pelos genótipos. Do total de 15 genótipos, apenas seis obtiveram produção de frutos suficientes para a realização das análises sensoriais. Os frutos foram coletados em estágio cereja, por meio de coleta seletiva, seguindo para secagem pelo processo natural. Como controle, foram utilizadas

duas cultivares: Catuaí Vermelho e Mundo Novo, oriundas da mesma propriedade.

A colheita dos frutos ocorreu em 2019 e, no máximo em seis horas após a coleta, foram levados ao terreiro de cimento e distribuídos uniformemente em peneiras (com moldura de madeira e tela com malha de 2,00 x 1,00 mm, fabricada com fios de arame) tendo suas amostras separadas. A secagem foi finalizada quando os grãos atingiram a umidade de 11 a 12 %. Em seguida, as amostras foram beneficiadas e encaminhadas para as análises laboratoriais.

A análise sensorial foi realizada por três provadores credenciados, de acordo com a metodologia proposta pela *Specialty Coffee Association* (SCA), correspondentes a três repetições. Segundo essa metodologia, cada atributo avaliado (uniformidade, ausência de defeitos, doçura, fragrância e aroma, sabor, acidez, corpo, finalização, equilíbrio e final) recebe notas de 0 a 10, de acordo com a intensidade nas amostras conforme terminologia apresentada por Lingle (1986). De acordo com a classificação SCA, o café que alcança pontuação menor que 80 pontos não se enquadra como especial, de 80 a 84,99 é classificado como muito bom, de 85 a 89,99 como excelente e acima de 90 pontos é denominado excepcional.

2.3 Avaliação de diversidade genética

2.3.1 Material vegetal e extração de DNA

Para o sequenciamento, foram coletadas folhas totalmente expandidas que se encontravam no terceiro par de folhas dos ramos plagiotrópicos, no terço médio da planta. As folhas foram colocadas em tubos de polipropileno tipo Falcon de 50 ml, com amostras separadas individualmente para cada um dos 15 genótipos. O mesmo processo foi realizado para 62 acessos coletados no banco ativo de germoplasma (BAG) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig). Esses acessos foram incluídos buscando verificar a existência de padrões de variabilidade genética dos genótipos em estudo, identificando a existência de semelhanças e divergências entre os conjuntos gênicos dos genótipos e da população do banco de germoplasma.

Para a extração de DNA, as folhas de café foram maceradas em mortar com o auxílio de pistilo, utilizando nitrogênio líquido, e logo após, 200 mg de material vegetal foi armazenado em tubos tipo *ependorf* de 2 ml. Para extração, foi utilizado o Protocolo CTAB de Healey *et al.*, (2014), com algumas alterações. As análises de quantidade e qualidade foram realizadas no espectrofotômetro *Nanovue*® (*NanoVue GE Healthcare*). Foram utilizados 1,5 µL de cada amostra observando-se a concentração do DNA e as relações de pureza $A_{260}/_{280}$ e $A_{260}/_{230}$,

priorizando, valores entre 1,8 a 2,0 para as duas relações. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Culturas Perenes Sustentáveis, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Serviço de Pesquisa Agrícola (USDA – USA).

2.3.2 Seleção e genotipagem de marcadores SNP

Um total de 288 SNPs candidatos foram selecionados a partir das sequências SNP publicadas por Merot-L'anthoene *et al.* (2019). O sistema de genotipagem nanofluídica *Fluidigm* (South San Francisco, CA, EUA) foi usado para avaliar os marcadores SNP putativos para a identificação do genótipo. O *Assay Design Group da Fluidigm Corp.* (South San Francisco, CA, EUA) desenhou e produziu os *primers* SNP putativos para PCR específica de alelo competitivo, permitindo a pontuação bialélica de SNPs em *loci* específicos (*KBioscience Ltd, Hoddesdon, Reino Unido*).

O protocolo seguido para genotipagem dos SNPs foi através do *Fluidigm 96.96 Dynamic Array™* (*Fluidigm, San Francisco, CA*). Cada *96.96 Dynamic Array* pode realizar 96 amostras contra 96 ensaios SNP, gerando um total de 9.216 pontos de dados em um único experimento. Uma característica chave desse protocolo é a inclusão de uma reação de amplificação direcionada específica (*Specific Targeted Amplification - STA*) (WANG *et al.*, 2009), que permite o enriquecimento de moléculas modelo para cada reação individual do *Integrated Fluidic Circuit®* (IFC), o que facilita a multiplexação durante a genotipagem. Uma vantagem do STA é que ele permite o uso de amostras de DNA limitadas ou de baixa qualidade, e reduz o viés que pode ocorrer quando as amostras são colocadas nos 96 poços do IFC. Como os tecidos da folha do café contêm altos níveis de polissacarídeos e polifenóis que podem inibir a amplificação por PCR, a etapa STA foi recomendada. A reação STA foi realizada conforme descrito no *Fluidigm SNP Genotyping User Guide, PN 68000098 Rev II* (*Fluidigm, 2013*). O *master mix* STA consistia em 2,5 µL de TaqMan® Taq polimerase (*Life Technologies, Carlsbad, CA*), PreAmp Master Mix (2X), 1,25 µL de *Pooled assay mix* (0,2X) e 1,25 µL de DNA genômico para uma reação total com volume de 5,0 µL.

A PCR foi realizada com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 10 min, seguida por 14 ciclos de um perfil de amplificação de duas etapas consistindo de 15 segundos a 95°C e 4 minutos a 60°C. O DNA amplificado resultante foi então diluído 1:5 em tampão TE para reduzir a concentração de quaisquer subprodutos de PCR restantes. As amostras foram então genotipadas usando o nanofluídico *96.96 Dynamic Array™ IFC* (*Integrated Fluidic Circuit; Fluidigm Corp.*). O *96.96 Dynamic Array IFC* para genotipagem SNP foi descrito por Wang *et*

al. (2009). Imagens fluorescentes de ponto final do IFC 96.96 foram adquiridas em um gerador de imagens EP1TM (*Fluidigm Corp.*). Os dados foram registrados com uso do software *Fluidigm Genotyping Analysis* (*Fluidigm, San Francisco, CA*).

2.4 Análises estatísticas

2.4.1 Dados sensoriais

As análises estatísticas univariadas para os dados sensoriais foram realizadas com auxílio do *software* GENES (CRUZ, 2016) e, após detectar diferença significativa por meio de análise de variância, para comparação entre as médias foi utilizado o teste Scott-Knott (1974) em nível de 5% de probabilidade.

2.4.2 Dados moleculares

Os dados moleculares foram organizados no Microsoft Excel 2007 para cada *loci* SNP amplificado. Amostras e *loci* SNPs não amplificados em mais de 10% foram excluídos da análise de dados subsequente. Em seguida, os dados foram aprimorados e analisados quanto ao desequilíbrio de ligação (LD), usando o *software* *SNP & Variation Suite v8.x* (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). O limite foi definido como $r^2=0,8$. Os *loci* SNP com LD próximo e uma menor frequência de alelo (*Minor Allele Frequency* - MAF) $< 0,05$ foram removidos.

Foram estimados a heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada, índice de informação de Shannon e coeficiente de endogamia para medir a informatividade dos marcadores SNPs retidos usando o programa GenA1Ex 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A MAF foi calculada usando o *software* *SNP & Variation Suite v8.x* (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com).

A estrutura da população das amostras de café foi determinada usando o *software* de análise de agrupamento Bayesiano baseado em modelo STRUCTURE v2.3.422. Foi utilizado o modelo de mistura e a análise foi realizada sem pressupor qualquer informação prévia sobre os grupos genéticos ou origens geográficas das amostras. Dez execuções independentes foram avaliadas para cada número fixo de clusters (valor K) variando de 1 a 10, com um comprimento de *burnin* de 50.000 seguido por 100.000 interações.

O *software* CLUMPP 1.1 (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) foi usado para encontrar os alinhamentos ideais de execuções independentes e a saída foi usada diretamente como entrada em um programa de visualização de *cluster* DISTRICT 1.1 (ROSENBERG *et al.*, 2001). O número mais provável de *clusters* foi detectado utilizando os métodos de Evanno, Regnaut e Goudet (2005), bem como o método proposto por Puechmaile (2016). Neste método, o valor médio do limite de adesão foi estabelecido em 0,5. A análise foi realizada usando o programa *online* STRUCTURE SELECTOR (LI; LIU, 2018).

Para ilustrar as relações genéticas entre os grupos e subgrupos de germoplasma, a análise multivariada baseada na distância foi realizada nos dados individuais. A distância e a covariância não foram padronizadas. Além disso, uma análise de agrupamento usando o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) foi realizada para examinar melhor a relação genética entre os genótipos e os acessos. Para avaliar as relações filogenéticas entre os grupos de germoplasma, a distância genética pareada com base na proporção de alelos compartilhados foi determinada seguindo o programa *MICROSATELLITE ANALYZER* (DIERINGER; SCHLATTERER, 2003). O dendrograma UPGMA foi gerado a partir da matriz de distância resultante usando o programa de computador PHYLIP versão 3.697 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.htm> l). O dendrograma foi visualizado com o programa *FigTree* v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação sensorial

Os dados da caracterização sensorial estão dispostos na Tabela 1. Como já comentado, apenas seis dos 15 genótipos obtiveram quantidade suficiente de grãos para realizar as análises sensoriais. Todos os genótipos e as cultivares se classificaram como bebidas especiais segundo o protocolo de classificação da SCA. Pode-se destacar que o genótipo 7 diferiu dos demais, apresentando o melhor desempenho sensorial (87,50), se categorizando como bebida de qualidade excelente, assim como os genótipos 8 e 1. Apenas o genótipo 14 não diferiu dos controles, apresentando classificação como muito bom. Na descrição do perfil sensorial (Tabela 2), descrita com base nas nuances identificadas pelos provadores *Q-graders* em avaliação feita por meio da prova de xícaras, os genótipos apresentaram notas florais e frutadas características de cafés que apresentam pontuações elevadas, categorizadas como excelentes ou excepcionais de acordo com a metodologia utilizada. São identificadas também várias outras nuances em

diferentes intensidades.

Tabela 1 - Pontuação total segundo a metodologia SCA, obtida em análise sensorial univariada para seis genótipos e duas cultivares controle (Catuaí Vermelho e Mundo Novo) referentes ao ano safra 2018/2019.

Genótipos/Cultivares controle	Pontuação*
7	87,50 a
8	86,83 b
1	86,66 b
10	85,00 c
9	84,66 c
Mundo Novo	84,16 d
14	84,00 d
Catuaí Vermelho	83,66 d
CV%	0,45

Fonte: Do autor (2020)

Tabela 2 - Nuances identificadas por três provadores com base na metodologia descrita pela SCA em seis genótipos de café e duas cultivares controle.

GENÓTIPOS/ CULTIVARES CONTROLE	DESCRIÇÃO SENSORIAL
1	Acidez viva e brilhante, corpo cremoso e aveludado, sabor floral, frutas amarelas, mel, melado, mascavo, finalização longa e prazerosa.
7	Acidez viva, corpo cremoso e macio, floral, mel, limonada suíça, frutado, finalização longa e doce.
8	Acidez viva e adocicada, corpo cremoso e macio, frutas amarelas, floral, mel, rapadura, mascavo, finalização longa e doce.
9	Acidez viva, corpo cremoso, doçura alta, mel, caramelo, chocolate ao leite, finalização longa e prazerosa.
10	Acidez adocicada, corpo cremoso, mascavo, caramelo, finalização longa.
14	Acidez média, corpo cremoso, caramelo, chocolate ao leite, mascavo, finalização longa e doce.
Mundo Novo	Acidez adocicada, corpo cremoso, doçura alta, frutas amarelas, caramelo, mascavo, chocolate ao leite, finalização longa.
Catuaí Vermelho	Acidez média, corpo cremoso, limpo, caramelo, chocolate ao leite, mascavo, finalização longa.

Fonte: Adaptado de Nadaleti (2020).

3.2 Avaliação da diversidade genética

Com a utilização de 288 marcadores moleculares SNPs foi gerado um dendrograma (Figura 1) obtido pelo método de agrupamento UPGMA. Os autovalores foram extraídos da matriz de similaridade genética encontrada entre os 62 acessos do banco de germoplasma e os 15 genótipos.

Foi observado a formação de dois grandes grupos. No grupo I, são formados vários subgrupos, dentre eles se encontra o subgrupo que compreende os 15 genótipos, demonstrando que estes genótipos possuem similaridade genética entre si e compartilham grande parte dos mesmos SNPs. No entanto, mesmo os genótipos formando um único grupo, eles se separam em pequenos agrupamentos, demonstrando que há variabilidade genética intraespecífica entre eles.

O subgrupo que compreende os genótipos está integrado dentro de um grupo maior onde estão contidos os acessos Mundo Novo IAC 379/19, Purpuracea MG0138, Icatu precoce IAC3282, Acauã e um híbrido (Acesso BAG 0179 R1) advindo do cruzamento de Catuaí x Amphilo, demonstrando uma proximidade genética entre os genótipos e essas cultivares.

Outros subgrupos demonstram a eficácia dos marcadores genéticos SNPs aqui utilizados, que possibilitaram a identificação de semelhanças entre os conjuntos gênicos da população, coerentes com dados fenotípicos e de genealogia. Pode-se destacar o agrupamento dos acessos do grupo Catuaí - Catuaí Amarelo 24/134, Catuaí Amarelo 2SL, dos acessos pertencentes ao grupo Catuaí - Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Catuaí Vermelho IAC 144. Outro agrupamento advém dos acessos do grupo Bourbon - Bourbon Amarelo Acesso BAG 0038, Bourbon Vermelho Acesso BAG 0083.

Um agrupamento muito interessante que merece destaque foi formado pelos acessos Gueisha, Gueisha porte baixo, Conilon 213 (*C. Canephora*), Robusta (*C. Canephora*), IAC 125 RN, Tupi IAC 1669-33, Polisperma Acesso BAG 0225 R2, Obatã IAC 1669-20, Sarchimor MG8840, uma vez que todos eles apresentam resistência ao fungo da ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*).

Com relação às similaridades genealógicas, um subgrupo compreendeu os seguintes acessos: Catiguá MG2, Pau Brasil MG1, Progênie H 493-1-2 cv 134, MGS Paraíso, MGS Catiguá 3, Progênie Grupo Catiguá H514, Progênie Grupo Ametista H-516-2-1-1-7-1, MGS Ametista. Todos esses acessos se originaram do cruzamento da cultivar Híbrido de Timor com cultivares do grupo Catuaí. Esse fato justifica a presença do acesso Híbrido de Timor UFV 408-11 nesse subgrupo.

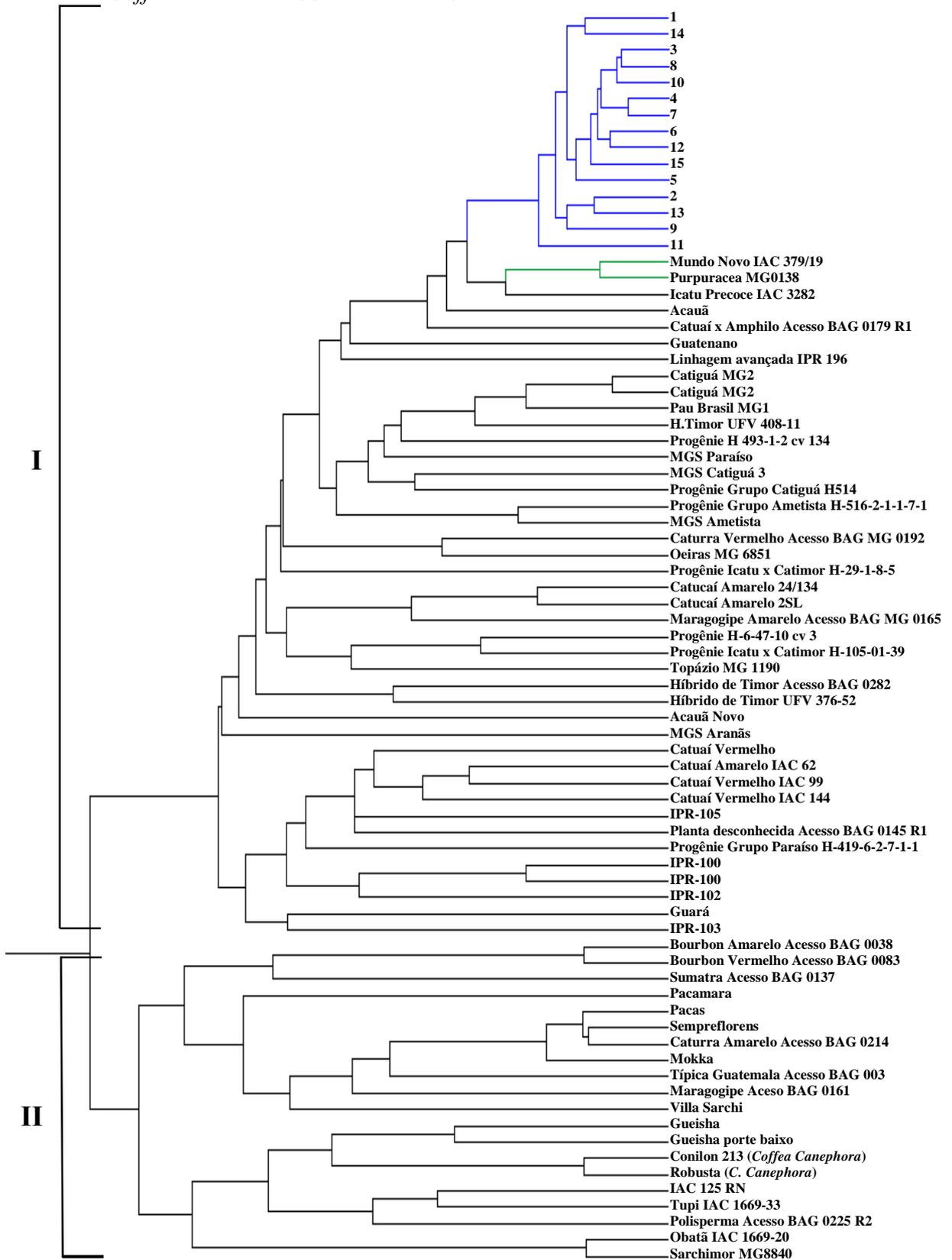
No gráfico gerado pelo *software* Structure (Figura 2) o valor mais alto do nível de

estrutura genética da população em estudo correspondeu ao delta K igual a 2 (APÊNDICE A). Este valor de $K=2$ indica que os genótipos e acessos formam dois grupos (Figura 2), bem como, pode ser observado no dendrograma (Figura 1). Os genótipos e os acessos que compartilham da mesma cor possuem em comum os mesmos SNPs, conseqüentemente apresentam frequências alélicas em comum.

Acessos compreendidos no grupo I (Figura 1) apresentam majoritariamente a coloração azul (Figura 2) e possuem acessos que passaram por programas de melhoramento genético, sendo esses registrados mais recentemente no Registro Nacional de Cultivares (MAPA, 2020) ou se encontram como linhagens avançadas. Esses acessos exibem excelente desempenho agrônômico, evidenciando que possuem frequências alélicas que foram direcionadas por meio de processos de melhoramento genético, visando objetivos pré-estabelecidos.

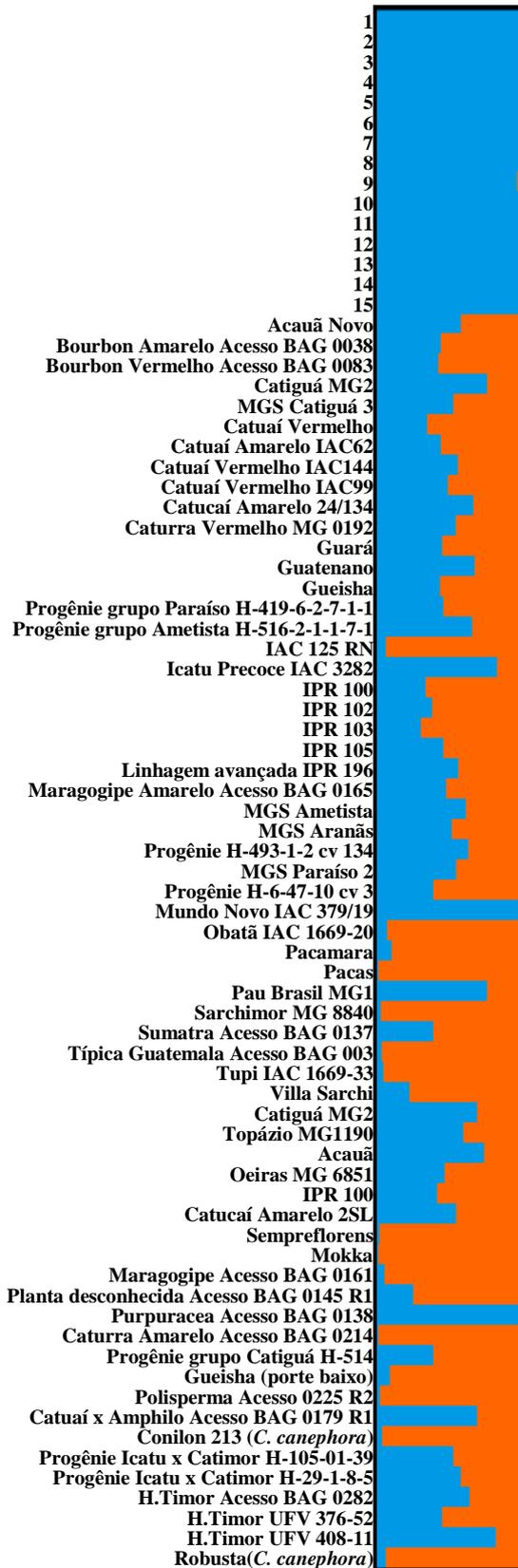
O agrupamento II (Figura 1) contém genótipos que exibem a maior proporção de cor laranja (Figura 2). Nele estão contidas cultivares que são conservadas em bancos de germoplasma visando a preservação de recursos genéticos ou para sua utilização como parentais em cruzamentos que almejam genes envolvidos em processos específicos. São acessos que, normalmente, fazem parte da coleção base do banco de germoplasma.

Figura 1 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA de 62 acessos e 15 genótipos do gênero *Coffea* utilizando 288 marcadores SNP.



Fonte: Do autor (2020).

Figura 2 - Análise da estrutura genética de 62 acessos e 15 genótipos (números de 1 a 15) obtida por meio do software Structure com K=2, baseado em 288 marcadores SNPs.



Fonte: Do autor (2020).

4 DISCUSSÃO

Muitas cultivares amplamente adotadas no início dos programas de melhoramento genético de café no Brasil foram identificadas em propriedades particulares, devido a se sobressaírem quanto à produção e/ou qualidade de bebida. Nessa conjuntura pode-se destacar as cultivares Mundo Novo, Amarelo de Botucatu, Maragogipe Vermelho, Caturra Vermelho, Caturra Amarelo, Bourbon Amarelo (CARVALHO, 2007; CARVALHO, 2008). Esses genótipos ampliaram os programas de melhoramento, pois trouxeram fatores de interesse agrônômicos que agregaram maior produtividade, coloração amarela dos frutos, melhor qualidade de bebida e porte reduzido das plantas (CARVALHO, 2007).

Os genótipos utilizados neste trabalho foram selecionados devido ao seu destaque dentro de um talhão da cultivar Mundo Novo. Os 15 genótipos apresentavam características morfológicas distintas das demais plantas, se destacando quanto ao porte, cor dos brotos e frutos grandes de coloração vermelha com elevada porcentagem de grãos retidos em peneira de tamanho igual ou superior a 16 (média de 91,4% em avaliação realizada no ano de 2015 – dados não mostrados), granulometria estabelecida de acordo com a Instrução Normativa nº 8, de 11 de junho de 2003 (BRASIL, 2003).

A granulometria dos grãos de café possui uma relação indireta importante com a qualidade sensorial. Do ponto de vista técnico, a desuniformidade dos grãos pode fazer com que em uma mesma amostra, após o processo de torra, se encontrem grãos crus, com elevada acidez, juntamente à grãos queimados ou carbonizados, que aumentam o amargor da bebida (SENAR, 2017). Sendo assim, o mercado atribui maior valor as amostras de cafés com maior uniformidade, preferencialmente aquelas com a granulometria que se enquadra nos crivos das peneiras que retém os grãos no tamanho 16 e acima (FERREIRA *et al.*, 2013; MAPA, 2003).

Diante da excelente qualidade dos grãos, análises sensoriais foram realizadas em amostras de café advindas destes 15 genótipos. Nos resultados aqui apresentados constatou-se a existência de genótipos promissores para qualidade sensorial, considerando as altas pontuações alcançadas por eles (Tabela 1), que se enquadram nas categorias de muito bom ou excelente. Na descrição do perfil sensorial obtida por meio da prova de xícaras (Tabela 2) são identificadas várias nuances em diferentes intensidades. Os genótipos apresentaram notas florais e frutadas, características de amostras de cafés com qualidade superior e pontuações elevadas, como demonstrado nos trabalhos de BERTRAND *et al.*, 2012 e FASSIO *et al.*, 2019.

De acordo com Giomo e Borém (2011), a diversificação dos atributos é uma característica de extrema importância na cultivar, visto que no mercado de cafés especiais quanto mais raros e exóticos forem os perfis sensoriais, mais valorizados serão os cafés.

Pontuações finais de avaliação sensorial que se enquadram como excelentes (85 a 89,99 pontos) ou excepcionais (acima de 90 pontos) possuem um grau de dificuldade maior para serem conquistadas, pois exigem uma maior harmonização dos vários quesitos de qualidade apresentados pelo café. Nesse contexto, o comportamento do genótipo 7 é extremamente relevante, pois no agrupamento de médias ele se destacou frente os demais, alcançando a maior pontuação no quesito total, com uma nota de 87,50 (Tabela 1).

Em avaliação realizada no ano safra 2014/2015, o genótipo 7 obteve pontuação média de 88,12 no quesito total (Dados não mostrados), mesmo diante da grande seca ocorrida no verão de 2014 (COELHO *et al.*, 2016), aliada a elevadas temperaturas e menor umidade relativa do ar. Esse genótipo vem mantendo uma estabilidade em relação à qualidade sensorial demonstrando um desempenho diferencial, com maior estabilidade ante as mudanças ambientais.

No dendrograma (Figura 1) os resultados evidenciam que os 15 genótipos testados exibem variabilidade genética intraespecífica, pois formam pequenos agrupamentos dentro de um subgrupo maior. Ademais, é possível verificar que o potencial agrônomo promissor se justifica pela inserção do subgrupo dos genótipos dentro do agrupamento I, que contém em sua maioria as cultivares mais recentemente lançadas e que apresentam excelente desempenho agrônomo.

Estudos que buscam conhecer a diversidade genética do cafeeiro, tanto ao nível de espécies (HUANG *et al.*, 2020), como de variedades (MEKBIB *et al.*, 2020), estão sendo cada vez mais realizados. Esse conhecimento auxilia na escolha das melhores estratégias de condução das populações segregantes, dentre elas a identificação de genitores contrastantes e complementares para as características almejadas. Assim sendo, nesses genótipos e acessos em estudo, são abertas possibilidades de serem aliados boa produtividade, qualidade e bons índices de diversidade genética.

Os acessos Mundo Novo IAC 379/19 e Purpurea MG0138 apresentam alta similaridade genética com o agrupamento que compreendeu os 15 genótipos (Figura 1) e compartilham quase a totalidade da mesma estrutura genética (cor azul - Figura 2). Purpurea caracteriza-se por uma mutação somática condicionada por um par de genes recessivos (*prpr*). Plantas de *C. arabica* que possuem esse fator genético manifestam em suas folhas estípulas e hastes de tonalidade arroxeadas (ANTUNES FILHO; CARVALHO, 1954; KRUG, 1949). Devido à alta proximidade apresentada no dendrograma, juntamente com a descrição fenotípica

feita pelos melhoristas envolvidos no programa de melhoramento da Epamig, este acesso nomeado de Purpuracea, trata-se de um genótipo oriundo da variedade de Mundo Novo que possui os alelos recessivos *prpr*.

É possível inferir que os 15 genótipos não são plantas de uma cultivar diferente das demais que se encontravam no mesmo local de plantio (cultivar Mundo Novo). Essa inferência é validada devido aos coerentes agrupamentos dos acessos, tanto os que compartilham da mesma genealogia - grupo Catuaí, Bourbon, Catucaí, os descendentes do cruzamento Híbrido de Timor x Catuaí Vermelho, os 15 genótipos (Figura 1) – quanto aqueles que compartilham de características fenotipicamente uniformes – grupo resistente à ferrugem alaranjada (Ver Resultados – Figura 1).

Mundo Novo é uma cultivar que apresenta ótimo aspecto vegetativo e dispõe de um sistema radicular bem desenvolvido, condições que refletem na elevada produção de café beneficiado, que podem alcançar até 100 sacas por hectare (CARVALHO, 2008; GUERREIRO-FILHO; RAMALHO; ANDRADE, 2018). Apresenta alta capacidade de rebrota e se destaca como uma das cultivares mais produtivas de *C. arabica* devido à sua alta estabilidade e adaptabilidade. Esse conjunto favorável de fatores faz com que as linhagens advindas da cultivar Mundo Novo sejam amplamente adotadas pelos produtores, se tornando uma das cultivares mais plantada no país (Instituto Agrônomo de Campinas-IAC, 2020; TASSONE *et al.*, 2019).

Entretanto, até então, cafés da cultivar Mundo Novo não apresentaram potencial para o mercado de cafés especiais de alto valor agregado, porque dificilmente atingem a classificação categorizada como excelente (FASSIO *et al.*, 2019). Diferentemente, os acessos Maragogipe (CARVALHO, 2008), Bourbon (BORÉM *et al.*, 2016), Pacamara (FASSIO *et al.*, 2019) e Gueisha (BSCA, 2020), têm reconhecidas superioridades em relação às pontuações sensoriais totais.

Dentre quatro acessos de Mundo Novo - Mundo Novo Amarelo Acesso BAG 1222, Mundo Novo Acesso BAG 1230, Mundo Novo Acesso BAG 1238, Mundo Novo Acesso BAG 1256 - deste Banco de Germoplasma avaliados por Sobreira *et al.* (2016), apenas Mundo Novo Acesso BAG 1256 alcançou pontuação total média de 85,55.

Ante o exposto, algumas hipóteses para a diferenciação desses genótipos podem ser consideradas. A primeira é a mutação. Genes envolvidos em estruturas reprodutivas podem ter passado pelo processo de mutação e ter como consequência o aumento do fruto e/ou a combinação em diferentes níveis de sua composição química. Em tomate - *Solanum lycopersicum*, mutações na sinalização do peptídeo CLV3 promovem a superproliferação de

células tronco, o que afeta positivamente o tamanho do meristema floral, resultando no desenvolvimento de órgãos extras nas flores e, conseqüentemente, frutos maiores (YUSTE-LISBONA, *et al.*, 2020).

Uma outra possibilidade é a ocorrência de eventos de poliploidização. Mesmo o café sendo uma espécie alotetraploide, pode ocorrer eventos de poliploidização resultando em plantas hexaploide, octoploide (MENDES, 1946). O aumento do tamanho e diversidade na qualidade dos frutos já foi verificado em espécies que passaram por indução à poliploidia, como *Averrhoa carambola* L. (HU *et al.*, 2020) e *Actinidia chinensis* (WU *et al.*, 2012).

Portanto, baseado nos resultados aqui apresentados, são abertas novas perspectivas para outros estudos que podem trazer novas e potenciais informações para o setor cafeeiro, levando à descoberta de alelos raros, contribuindo para o conhecimento da determinação da qualidade sensorial em plantas de *C. arabica*. Testes em futuras progênies irão contribuir para o desenvolvimento de cultivares comerciais promissoras que aliem alta qualidade sensorial a excelente desempenho agrônômico, bem como a obtenção de genitores de bom desempenho sensorial.

5 CONCLUSÕES

Os marcadores SNPs utilizados se mostraram eficientes em agrupar acessos semelhantes em características fenotípicas e/ou genealógicas.

Os 15 genótipos possuem variabilidade genética intraespecífica, bem como apresentam alta similaridade genética com o acesso Mundo Novo.

Os seis genótipos de café avaliados apresentam alta qualidade sensorial, classificados como especiais pela metodologia SCA, obtendo pontuação acima de 80, categorizados como muito bom e excelente.

O genótipo 7 se destaca quanto à qualidade sensorial, se mostrando promissor na obtenção de progênies para futuros programas de melhoramento.

REFERÊNCIAS

ANTUNES FILHO, H.; CARVALHO, A. Genética de Coffea: XIX-Mutação somática afetando a cor das folhas em café. **Bragantia**, v. 13, n. UNICO, p. XI-XII, 1954.

- BACELAR, A. C. B. *et al.* Análise do Potencial de Indicação Geográfica (IG) Para o Café de Vitória da Conquista/BA. **Revista INGI-Indicação Geográfica e Inovação**, v. 4, n. 3, p. 875-888, 2020.
- BARBOSA, M. de S. G. *et al.* Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. **Food chemistry**, v. 292, p. 275-280, 2019.
- BERTRAND, B. *et al.* Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2575-2583, 2012.
- BORÉM, F. M. *et al.* The relationship between organic acids, sucrose and the quality of specialty coffees. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 8, p. 709-717, 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 8, de 11 de junho de 2003**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade para a Classificação do Café beneficiado Grão Cru. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2003. Disponível em: <file:///C:/Users/USER/Downloads/INSTRUCAO-NORMATIVA-No8,-DE-11-DE-JUNHO-DE-2003.pdf> Acesso em 11 nov. 2020.
- BSCA - BRAZIL SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION. Disponível em: <http://brazilcoffeenation.com.br/variety/show/id/74> Acesso em: 10 mai. 2020.
- CAETANO, A. L., BARBOSA, F. da S. Probabilidade de ocorrência de chuvas extremas para região de Inconfidentes–MG. **Revista Brasileira de Climatologia**. v. 25, p. 537-548, 2019.
- CAMPA, C. *et al.* Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. **Food chemistry**, v. 88, n. 1, p. 39-43, 2004.
- CARVALHO, A. Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil. **Documentos IAC**, v. 34, p. 1-7, 2007. Disponível em: <http://ciiagro.iac.sp.gov.br/publicacoes/arquivos/iacdoc34.pdf> Acesso em 18 nov. 2020.
- CARVALHO, C. H. S. (Ed). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Embrapa Café. 1ª ed. 2008.
- CARVALHO, J. M.; PAIVA, E. L.; VIEIRA, L. M. Quality attributes of a high specification product: Evidences from the speciality coffee business. **British Food Journal**, v. 118, n. 1, p. 132-149, 2016. doi: 10.1108/BFJ-02-2015-0059
- COELHO, C. A. S. *et al.* The 2014 southeast Brazil austral summer drought: regional scale mechanisms and teleconnections. **Climate Dynamics**, v. 46, n. 11-12, p. 3737-3752, 2016.
- CRUZ, C. D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n.4, p. 547-552, 2016.
- DAVIS, A. P. *et al.* Lost and found: *Coffea stenophylla* and *C. affinis*, the forgotten coffee crop species of west Africa. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

- DIERINGER, D., SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyser (MSA): a plat-form independent analysis tool for largemicrosatellite data sets. **Molecular. Ecology Notes**, v. 3, n. 1, p. 167–169, 2003.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- FARAH, A. *et al.* Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.
- FASSIO, L. de O. *et al.* Sensory profile of arabica coffee accesses of the germplasm collection of Minas Gerais–Brazil. **Coffee Science**, v. 14, n. 3, p. 382-393, 2019.
- FERREIRA, A. D. *et al.* Desempenho agrônômico de seleções de café Bourbon Vermelho e Bourbon Amarelo de diferentes origens. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 48, n. 4, p. 388-394, 2013.
- FIGUEIREDO, L. P. *et al.* Sensory analysis and chemical composition of ‘bourbon’ coffees cultivated in different environments. **Coffee Science**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 122 - 131, 2018.
- GIOMO, G. S.; BORÉM, F. M. Cafés especiais no Brasil: opção pela qualidade. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 32, n. 261, p. 7-16, 2011.
- GUERREIRO-FILHO, O.; RAMALHO, M. A. P.; ANDRADE, Vinícius Teixeira. Alcides Carvalho and the selection of Catuaí cultivar: interpreting the past and drawing lessons for the future. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 460-466, 2018.
- HAMON, P. *et al.* Genotyping-by-sequencing provides the first well-resolved phylogeny for coffee (*Coffea*) and insights into the evolution of caffeine content in its species: GBS coffee phylogeny and the evolution of caffeine content. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 109, p. 351-361, 2017.
- HEALEY, A. *et al.* Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. **Plant Methods**, v. 10, n.1, p. 21, 2014.
- HU, Y. *et al.* A comparative study on morphological and fruit quality traits of diploid and polyploid carambola (*Averrhoa carambola* L.) genotypes. **Scientia Horticulturae**, v. 277, p. 109843, 2020.
- HUANG, L. *et al.* Resequencing 93 accessions of coffee unveils independent and parallel selection during *Coffea* species divergence. **Plant Molecular Biology**, p. 1-11, 2020.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC). Cultivares de café desenvolvidas pelo Instituto Agrônômico (IAC) e registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Registro Nacional de Cultivares - RNC). Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/cafe/tabela_rnc_cultivares_cafe_iac.pdf Acesso em 13 nov. 2020.

IVAMOTO, S. T. *et al.* Diversidade nucleotídica de genes envolvidos na biossíntese de ácidos clorogênicos de cafeeiros. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 148-156, 2013.

JAKOBSSON, M., ROSENBERG, N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, n.14, p. 1801-1806, 2007.

KOSHIRO, Y. *et al.* Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 9-10, p. 731-742, 2007.

KRUG, C. A. Mutações em *Coffea arabica* L. **Bragantia**, v. 9, n. 1-4, p. 1-10, 1949.

LEROY, T. *et al.* Genetics of coffee quality. **Brazilian journal of plant physiology**, v. 18, n. 1, p. 229-242, 2006.

LI, Y. L., LIU, J. X. Structure Selector: A web- based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. **Molecular Ecology Resources**, v. 18, n. 1, p.176-177, 2018.

LINGLE, T. R. **The coffee cupper's handbook: systematic guide to the sensory evaluation of coffee's flavor**. Washington: Coffee Development Group, 32p., 1986.

MALTA, M. R.; CHAGAS, S. J. R. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região Sul de Minas Gerais. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 1, 2009.

MEKBIB, Y. *et al.* Chloroplast Genome Sequence Variations and Development of Polymorphic Markers in *Coffea arabica*. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 1-12, 2020.

MENDES, A. J. T. Partenogênese, partenocarpia e casos anormais de fertilização em *Coffea*. **Bragantia**, v. 6, n. 6, p. 265-272, 1946.

MEROT- L'ANTHOENE, V. *et al.* Development and evaluation of a genome- wide Coffee 8.5 K SNP array and its application for high- density genetic mapping and for investigating the origin of *Coffea arabica* L. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 7, p. 1418-1430, 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Registro Nacional de Cultivares, 2020. Página inicial. Disponível em: http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php Acesso em: 21 set. 2020.

NADALETE, D. H. S. **Banco ativo de germoplasma de Minas Gerais: Avaliação física, sensorial e aceitabilidade do consumidor**. 2020. 82p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras.

PEAKALL, R.O.D., SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537–2539, 2012.

PEREIRA, T. B. *et al.* Eficiência da seleção de progênies de café F₄ pela metodologia de modelos mistos (REML/BLUP). **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 3, p.230-236, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/brag.2013.031>.

POLTRONIERI, P.; ROSSI, F. Challenges in specialty coffee processing and quality assurance. **Challenges**, v. 7, n. 2, p. 19, 2016.

PRUVOT-WOEHL, S. *et al.* Authentication of Coffea arabica Varieties through DNA Fingerprinting and its Significance for the Coffee Sector. **Journal of AOAC International**, v. 103, n. 2, p. 325-334, 2020.

PUECHMAILLE, S. J. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. **Molecular Ecology Resources**. v. 16, n. 3, p. 608-627, 2016.

ROSENBERG, N. A. *et al.* Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. **Genetics**. v. 159, n. 2, p. 699-713, 2001.

SANT'ANA, G. C. *et al.* Genome-wide association study reveals candidate genes influencing lipids and diterpenes contents in Coffea arabica L. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SCHOLZ, M. B. S. *et al.* Características físico-químicas de grãos verdes e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) do IAPAR. **Coffee Science**, v.6, n. 3, p. 245-255, 2011.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL. SENAR. **Café: classificação e degustação**. Brasília: SENAR, 112p, 2017. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/192-CAF%C3%89.pdf> Acesso em 11 nov. 2020.

SOBREIRA, F. M. *et al.* Divergence among arabica coffee genotypes for sensory quality. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, p. 1442-1448, 2016.

SOUZA, A. C. da C., SILVA, M. L. da. Geoprocessamento aplicado ao levantamento de solos no município de Inconfidentes-MG. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 9, n. 01, p. 200-214, 2016.

SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION, SCA. Cupping protocols. Disponível em: <https://sca.coffee/research/protocols-bestpractices?page=resources&d=cupping-protocols> Acesso em 10 nov. 2020.

SUNARHARUM, W. B.; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. **Food Research International**, v. 62, p. 315-325, 2014.

TASSONE, G. A. T. *et al.* Simultaneous selection in coffee progenies of Mundo novo by selection indices. **Coffee Science**. v. 14, n. 1, p. 83-92, 2019.

TRAN, H. T. M. *et al.* SNP in the *Coffea arabica* genome associated with coffee quality. **Tree Genetics & Genomes**, v. 14, n. 5, p. 72, 2018.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. *et al.* Polimorfismo de Nucleotídeo único (SNP): metodologias de identificação, análise e aplicações. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C. *et al.* (Orgs.) **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. cap. 8, 181 p., 2017.

UFER, D.; LIN, W.; ORTEGA, D. L. Personality traits and preferences for specialty coffee: Results from a coffee shop field experiment. **Food Research International**, v. 125, p. 108504, 2019.

WANG, J. *et al.* High throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic dynamic arrays. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 561, 2009.

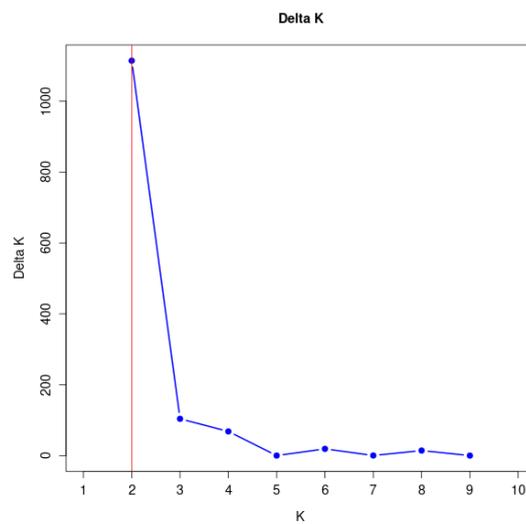
WU, J. *et al.* Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p. 169-179, 2012.

YUSTE-LISBONA, F. J. *et al.* ENO regulates tomato fruit size through the floral meristem development network. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 14, p. 8187-8195, 2020.

ZHOU, L. *et al.* Developing single nucleotide polymorphism (SNP) markers for the identification of coffee germplasm. **Tropical Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 82-95, 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A - ΔK calculado. O valor modal dessa distribuição é o K (*) verdadeiro ou o valor mais alto do nível de estrutura, aqui dois clusters.



Fonte: Do autor (2020).