

**MARCADORES MORFOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E MOLECULARES NA
CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE
SOJA E CAFÉ**

ELISA SERRA NEGRA VIEIRA

2004

ELISA SERRA NEGRA VIEIRA

**MARCADORES MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
MOLECULARES NA CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA
E CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de pós-
graduação em Agronomia, área de concentração
Fitotecnia , para obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Édila Vilela de R. Von Pinho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Vieira, Elisa Serra Negra.

Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café / Elisa Serra Negra Vieira. -- Lavras : UFLA, 2004.
137 p. : il.

Orientadora: Édila Vilela de Resende Von Pinho
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. *Glycine max*. 2. *Coffea arabica*. 3. Descritor. 4. Enzima. 5. Proteína. 6.
DNA I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.521

ELISA SERRA NEGRA VIEIRA

**MARCADORES MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
MOLECULARES NA CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA
E CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 18 de março de 2004

Pesq. Dra. Lílian Padilha – EMBRAPA

Pesq. Dr. Wander Eustáquio de Bastos Andrade – Pesagro/Rio

Prof^a. Dr^a. Dulcinéia de Carvalho – UFLA

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA

Prof^a. Dr^a. Édila Vilela R. Von Pinho
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

“Nada me perturbe. Nada me amedronte. Tudo passa. A paciência tudo alcança.
A quem tem Deus, nada falta. Só Deus basta”

(Santa Tereza D'Ávila)

OFEREÇO

Aos meus pais, Jairo e Gilda

DEDICO

Às minhas irmãs Sílvia e Gina.
Ao meu sobrinho Pedro

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua Divina Providência e Luz em minha vida.

Aos meus pais, pela educação recebida, pela confiança em mim depositada e apoio e presença em todos os momentos.

Ao querido Léo, em especial, pelo carinho, compreensão, paciência e companheirismo.

À grande amiga Édila Vilela de Resende Von Pinho, pelo exemplo, orientação, amizade e incentivo.

À Maria da Graças G.C. Vieira, pelo exemplo, amizade.

À Dulcinéia de Carvalho, pela amizade e ajuda durante todo o curso de pós-graduação.

À Lílian Padilha, pela amizade e participação na banca avaliadora.

Ao professor Samuel Pereira de Carvalho, coordenador do curso de pós-graduação em Agronomia, pelo empenho na realização do “doutorado-sanduíche”.

Ao Dr. Bem Vosman, pela orientação e paciência durante a realização dos trabalhos no Plant Research International, Holanda.

Aos amigos Danny, Wendy, Martijn e Yolanda, pela ajuda nos experimentos realizados no Plant Research International, Holanda.

À Priscila, Mari e Elenir, pela colaboração nos experimentos realizados no Laboratório de Análise de Sementes na Universidade Federal de Lavras.

Aos professores do Setor de Sementes da Universidade Federal de Lavras, Maria Laene Moreira de Carvalho, João Almir e Renato Mendes Guimarães, pela amizade e orientação durante todo o curso de pós-graduação.

À D. Elza, Andréa e Dalva, funcionárias do Laboratório de Análise de Sementes, pela disponibilidade e amizade.

À Solange, grande amiga, por ter sido minha procuradora, por torcer sempre por mim e pela convivência durante todo o curso.

Aos demais colegas de curso, Dinara, Kalinka, Luciana, Maria de Lourdes, Sandro e Tida, pelo companheirismo e amizade.

Ao Fábio (Necaf), pelas informações e ajuda nas coletas de café.

Ao Dr. Ivan Schuster, pela ajuda nas discussões referentes a marcadores moleculares.

Ao Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio e suporte financeiro para a realização do curso.

A todos, que de alguma maneira, participaram e ajudaram na realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | i |
| RESUMO GERAL..... | iii |
| GENERAL ABSTRACT..... | v |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| | |
| CAPÍTULO 1: Caracterização de cultivares de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill) por meio de marcadores morfológicos e bioquímicos de proteínas e enzimas..... | 4 |
| Resumo..... | 4 |
| Abstract..... | 6 |
| 1 Introdução..... | 7 |
| 2 Referencial teórico..... | 8 |
| 2.1 Soja: origem, disseminação, diversidade genética e importância econômica..... | 8 |
| 2.2 Registro e proteção de cultivares..... | 10 |
| 2.3 Descritores morfológicos..... | 12 |
| 2.4 Marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas..... | 17 |
| 3 Material e métodos..... | 25 |
| 3.1 Avaliação dos descritores morfológicos..... | 27 |
| 3.2 Extração de proteínas e eletroforese..... | 32 |
| 3.3 Extração de enzimas e eletroforese..... | 34 |
| 4 Resultados e Discussão..... | 36 |
| 4.1 Descritores morfológicos..... | 36 |
| 4.2 Marcadores bioquímicos de proteínas..... | 47 |
| 4.3 Marcadores bioquímicos de enzimas..... | 50 |
| 5 Conclusões..... | 67 |
| 6 Referências bibliográficas..... | 69 |
| 7 Considerações finais..... | 75 |

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de marcadores microsatélite para a caracterização de cultivares de <i>Coffea arabica</i> L..... | 76 |
| Resumo..... | 76 |
| Abstract..... | 78 |
| 1 Introdução..... | 79 |
| 2 Referencial teórico..... | 80 |
| 2.1 Cafeeiro: classificação botânica, origem, disseminação e importância econômica..... | 80 |
| 2.2 Diversidade genética..... | 83 |
| 2.3 Identidade genética e registro de cultivares..... | 90 |
| 2.4 Marcadores microsatélite..... | 91 |
| 3 Material e métodos..... | 95 |
| 3.1 Material vegetal e extração do DNA..... | 95 |
| 3.2 Busca de seqüências microsatélite publicadas para <i>C.arabica</i> | 98 |
| 3.3 Desenvolvimento de marcadores SSR..... | 98 |
| 3.4 Amplificação dos locos SSR e eletroforese..... | 101 |
| 3.5 Avaliação de fragmentos de tamanho não esperado..... | 103 |
| 3.6 Análise dos dados..... | 104 |
| 4 Resultados e discussão..... | 106 |
| 4.1 Busca de seqüências SSR publicadas para <i>C.arabica</i> | 106 |
| 4.2 Bibliotecas genômicas enriquecidas..... | 106 |
| 4.3 Caracterização dos locos SSR..... | 110 |
| 4.4 Variação alélica..... | 112 |
| 4.5 Caracterização de cultivares de café..... | 118 |
| 5 Conclusões..... | 125 |
| 6 Referências bibliográficas..... | 127 |
| 7 Considerações finais..... | 135 |
| ANEXOS..... | 136 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACO – Aconitase
ACP – Fosfatase ácida
ADH – Álcool desidrogenase
AFLP – Amplified Fragment Length Phlymorphism
ALP – Fosfatase alcalina
AOSA – Association of Official Seed Analysis
BS - Bootstrap
DHE – Distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade
DIA – Diaforase
EST – Esterase
EU – Urease
GOT – Glutamato oxaloacetado desidrogenase
IDH – Isocitrato desidrogenase
ISTA - International Seed Testing Association
LAP – Leucina aminopeptidase
LPC – Lei de Proteção de Cultivares
MDH – Malato desidrogenase
N – Tamanho efetivo
PGD – 6-fosfogluconato desidrogenase
PGM – Fosfoglucoisomerase
PMSF – Alpha-toluenesulfonyl fluoride
PO – Peroxidase
PRI – Plant Research International
RAPD – Random Amplified Polymorphism DNA
RNC – Registro Nacional de Cultivares
SDS – Dodecil sulfato de sódio

SNPC – Serviço Nacional de Proteção de Cultivares

SOD – Superóxido dismutase

SSR – Microssatélite

UPGMA – Unweighted Pair-Group Method

UPOV – International Union for the Protection of New Varieties of Plants

VMCS – Vírus do Mosaico Comum da Soja

RESUMO GERAL

VIEIRA, Elisa Serra Negra. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café.** 2004. 137 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A caracterização de cultivares pode ser realizada por meio de marcadores morfológicos, bioquímicos de proteínas e enzimas e moleculares. Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram identificar dez cultivares de soja, recomendadas para o estado de Minas Gerais, por meio de marcadores morfológicos e bioquímicos de proteínas e enzimas, e desenvolver novos locos microssatélite (SSR) específicos para *Coffea arabica* L. e testa-los, juntamente com os já existentes e disponíveis, na caracterização de 25 cultivares de café. Para a soja, os marcadores morfológicos avaliados nos estádios de plântula, planta e semente foram os recomendados na Lei de Proteção de Cultivares e UPOV e se mostraram eficientes na separação das dez cultivares. Marcadores específicos para sete das dez cultivares foram obtidos como: intensidade de antocianina muito forte no hipocótilo das plântulas da cultivar Conquista; folíolos laterais oval-pontiagudos e ciclo total semi-precoce para a cultivar Liderança; rugosidade muito forte e sementes de tamanho pequeno para a cultivar Confiança; vagens de coloração marrom claro para a cultivar Splendor; plantas de altura baixa e dente apical grande para a cultivar UFV-16; intensidade clara da cor verde das folhas, folíolos laterais lanceolado-estreitos e ciclo vegetativo tardio para a cultivar Garantia, e brilho do tegumento de intensidade média para a cultivar Vencedora. A extração de proteínas totais com borato 0,02M +tampão desnaturante possibilitou a separação das cultivares em três grupos: 1) Conquista, BRIAC 21 e Garantia; 2) Liderança, Confiança e Monarca; 3) Splendor, UFV 16, FT 2000 e Vencedora. Quanto às proteínas resistentes ao calor, foram obtidos dois padrões protéicos, possibilitando a separação das cultivares Conquista, Confiança, Splendor, FT 2000 e Monarca das demais. Os sistemas enzimáticos superóxido dismutase, diaforase, fosfoglucomutase, esterase, álcool desidrogenase, isocitrado desidrogenase e peroxidase se mostraram altamente polimórficos. De acordo com o dendrograma obtido a partir dos coeficientes de similaridade genética de Jaccard para esses sistemas enzimáticos, as cultivares foram separadas em seis grupos: 1) Conquista e Confiança; 2) Splendor e FT 2000; 3) UFV 16 e Garantia; 4)

* Comitê Orientador: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFPA (Orientadora), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFPA, Dr. Ben Vosman – Plant Research International (PRI).

BRIAC 21; 5) Liderança e Monarca; 6) Vencedora. Oito das dez cultivares apresentaram pelo menos um padrão específico dentre todos os sistemas enzimáticos estudado. Para o café, 140 marcadores microssatélite foram utilizados para analisar a similaridade genética entre 25 cultivares de *C. arabica*, sendo 19 cultivares brasileiras de importância econômica e seis híbridos indianos de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. liberica*. Do número total de marcadores microssatélite testados, 127 marcadores nucleares foram desenvolvidos a partir de seqüências obtidas mediante a construção de bibliotecas genômicas, e seqüências microssatélite específicas para *C. arabica* disponíveis no banco de dados NCBI e 13 marcadores desenvolvidos a partir do DNA de cloroplasto foram testados. Vinte e dois locos foram polimórficos, com 2-7 alelos detectados para cada loco, sendo 3,5 o número médio de alelos por loco. Os locos 59 e 17 se mostraram como sendo os mais discriminativos para as cultivares brasileiras, apresentando ambos seis fenótipos alélicos e número efetivo de alelos igual a 3,9 e 3,4, respectivamente. A maioria dos locos microssatélite apresentou repetições de di-nucleotídeos GT, estando o polimorfismo positivamente correlacionado com o número de repetições. Baseado no padrão de bandas gerado pelos locos polimórficos, as vinte e cinco cultivares foram separadas em dois grandes grupos, sendo um grupo composto pela maioria das cultivares brasileiras e um segundo composto pelos híbridos indianos. Muitos mutantes que se diferenciavam pela cor de fruto não puderam ser separados. Pelos dados do agrupamento foi observado elevado nível de similaridade genética entre as cultivares brasileiras, o que está de acordo com a genealogia.

GENERAL ABSTRACT

VIEIRA, Elisa Serra Negra. **Morphological, biochemical and molecular markers in soybean and coffee cultivars characterization.** 2004. 137 p. Thesis (Doctorate in Plant Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Cultivar characterization can be realized using morphological, biochemical and molecular markers. The aims of the present work were identify ten soybean cultivars recommende to Minas Gerais state using morphological and biochemical markers of proteins and enzymes, and develop new microsatellite loci specific for *Coffea arabica* and testing, with the ones available, in coffee cultivars characterization. To soybean the morphological markers evaluated in seedlings, plant and seeds were those ones recommend by Cultivars Protection Act and UPOV and were efficient in cultivars separation. Specific marker to seven of the ten cultivars were obtained: very high anthocyanin intensity in hypocotyls of Conquista seedlings; pointed ovate lateral leaflet and early to medium maturity time to Liderança; very strong blistering and small seeds to Confiança; light brown pods to Splendor; short plants and big apical tooth to UFV 16; light intensity of leaves green color, lanceolate lateral leaflet and late time of flowering to Garantia; medium intensity of of testa brilliance to Vencedora. The total protein extraction with borato 0,02M + denaturation buffer separated the cultivars in three groups: 1) Conquista, BRIAC 21 and Garantia; 2) Liderança, Confiança and Monarca; 3) Splendor, UFV 16, FT 2000 and Vencedora. The heat resistant proteins generated two protein patterns, separating the cultivars Conquista, Confiança, Splendor, FT 2000 and Monarca from the others. Superoxide dismutase, diaforase, phosphoglucomutase, esterase, alcohol desidrogenase, isocitrado desidrogenase and peroxidase were highly polymorphic. According to the dendrogram obtained from the Jaccard genetic similarity coefficient, the cultivars were separated in six groups: 1) Conquista and Confiança; 2) Splendor and FT 2000; 3) UFV 16 and Garantia; 4) BRIAC 21; 5) Liderança and Monarca; 6) Vencedora. Eight of the ten cultivars showed at least one specific pattern among those enzymatic systems studied. To coffee A set of 140 SSR markers were used to analyze the genetic similarity among twenty five *C. arabica* cultivars composed of nineteen brazilian cultivars of commercial importance, and six indian hybrids of *C. arabica*, *C. canephora* and

* Guidance Committee: Dr. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Major Professor), Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA.

C. liberica. Of the total number of SSR markers tested 127 DNA nuclear markers were developed using enriched small insert libraries and the coffee SSR sequences available in the NCBI database. Beyond these, thirteen universal chloroplast DNA markers were also tested. Among the twenty-two polymorphic loci 2-7 alleles were detected for each locus with an average of 3.5 alleles per locus. The loci 59 and 17 were the most discriminating for Brazilian cultivars, both with 6 allelic phenotypes and 3.9 and 3.4 effective alleles, respectively. The majority of the SSR loci contained di-nucleotide (GT) repeats and the polymorphism was positively correlated with the number of repeats. Based on the band patterns generated by the polymorphic SSR loci, the set of twenty-five coffee cultivars were clustered in two main groups. One group composed of the most part of the Brazilian cultivars and a second one composed of the Indian hybrids. Many of the color mutants were not separated. Based on the clustering a high level of genetic similarity was observed among the Brazilian cultivars, what is in agreement with the genealogy data.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, o Brasil é o segundo produtor mundial de soja e o primeiro de café, sendo estas importantes culturas para o agronegócio brasileiro.

Mediante a importância dessas culturas e com a implementação da Lei de Proteção de Cultivares (LPC), está havendo um crescente interesse no registro e proteção de cultivares de *Glycine max* e *Coffea arábica*, garantindo dessa forma, os direitos dos obtentores

Cultivares de café como Acaiá, Catuaí Vermelho e Amarelo, Rubi, Topázio, Mundo Novo e Icatu Amarelo e Vermelho estão inscritas no Registro Nacional de Cultivares (RNC).

Em relação a soja, 444 cultivares estão registradas junto ao RNC e 241 já estão protegidas, como as cultivares Liderança, Confiança, Garantia e Monarca. Esses números fazem da soja a cultura com o maior número de pedidos de proteção e número de certificados de proteção emitidos.

Uma cultivar para ser protegida deve ser registrada e submetida ao teste de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade, também conhecido como teste DHE (distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade). Esse teste consiste na avaliação de várias características morfológicas nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Tais características são denominadas descritores mínimos, são específicos para cada espécie e recomendados pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares.

Segundo a Lei de Proteção de Cultivares, os descritores mínimos recomendados para soja e café são características a serem avaliadas nos estádios de plântula, planta e semente, como também a resistência a doenças, no caso da soja. Ainda, avaliações adicionais, como a eletroforese de proteínas e enzimas, são recomendadas em casos especiais.

Os marcadores morfológicos são a classe de marcadores tradicionalmente utilizada na caracterização de cultivares e tem sua importância reconhecida. No entanto, apresentam algumas limitações principalmente pelo efeito do ambiente, não sendo estáveis, além de muitos serem avaliados nas plantas adultas, o que requer tempo e espaço físico para as avaliações. No caso do café, essa última limitação é ainda mais relevante, por se tratar de uma cultura perene. Em relação à soja, por ser essa uma cultura de base genética estreita, muitas cultivares se apresentam morfológicamente semelhantes.

Marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas também são produtos da expressão de genes, podendo ser utilizados como descritores para a caracterização de cultivares. Por meio desses marcadores é possível obter resultados de forma rápida. Tais marcadores já são empregados nos programas de controle da qualidade genética em muitas empresas produtoras de sementes na Europa e América do Norte, sendo recomendados pela ISTA (International Seed Testing Association) e UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants) para a caracterização de cultivares.

Mediante o crescente interesse na proteção de cultivares de soja e a base genética estreita das mesmas, se faz necessário a caracterização de cultivares não só por marcadores morfológicos, mas também por marcadores bioquímicos e proteínas e enzimas.

Para a inscrição de cultivares junto ao RNC, são necessárias informações quanto a identidade genética do material, a qual é definida como o conjunto de caracteres genotípicos e fenotípicos da cultivar. Entretanto, os caracteres genotípicos ainda não estão incluídos na lista de descritores mínimos recomendados na Lei de Proteção de Cultivares.

Informações mais precisas quanto à identidade genética são necessárias quando se trata de espécies de base genética muito estreita, como o café. Nesse

caso, a utilização de marcadores moleculares se faz mais adequada para a caracterização de cultivares.

Os marcadores moleculares de microssatélite (SSR) têm sido os mais recomendados para a caracterização de cultivares, sendo sua aplicação dependente do desenvolvimento de locos específicos para cada espécie. Atualmente, as estratégias para o desenvolvimento desses locos estão bem definidas e a etapa de sequenciamento teve seu custo reduzido com a automatização do processo, o que tem possibilitado o desenvolvimento de locos SSR para as mais diferentes espécies. Para *Coffea arabica*, no entanto, o número de locos SSR disponíveis ainda é reduzido, sendo necessário a obtenção de novos locos.

Dessa forma, foram objetivos deste trabalho, caracterizar dez cultivares de soja por meio de marcadores morfológicos e bioquímicos de proteínas e enzimas, e desenvolver novos locos SSR específicos para *C. arabica*, além de testá-los, juntamente com os já existentes, na caracterização de 25 cultivares de café.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA (*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL) POR MEIO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MARCADORES BIOQUÍMICOS DE PROTEÍNAS E ENZIMAS

RESUMO

VIEIRA, Elisa Serra Negra. **Caracterização de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) por meio de descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas.** 2004. Cap. 1, 72 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A utilização de descritores morfológicos e bioquímicos tem sido recomendada para fins de caracterização e caracterização de cultivares de soja. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar dez cultivares de soja por meio de descritores morfológicos e bioquímicos de proteínas e enzimas. Os descritores morfológicos avaliados nos estádios de plântula, planta e semente foram os recomendados na Lei de Proteção de Cultivares e pela UPOV e se mostraram eficientes na separação das dez cultivares. Descritores morfológicos específicos para sete das dez cultivares foram obtidos como: intensidade de antocianina muito forte no hipocótilo das plântulas da cultivar Conquista; folíolos laterais oval-pontiagudos e ciclo total semi-precoce para a cultivar Liderança; rugosidade muito forte e sementes de tamanho pequeno para a cultivar Confiança; vagens de coloração marrom claro para a cultivar Splendor; plantas de altura baixa e dente apical grande para a cultivar UFV-16; intensidade clara da cor verde das folhas, folíolos laterais lanceolado-estreitos e ciclo vegetativo tardio para a cultivar Garantia e brilho do tegumento de intensidade média para a cultivar Vencedora. A extração de proteínas totais com borato 0,02M + tampão desnaturante possibilitou a separação das cultivares em três grupos: 1)

* Comitê Orientador: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFPA (Orientadora), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFPA.

Conquista, BRIAC 21 e Garantia; 2) Liderança, Confiança e Monarca; 3) Splendor, UFV 16, FT 2000 e Vencedora. Quanto às proteínas resistentes ao calor, foram obtidos dois padrões protéicos, possibilitando a separação das cultivares Conquista, Confiança, Splendor, FT 2000 e Monarca das demais. Os sistemas enzimáticos superóxido dismutase, diaforase, fosfoglucomutase, esterase, álcool desidrogenase, isocitrato desidrogenase e peroxidase mostraram-se altamente polimórficos. De acordo com o dendrograma obtido a partir dos coeficientes de similaridade genética dos sistemas enzimáticos, as cultivares foram separadas em seis grupos: 1) Conquista e Confiança; 2) Splendor e FT 2000; 3) UFV 16 e Garantia; 4) BRIAC 21; 5) Liderança e Monarca e 6) Vencedora. Oito das dez cultivares apresentaram pelo menos um padrão específico dentre todos os sistemas enzimáticos analisados.

ABSTRACT

VIEIRA, Elisa Serra Negra. **Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivar characterization using morphological and biochemical markers of protein and enzyme.** 2004. Cap. 1, 72 p. Thesis (Doctorate in Plant Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The use of morphological and biochemical markers have been recommended to the cultivar characterization and identification. The aim of this work was characterize ten soybean cultivars using morphological and biochemical markers of protein and enzyme. The morphological markers evaluated in seedlings, plant and seeds were those ones recommend by Cultivars Protection Act and UPOV and were efficient in cultivars separation. Specific marker to seven of the ten cultivars were obtained: very high anthocyanin intensity in hypocotyls of Conquista seedlings; pointed ovate lateral leaflet and early to medium maturity time to Liderança; very strong blistering and small seeds to Confiança; light brown pods to Splendor; short plants and big apical tooth to UFV 16; light intensity of leaves green color, lanceolate lateral leaflet and late time of flowering to Garantia; medium intensity of of testa brilliance to Vencedora. The total protein extraction with borato 0,02M + denaturation buffer separated the cultivars in three groups: 1) Conquista, BRIAC 21 and Garantia; 2) Liderança, Confiança and Monarca; 3) Splendor, UFV 16, FT 2000 and Vencedora. The heat resistant proteins generated two protein patterns, separating the cultivars Conquista, Confiança, Splendor, FT 2000 and Monarca from the others. Superoxide dismutase, diaforase, phosphoglucomutase, esterase, alcohol desidrogenase, isocitrado desidrogenase and peroxidase were highly polymorphic. According to the dendrogram obtained from the Jaccard genetic similarity coefficient, the cultivars were separated in six groups: 1) Conquista and Confiança; 2) Splendor and FT 2000; 3) UFV 16 and Garantia; 4) BRIAC 21; 5) Liderança and Monarca; 6) Vendedora. Eight of the ten cultivars showed at least one specific pattern among those enzymatic systems studied.

* Guidance Committee: Dr. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Major Professor), Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo produtor mundial de soja e atualmente esta é uma das mais importantes culturas para o agronegócio brasileiro.

Devido à sua valorização econômica, o número de cultivares de soja disponíveis no mercado vem aumentando a cada safra, como também o número de pedidos de proteção junto ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares, assim como o número de certificados de proteção já emitidos. Até o momento, 444 cultivares de soja estão registradas no Registro Nacional de Cultivares e 241 estão protegidas.

Segundo a Lei de Proteção de Cultivares, para o registro e proteção de cultivares, essas devem ser submetidas ao teste de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade, que consiste na avaliação de características morfológicas ao longo do desenvolvimento da planta e, em casos especiais, avaliações de padrões protéicos e enzimáticos.

Os descritores morfológicos, apesar de serem os mais recomendados e utilizados, apresentam algumas desvantagens, como influência do ambiente, das condições nutricionais de planta e presença de microrganismos, além de requererem tempo e espaço para serem avaliados e apresentarem certo grau de subjetividade nas avaliações. Ainda, sendo a soja uma cultura de base genética estreita, as cultivares se apresentam morfológicamente semelhantes, o que dificulta a separação das mesmas por meio desses marcadores.

Sendo assim, a utilização de marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas, tem sido recomendada para a caracterização de cultivares. Muitas empresas produtoras de sementes, na Europa e América do Norte, já têm utilizado esses marcadores na avaliação da qualidade genética de seus produtos. Além disso, a aplicação desses marcadores é recomendada pela UPOV para fins

de caracterização de cultivares, bem como sua associação com descritores morfológicos.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar cultivares de soja por meio de descritores morfológicos e bioquímicos de proteínas e enzimas sugeridos na Lei de Proteção de Cultivares e pela UPOV para a espécie *Glycine max* (L.) Merrill.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Soja: origem, disseminação, diversidade genética e importância econômica

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, tem como centro de origem o continente asiático, mais precisamente a região nordeste da China (Hymowitz, 1970). É uma leguminosa anual, autógama e apresenta flores brancas ou roxas. Estudos morfológicos, taxonômicos e de especiação têm demonstrado que a espécie cultivada *G.max* tem como ancestral *G.soja*, a qual é considerada a espécie selvagem, sendo morfológicamente semelhante à espécie cultivada e podendo ser encontrada na China, Japão e Taiwan.

Baseado em evidências citogenéticas, Hymowitz (1970) sugere que *G.max* e *G.soja* seriam uma única espécie, possuindo o mesmo número de cromossomos $2n = 2x = 40$.

A introdução da cultura da soja no Brasil ocorreu no século XIX, inicialmente na Bahia. Posteriormente, foi introduzida nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (Bonato e Dall'Agnoll, 1986). O estabelecimento e o crescimento da cultura da soja nesses estados ocorreu devido à excelente adaptação das cultivares introduzidas do sul dos Estados Unidos (Bonato e Bonato, 1987). No entanto, o cultivo comercial de soja se iniciou bem mais

tarde, sendo as primeiras estatísticas oficiais referentes à produção de soja no Brasil datadas de 1941.

A partir de 1960, a cultura se expandiu dentro dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul e também para outros estados como Santa Catarina e Paraná. Ainda naquela época predominavam as cultivares e linhagens americanas, muitas das quais se tornaram importantes cultivares dessas regiões. Com a identificação das cultivares de melhor adaptação, os melhoristas passaram a combinar as características destas por meio de hibridações (Bonetti, 1983). Assim, uma série de novas cultivares provenientes dos programas de melhoramento brasileiro contribuiu significativamente, já na década de 70, para a elevação dos índices de produtividade.

Na mesma época, a soja começou a ser cultivada na chamada região de expansão, a qual abrangia os estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Distrito Federal, Bahia e Maranhão. Segundo Kiihl et al. (1986), essa expansão foi favorecida pelo desenvolvimento de cultivares melhoradas e adaptadas às zonas equatoriais. Para tanto, procurou-se manter o mesmo tipo de soja utilizado no sul do país, alterando, principalmente, a resposta ao fotoperíodo, por meio da introdução de genes que retardam o florescimento.

Dessa forma, o desenvolvimento de cultivares mais produtivas, estáveis e melhor adaptadas às diferentes condições de cultivo foi uma importante contribuição para o estabelecimento da soja no Brasil (Almeida et al., 1997).

Estudos da base genética das cultivares brasileiras revelaram que o germoplasma utilizado em programas de melhoramento para esta espécie no país como um todo pode ser considerado como uma população de baixo tamanho efetivo ($N=11$ a 15) (Vello et al., 1988). Assim, apenas 11 ancestrais contribuíam com 89% do conjunto de genes do germoplasma brasileiro de soja (Hiromoto e Vello, 1988). Nos Estados Unidos uma situação semelhante foi

encontrada, sendo que 25 ancestrais participavam de 90% do conjunto gênico das cultivares lançadas entre 1947 e 1988 (Gizlice et al., 1994). A estreita base genética, aliada à seleção das mesmas populações por um longo período de tempo, resulta na obtenção de cultivares muito semelhantes geneticamente, o que dificulta a caracterização de cultivares. Além disso, os ganhos genéticos para produção de grãos e a vulnerabilidade genética a fatores bióticos e abióticos também ficam comprometidos com o estreitamento da base genética (Bratuagar, 1999).

Quanto à importância econômica da cultura da soja para o Brasil, atualmente, o país é o segundo produtor mundial dessa leguminosa, alcançando, na safra 2002/2003, uma produção de aproximadamente 56 milhões de toneladas de grãos, o que faz com que a referida cultura seja uma das mais importantes (Agrianual, 2004).

Devido às suas múltiplas utilizações, a cultura da soja é responsável pela formação de uma complexa estrutura de produção, armazenamento, processamento e comercialização. Estima-se que o “complexo da soja” será o grande responsável pelo desempenho positivo do agronegócio brasileiro em 2004 (CaSh, 2004).

2.2 Registro e proteção de cultivares

Em 1997, foi implementada a Lei de Proteção de Cultivares (LPC) no Brasil (Brasil, 1997). Essa lei é um complemento da Lei de Propriedade Industrial, também conhecida como Lei de Patentes, e impede o patenteamento de material de reprodução ou de multiplicação vegetativa, o que traria prejuízos para o setor agropecuário brasileiro.

São objetivos da LPC a proteção de novas cultivares ou cultivares essencialmente derivadas produzidas nos programas de melhoramento genético conduzidos por instituições de pesquisa públicas e privadas, como também a garantia dos direitos do criador.

Como conseqüência da implementação da referida lei, houve um aumento nos investimentos em pesquisa, principalmente no setor privado, resultando no desenvolvimento de novas cultivares mais adaptadas às exigências dos agricultores. Desde sua implementação, o número de novas cultivares de milho e soja, entre outras, lançadas no mercado, tem aumentado a cada safra.

Juntamente com a LPC, foi criado o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), o qual tem como competências a proteção e o registro nacional de cultivares. As principais atividades do SNPC são a inclusão de novas espécies no Sistema de Proteção de Cultivares, elaboração e revisão de descritores e implantação e acompanhamento dos ensaios para a caracterização de cultivares.

Segundo a Nova Lei de Sementes, a qual foi implementada em agosto de 2003, uma cultivar para ser protegida deve ser registrada e submetida ao teste de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade, também denominado teste de DHE (Brasil, 2003). Esse teste consiste na avaliação de uma série de características morfológicas nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Tais características, denominadas descritores mínimos, são específicas para cada espécie e recomendadas pelo SNPC.

Os descritores mínimos recomendados para soja se constituem de características morfológicas a serem avaliadas nos estádios de plântula e planta, e, para fins especiais, avaliações adicionais, como eletroforese de proteínas e enzimas (Brasil, 1997).

Atualmente, 444 cultivares de soja estão registradas junto ao RNC e 241 cultivares já estão protegidas. Sendo a soja a cultura com o maior número de

pedidos de proteção e número de certificados de proteção emitidos, há um grande interesse na caracterização de cultivares da referida cultura e na obtenção de marcadores para esse fim.

2.3 Descritores morfológicos

As regras da ISTA (International Seed Testing Association) (ISTA, 1996), o manual da AOSA (Association of Official Seed Analysis) (AOSA, 1991) e as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), recomendam a caracterização de espécies e cultivares por meio de características morfológicas de sementes, plântulas e plantas.

No caso da soja, os seguintes descritores morfológicos têm sido indicados pela LPC para caracterização de cultivares: presença e intensidade de antocianina no hipocótilo, tipo e hábito de crescimento, altura da planta, cor e densidade de pubescência na haste principal, intensidade da cor verde e rugosidade das folhas, forma e tamanho do folíolo lateral, cor da flor, ciclo vegetativo (da emergência à floração) e ciclo total (da emergência à maturação), resistência das plantas ao acamamento, cor e resistência das vagens à deiscência, tamanho e forma das sementes, cor e intensidade do brilho do tegumento, cor do hilo, reação a peroxidase e peso de 100 sementes. Ainda na LPC são avaliadas as reações à pústula bacteriana, à mancha “olho de rã” raças 1, 14, 15 e 23, ao cancro da haste, à podridão parda da haste, ao oídio, à mancha alva, à podridão vermelha da raiz, ao vírus do mosaico comum da soja (VMCS), aos nematóides de galhas *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, e ao nematóide de cisto *Heterodera glycines*.

Segundo a UPOV (União Internacional para Proteção das Obtenções Vegetais) (UPOV, 1998), responsável pela implementação da Convenção

Internacional de Proteção de Novas Variedades de Plantas, os mesmos descritores morfológicos acima citados são recomendados para a caracterização de cultivares de soja, acrescentado-se somente a avaliação da cor do funículo nas sementes, se igual ou diferente da cor do tegumento.

O controle genético de alguns descritores morfológicos qualitativos e de resistência a algumas doenças já é conhecido (Destro et al., 1990). A forma do folíolo é controlada pelo gene LN, sendo que folíolos estreitos são codificados pelo alelo ln, enquanto folíolos largos por Ln. Um elevado número de sementes por vagem parece estar associado com o caráter folíolo estreito e, freqüentemente, muitas vagens de quatro sementes ocorrem em plantas com folíolos desse tipo. O tipo de folíolo oval é codificado pelo alelo recessivo lo estando esse caráter associado com o baixo número de sementes por vagem (Bernard e Weiss, 1973)¹. Segundo Domingo (1945)¹, o alelo ln é epistático sobre Lo/lo.

Em relação ao caráter rugosidade das folhas, este é codificado pelos alelos lb1lb2 em homozigose (Rode e Bernard, 1975)¹.

Quanto ao tipo de crescimento, dois genes que afetam a terminação do caule foram descritos por Bernard (1972)¹. O crescimento determinado das cultivares de soja do sul dos Estados Unidos, sul do Brasil, Japão e Coréia, é controlado pelo alelo dt1, o qual é recessivo e causa a terminação abrupta do crescimento no ápice do caule no período de florescimento, enquanto o crescimento indeterminado é condicionado pelo alelo Dt1.

Bernard (1975)¹ trabalhou com linhas isogênicas das cultivares Clark e Harosoy e reportou uma série alélica sendo responsável pelos caracteres altura de planta, número de nós e comprimento dos entrenós. O autor indicou os

¹: Citados por Destro et al., 1990

seguintes genótipos, em ordem ascendente, controlando a altura da planta: SS, Ss, Ss^t, ss, ss^t, s^ts^t.

Em relação à época de florescimento (ciclo vegetativo) e maturação (ciclo total), foram identificados cinco genes controlando estes caracteres, sendo que cada um possui dois alelos. O alelo E₁ do gene E1 está relacionado com o atraso no florescimento e maturação. O alelo e₂ do gene E2 está relacionado com a antecipação do florescimento e maturação. Para esses dois genes (E1 e E2), o alelo tardio pareceu ser dominante, além de haver, até certo grau, um efeito aditivo entre eles. Ou seja, na cultivar Clark, quando o genótipo e₁E₂, o qual é o normal, foi substituído por E₁e₂, houve um atraso de apenas nove dias no florescimento e de um dia na maturação (Bernard, 1971)¹. O terceiro gene E3, tem o alelo e₃ relacionado com a antecipação do florescimento e maturação (Bernard e Weiss, 1973)¹. O gene E4 está relacionado à sensibilidade ao fotoperíodo, sendo que o alelo E₄ codifica a sensibilidade ao fotoperíodo, atrasando o florescimento sob dias longos, enquanto o alelo e₄ codifica insensibilidade ao fotoperíodo (Buzzell e Voldeng, 1980)¹.

Muitas cultivares de soja possuem sementes recobertas por uma camada fina, a qual lhes confere um brilho fosco, enquanto sementes de outras cultivares não apresentam essa camada e exibem um tegumento brilhante. Três genes, B1, B2 e B3, foram necessários para apresentar o tegumento da sementes fosco na cultivar Sooty (Woeworth, 1932)¹.

A cor da flor da maioria das cultivares de soja é roxa ou branca. Essa diferença é atribuída a um único par de genes, sendo a cor roxa (W₁) dominante e a branca (w₁) recessiva. Esse gene apresenta efeito pleiotrópico, causando a presença ou ausência de pigmentos de antocianina em outras partes da planta como na parede da vagem e no hipocótilo. Portanto, plantas com flores roxas

¹ Citados por Destro et al., 1990

apresentam hipocótilo de cor roxa e plantas com flores brancas, hipocótilo de cor verde (Johnson e Bernard, 1963)¹. A cor da flor é uma característica muito utilizada para se fazer a diferenciação de cultivares de soja, e na determinação do nível de mistura com outras cultivares, quando se faz a vistoria, na época da floração, num campo de produção de sementes.

A cor da pubescência é controlada por um único gene, sendo a cor marrom (T) dominante sobre a cor cinza (t) (Woodworth, 1921)¹.

A cor da vagem é verde até o estágio R7 (maturidade fisiológica) e depois desse estágio a vagem começa a apresentar a coloração da cultivar, que pode ser preta, marrom ou amarelo-palha. Dois genes, L1 e L2, controlam a cor da vagem, L₁ codificando o aparecimento da vagem de cor preta, l₁ com L₂, marrom; e l₁ com l₂, amarelo palha (Bernard, 1967)¹. A cor da pubescência da vagem influencia sua aparência geral, mas a cor real da vagem não é muito afetada. A cor da vagem, na maturação, é uma característica eficiente para a diferenciação de cultivares, desde que as observações sejam feitas em vagens maduras.

A soja tem uma grande variedade de cores e de formatos das sementes. As cores comuns são amarela, verde, preta e várias tonalidades de marrom. As diferenças entre a maioria das cultivares nas cores preta e marrom são explicadas em termos de dois genes Tt e Rr, com modificações de certas combinações de genes Oo e W₁w₁. As diferenças na distribuição de pigmentos na semente são controladas pela série alélica l, iⁱ, i^k, i, com dominância na ordem citada (Destro et al., 1990).

A cor do hilo é controlada por um sistema genético constituído pelos genes I, r e O que codificam a distribuição de pigmentos e a cor do tegumento da semente, e também pelos genes T e W1 que codificam os caracteres cor da pubescência e cor da flor, respectivamente (Destro et al., 1990).

Os descritores morfológicos, muitos possuindo seu controle genético conhecido, são marcadores tradicionalmente utilizados na caracterização de cultivares. Perry e McIntosh (1991) utilizaram descritores morfológicos para descrever 2.250 acessos de *G.max* coletados em 78 países. Foram avaliados 17 descritores nos estádios de planta e semente, sendo eles: tipo e hábito de crescimento; número, tamanho e forma dos folíolos; presença, densidade, cor e tipo da pubescência; grupo de maturação; cor da flor; cor da vagem, do tegumento e do hilo. Os acessos foram separados em quatro grandes grupos: 1) contendo acessos da Índia e África; 2) contendo acessos da China, Europa, América e sudeste da Ásia; 3) contendo acessos da Coreia e Japão e 4) contendo acessos da Ásia Central. Foi observada uma grande variabilidade de algumas características morfológicas dentro de cada região. Características como número e forma dos folíolos e presença de pubescência não foram úteis na separação dos acessos, se mostrando invariáveis.

Camps et al. (1994) utilizaram descritores morfológicos e bioquímicos para caracterizar 20 cultivares de soja provenientes do Uruguai e Rio Grande do Sul e semeadas em duas épocas. Os descritores morfológicos avaliados foram presença de antocianina no hipocótilo, forma da semente, cor do hilo, brilho do tegumento e reação à peroxidase. Os sistemas enzimáticos esterase e leucina aminopeptidase e proteínas totais foram utilizados como marcadores bioquímicos. Em relação aos descritores morfológicos, a cor do hilo e o brilho do tegumento variaram em função das diferentes épocas de semeadura, não sendo eficientes para a separação das cultivares. O teste de peroxidase foi capaz de separar as cultivares estudadas em três grupos, o primeiro possuindo 13 cultivares com reação positiva, o segundo possuindo duas cultivares com reação positiva/negativa e o terceiro possuindo cinco cultivares com reação negativa. As características cor do hilo, antocianina no hipocótilo e reação à peroxidase, juntamente com os padrões eletroforéticos de enzimas e proteínas, possibilitaram

a separação das 20 cultivares em 13 grupos, sendo que 10 cultivares puderam ser separadas inequivocamente. De forma semelhante, Wagner e McDonald Junior (1981) e Cardy e Beverdorf (1984), puderam separar um maior número de cultivares de soja utilizando descritores morfológicos juntamente com marcadores bioquímicos de enzimas e proteínas.

Apesar de recomendado, o emprego de descritores morfológicos na caracterização de cultivares apresenta algumas limitações como sofrerem o efeito do ambiente, não sendo estáveis, além de muitos serem avaliados já na fase adulta das plantas, o que requer tempo e espaço físico para as avaliações (Vieira, 2000). Além disso, no caso da caracterização de cultivares de base genética estreita, como a soja, a utilização de tais descritores não é muito eficiente, uma vez que as cultivares se apresentam morfológicamente semelhantes.

Sendo assim, é necessário obter marcadores mais estáveis, os quais, juntamente com os descritores morfológicos, sejam eficientes na caracterização de cultivares de soja.

2.4 Marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas

A eletroforese de proteínas e enzimas é uma técnica importante para a distinção e caracterização de cultivares. Sua aplicação para esses fins tem sido indicada pelas regras da ISTA (ISTA, 1996), UPOV (UPOV, 1998) e também como avaliações adicionais para fins especiais, segundo a LPC (Brasil, 1997).

Muitas empresas produtoras de sementes na Europa e América do Norte já têm utilizado a técnica de eletroforese de proteínas e enzimas nos testes de qualidade genética (Carvalho et al., 2000 e Cooke, 1998).

Apesar das grandes vantagens oferecidas pela eletroforese de proteínas e enzimas, como a obtenção de resultados num prazo de 24-48 horas, um custo relativamente baixo e a simplicidade de operação (Cooke, 1998), a referida técnica é utilizada em poucos laboratórios de análise de sementes no Brasil, provavelmente em razão da falta de metodologias padronizadas e pessoal treinado.

Proteínas de armazenamento, como as vicilinas e lectinas em *Phaseolus*, legumininas em *Pisum*, secalinas em centeio, gluteninas em trigo, aveninas em aveia, zeínas em milho e glicina em soja, têm sido recomendadas para a caracterização de cultivares (ISTA, 1996; AOSA, 1991; Kigel e Galili, 1995).

As proteínas de armazenamento, por serem um produto da expressão direta de genes e possibilitar uma expressão independentemente da influência do ambiente, são consideradas marcadores estáveis, atendendo ao critério de estabilidade requerido para os descritores mínimos previstos na LPC. Imolesi et al. (2001) observaram que os padrões eletroforéticos de zeínas e proteínas totais em milho não foram afetados por diferentes doses de adubação nitrogenada, sendo então sugeridos como marcadores estáveis para a caracterização de cultivares de milho. No entanto, os padrões eletroforéticos de zeínas não possibilitaram a distinção das linhagens de milho.

Vieira (2000) avaliou a variabilidade genética entre as cultivares de feijão Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola, IAPAR 57 e IAPAR 81, todas pertencentes ao grupo Carioca, por meio da eletroforese de proteínas pelo método SDS-PAGE e isofocalização. Como resultado, foi detectado baixo nível de polimorfismo pelo método SDS-PAGE, sendo possível somente a distinção das cultivares Aporé e Pérola das demais. Por outro lado, elevado nível de polimorfismo pode ser detectado pela técnica de isofocalização, sendo as cultivares separadas em quatro grupos: 1) Carioca e Carioca MG; 2) Aporé e Pérola; 3) IAPAR 57; 4) IAPAR 81.

Larsen (1967), citado por Tanksley e Orton (1983), foi o primeiro a utilizar a eletroforese de proteínas na caracterização de cultivares de soja. O autor separou 61 cultivares de soja oriundas de diferentes locais dos Estados Unidos e Canadá, e pertencentes também a diferentes safras e lotes, em dois grupos: 1) contendo 13 cultivares, as quais apresentaram uma banda A, e 2) contendo 48 cultivares, as quais apresentaram uma banda B. Foi observado que as cultivares com sementes apresentando hilo preto ou preto-imperfeito continham a banda B, enquanto que as cultivares com sementes apresentando hilo amarelo, continham a banda A. Ainda segundo Larsen (1967), maiores estudos sobre a associação tipo de proteína e cor de hilo seriam necessários. Os padrões eletroforéticos de proteínas não variaram em função do local, safra, lote e condições da corrida eletroforética, podendo então ser as proteínas recomendadas como marcadores estáveis para a caracterização de cultivares de soja.

Na tentativa de adequar uma metodologia para a caracterização dos componentes protéicos em soja, Savoy (1977) utilizou 21 cultivares de soja e o método eletroforético SDS-PAGE, sendo obtido um mesmo padrão eletroforético para todas as cultivares.

Pinto et al. (1995) utilizaram a eletroforese de proteínas na caracterização de 41 cultivares de soja e relataram a existência de um padrão eletroforético comum entre as cultivares, sendo observadas poucas diferenças, as quais possibilitaram a separação de algumas cultivares. Agüero (2002), avaliando os padrões eletroforéticos de 22 cultivares de soja, sendo duas delas pertencentes ao germoplasma do Paraguai e as demais cultivares brasileiras, obteve resultados semelhantes, ou seja, um único padrão protéico para todas as cultivares.

Proteínas resistentes ao calor, também conhecidas por LEA proteínas (Late Embryogenesis Accumulated), têm sido sugeridas como marcadores

bioquímicos estáveis para a caracterização de cultivares (Mann, 2002). Tais proteínas são sintetizadas na fase final do desenvolvimento das sementes, estando relacionadas com a perda de água e com a dessecação de sementes (Blackman et al., 1991, citados por Roveri José et al., 2003).

Pelas suas propriedades físicas, abundância e natureza conservada, essas proteínas são muito estáveis, podendo ser eficientes marcadores.

Mann (2002), estudando a diversidade genética entre cultivares semelhantes de algodão por meio de proteínas resistentes ao calor, obteve a separação das cultivares em três grupos.

Roveri José et al. (2003) avaliaram a utilização das proteínas resistentes ao calor na caracterização de dez linhagens de milho, bem como sua estabilidade e polimorfismo. Os autores relataram a não variação dos padrões eletroforéticos mesmo havendo extremos de qualidade fisiológica, sugerindo tais proteínas como marcadores estáveis para a caracterização de cultivares. Além disso, um elevado polimorfismo foi observado entre as linhagens, sendo que as mais semelhantes puderam ainda ser distinguidas por duas bandas.

No entanto, não existem na literatura informações sobre o polimorfismo das proteínas resistentes ao calor para fins de caracterização de cultivares de soja.

Marcadores enzimáticos também têm sido utilizados na caracterização de cultivares de várias espécies, como arroz (Bonow et al., 2001), feijão (Vieira, 2000), milho (Salgado, 2001) e soja (Aguero, 2002; Blogge e Inrrie, 1986; Rinto et al., 1995). Além disso, as regras da AOSA (Association of Official Seed Analysts, 1991) e UPOV (UPOV, 1998) recomendam marcadores enzimáticos para a caracterização de cultivares (ISTA, 1996).

As enzimas possuem múltiplas formas moleculares chamadas de isoenzimas, as quais desempenham uma mesma função catalítica. O número de isoenzimas de uma determinada enzima está relacionado com o número de

compartimentos subcelulares onde a mesma reação catalítica é realizada (Tanksley e Orton, 1983).

A aplicação de marcadores isoenzimáticos se baseia no uso de eletroforese e na posterior visualização do produto isoenzimático por métodos histoquímicos.

Os marcadores isoenzimáticos apresentam uma série de vantagens, as quais favorecem sua utilização em testes de caracterização de cultivares. O controle genético para a maioria das isoenzimas já é conhecido e, no caso da soja, mais de 40 locos codificando variantes de enzimas e proteínas já foram descritos (Griffin e Palmer, 1995), o que permite que inferências genéticas possam ser feitas diretamente a partir dos padrões de bandas observados. As variações isoenzimáticas são detectadas por eletroforese, a qual é uma técnica relativamente barata e acessível. Os marcadores isoenzimáticos são de caráter co-dominante, possibilitando a separação de genótipos homozigotos e heterozigotos, o que é de grande utilidade nos testes de certificação da pureza genética (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Alfenas et al., 1998).

Agüero (2002) avaliou os padrões eletroforéticos de 22 cultivares de soja por meio dos sistemas enzimáticos esterase (EST), fosfatase alcalina (ACP), álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), obtendo a separação das cultivares em quatro grupos: 1) constituído pelas cultivares BR-4, BR-16 e BR-36, EMBRAPA 4, EMBRAPA 48, FT-Estrela, FT-Abyara, FT-Jatobá, Ocepar 13 e Ocepar 14; 2) constituído pelas cultivares Ocepar-4, CD-201, CD-208, CD-209, CD-204, CD-207, CD-205 e CD-206; 3) constituído pelas cultivares CD-202 e CD-203, e 4) constituído pelas cultivares Aurora e Uniala, sendo essas últimas parte do germoplasma de soja do Paraguai. Dos cinco sistemas enzimáticos utilizados, apenas esterase e álcool desidrogenase foram polimórficos. Apesar da não

separação de todas as cultivares, o autor sugere a utilização de marcadores isoenzimáticos para auxiliar a caracterização de cultivares de soja.

Anti (2000), utilizou os sistemas enzimáticos fosfatase ácida (ACP), malato desidrogenase (MDH), peroxidase (PO), esterase (EST), leucina aminopeptidase (LAP), urease (EU) e fosfatase alcalina (ALP) para separar as cultivares de soja IAC 6 e IAC 9. Não foi detectada atividade para as enzimas fosfatase alcalina, enquanto as enzimas peroxidase e esterase não apresentaram polimorfismo. Os sistemas enzimáticos urease, malato desidrogenase, fosfatase alcalina e leucina aminopeptidase foram polimórficos e possibilitaram a separação das cultivares IAC 6 e IAC 9.

Com o objetivo de avaliar a diversidade genética de acessos de *G.max* (L) Merrill., coletados em 15 diferentes regiões dos continentes africano, asiático, europeu e americano, Perry et al. (1991) utilizaram os sistemas enzimáticos leucina amino peptidase (LAP), superóxido dismutase (SOD), fosfoglucoisomerase (PGM) e 6-fosfogluconato desidrogenase (PGD), sendo todos eles polimórficos e o alelo Sod2-a o mais discriminativo. Os acessos foram separados em seis grupos de acordo com a região de coleta. O agrupamento contendo acessos coletados na África mostrou-se mais distante geneticamente em relação aos demais, seguido do agrupamento contendo acessos coletados no sudoeste da Ásia, Índia e América. Acessos coletados na Coreia, Japão, China e Europa foram colocados no mesmo grupo. Os acessos de soja utilizados nesse estudo foram previamente avaliados quanto aos descritores morfológicos e os agrupamentos obtidos com esses marcadores não coincidiram com aquele obtido por meio dos marcadores isoenzimáticos. Somente alguns descritores morfológicos, como tamanho das folhas e hábito de crescimento, proporcionaram a separação dos acessos de acordo com os dados obtidos com os sistemas enzimáticos. A classificação quanto ao grupo de maturidade não mostrou uma boa correlação com os dados enzimáticos. Segundo os autores, a

divergência entre os agrupamentos gerados por descritores morfológicos e enzimáticos pode ser devido ao baixo número de locos enzimáticos analisados ou à falta de associação entre esses dois marcadores. Vieira (2000) também não obteve uma boa correlação entre descritores morfológicos e isoenzimáticos na caracterização de cultivares de feijão do grupo Carioca. A referida autora obteve diferentes padrões eletroforéticos para as enzimas álcool desidrogenase, diaforase e esterase, o que possibilitou a separação das cultivares de feijão, e sugere a utilização de tais marcadores para a certificação da pureza genética e caracterização de cultivares de feijão.

Estudos avaliando as relações genéticas entre *G.max* e seu ancestral selvagem, *G.soja*, também têm sido realizados. Griffin e Palmer (1995) utilizaram 13 locos izoenzimáticos na avaliação da relação genética entre acessos domesticados de *G. max* e acessos selvagens de *G.soja*. Os sistemas enzimáticos aconitase (ACO), β -amilase, diaforase DIA, endopeptidase (END), isocitrato desidrogenase (IDH), enzima málica (ME) e superóxido dismutase (SOD) foram polimórficos, sendo o alelo ACO4-c e os locos Dia1 e dia1 os mais freqüentes em todos os acessos. Os autores encontraram combinações alélicas específicas para cada uma das espécies, apesar do grande número de alelos em comum e relataram, ainda, uma menor variabilidade genética em *G.max* como resultado dos processos de domesticação.

Yu e Kiang (1993) estudando a variabilidade genética entre seis populações naturais de *G.soja* provenientes do sul da Coréia por meio dos sistemas enzimáticos aconitase, álcool desidrogenase, β -amilase, fosfatase ácida, diaforase, endopeptidase, esterase, urease, glutamato oxaloacetato transaminase, isocitrato desidrogenase, leucina aminopeptidase, manose 6-fosfato isomerase, 6-fosfato desidrogenase, fosfoglucose isomerase, fosfoglucomutase e xiquimato desidrogenase, relataram uma grande variabilidade genética existente nesta espécie.

Para a utilização de enzimas como marcadores, deve-se levar em consideração as variações na intensidade das bandas e no padrão eletroforético em decorrência da extração a partir de tecidos em diferentes estádios de desenvolvimento. Entretanto, Blogg e Imrie (1982), avaliando a variabilidade genética entre sete cultivares de soja, não observaram diferenças na atividade e nos padrões eletroforéticos entre sementes secas e cotilédones para os sistemas enzimáticos fosfatase ácida, malato desidrogenase, álcool desidrogenase, peroxidase, glutamato oxaloacetato transaminas, fosfoglucose isomerase e fosfatase alcalina, ocorrendo diferenças apenas para o sistema enzimático esterase. Os padrões eletroforéticos obtidos de plântulas e extrato de folhas trifoliadas foram semelhantes, exceto para as fosfatases que não geraram padrões definidos.

A presença de microrganismos nas sementes e o nível de qualidade fisiológica das mesmas também podem alterar os padrões eletroforéticos de isoenzimas. De acordo com Silva (1997), os padrões eletroforéticos das enzimas álcool desidrogenase, malato desidrogenase, peroxidase, esterase e glutamato oxaloacetato transaminase de sementes de milho, apresentaram-se bastante alterados, principalmente em função da presença de microrganismos, devendo ser utilizados com restrições nos testes de caracterização de cultivares e certificação da pureza genética, apesar de possibilitarem maior rapidez na obtenção dos resultados. Ainda segundo o mesmo autor, os padrões eletroforéticos dos coleótilos foram menos alterados pela presença de microrganismos.

Determinadas enzimas em algodão, como fosfatase ácida, catecol oxidase, hexoquinase, enzima málica e esterase, tiveram seus zimogramas alterados em função da associação fungo/semente, devendo ser evitadas em programas de caracterização de cultivares (Vieira, 1996). Segundo a mesma autora, as enzimas glutamato desidrogenase e glutamato oxaloacetato

transaminase mantiveram seus padrões inalterados, podendo ser recomendadas para a caracterização de cultivares de algodão.

Apesar destas limitações, as isoenzimas têm se apresentado como valiosos marcadores na caracterização de cultivares em programas de certificação e teste de pureza genética em lotes de sementes (Kiang e Gorman, 1983).

Dessa forma, sendo os marcadores protéicos e isoenzimáticos uma expressão direta dos genes, e conseqüentemente, mais estáveis, e devido ao grande número de cultivares de soja existentes no mercado e sua base genética estreita, torna-se necessário caracterizar do maior número possível de cultivares de soja quanto aos seus padrões protéicos e enzimáticos para que esses possam ser utilizados como marcadores para fins de caracterização de cultivares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na área experimental e no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada no município de Lavras, estado de Minas Gerais, situado a 920m de altitude, a 21°14' de latitude sul e 45°00' de latitude oeste. O clima da região é do tipo temperado propriamente dito, ou seja, mesotérmico de inverno seco (Cwb). Apresenta uma temperatura média anual de 19,3°C e precipitação média anual de 1.411mm (Brasil, 1969).

Foram utilizadas dez cultivares de soja, sendo elas Conquista, BRIAC 21, Liderança, Confiança, Splendor, UFV 16, Garantia, FT 2000, Monarca e Vencedora. As cultivares Liderança, Confiança, Garantia e Monarca são protegidas pelo SNPC. A genealogia de cada cultivar está apresentada no Quadro 1.

QUADRO 1. Genealogia das dez cultivares de soja. UFLA, Lavras – MG, 2000.

| NÚMERO | CULTIVAR | GENEALOGIA |
|--------|-----------|--|
| 1 | Conquista | Lo76-4484 / Numbaíra ^a |
| 2 | BRIAC-21 | RC IAC 8 / (IAC 8 ^b / FT Cristalina ^c) |
| 3 | Liderança | Centenial / [(Paraná ^d / Bossier ^e) / Davis ^f] |
| 4 | Confiança | Paraná / BR83-147 |
| 5 | Splendor | IAC / FT 2 ^g |
| 6 | UFV-16 | FT 12 / IAC 8 |
| 7 | Garantia | Braxton / (Cariri / FT Cristalina) |
| 8 | FT-2000 | — |
| 9 | Monarca | Seleção de CAC 1 ^h |
| 10 | Vencedora | Braxton / [FT 5 ⁱ / (Dourados ^j / Ocepar 9-SSI ^k)] |

Fonte: Priolli et al. (2002), Abdelnoor et al. (1995)

^a: progênie F6 selecionada a partir de Davis / IAC 71-113;

^b: Bragg / (Hill / PI240664); Bragg: Jackson / D49-2491, D49-2491: irmã de Lee.

^c: cruzamento natural em UFV 1.

^d: Hill / F1 (Roanoke / Ogden).

^e: mutação natural de Lee.

^f: Roanoke / [(Ogden / CNS) / (Ralsoy / Ogden)].

^g: seleção em IAC 5.

IAC 5: Hill / Hood.

^h: seleção em IAC 8.

ⁱ: FT 9510 / Sant'Ana.

^j: seleção em Andrews.

^k: mutação natural em Paraná.

As sementes genéticas foram multiplicadas na área experimental da Universidade Federal de Lavras, o que permitiu serem produzidas sob as mesmas condições climáticas, visando eliminar a interferência do fator ambiente e, conseqüentemente a obtenção de sementes com qualidade fisiológica semelhante.

A colheita manual das plantas foi realizada no estágio de desenvolvimento R9. As plantas foram transferidas para um galpão, a fim de complementar a secagem, sendo a trilha realizada manualmente quando as sementes apresentavam 13% de teor de água.

Foi realizado o teste de germinação para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes das diferentes cultivares, assim como a avaliação dos caracteres morfológicos, dos padrões protéicos e enzimáticos.

3.1 Avaliação dos descritores morfológicos

As avaliações foram realizadas em casa de vegetação em dois períodos, similares de cultivo, nos anos de 2001/2002 e 2002/2003, como recomendado pela LPC (Brasil, 1997).

Nove plantas de cada cultivar foram utilizadas para a avaliação dos descritores morfológicos. Para tanto, foram semeadas três sementes de cada cultivar por vaso de plástico contendo 9kg da mistura terra e areia na proporção de 2:1, os quais foram colocados em casa de vegetação e irrigados sempre que necessário.

No momento da semeadura foi realizada a adubação em solução com macro e micronutrientes. Foram utilizados 35g de nitrato de potássio como fonte de potássio e nitrogênio, 27,71g de sulfato de magnésio como fonte de magnésio; 0,53g de sulfato de cobre, 0,26g de ácido bórico, 0,17g de molibdato

de amônio, 1,98g de sulfato de zinco e 1,16g de sulfato de manganês como fontes de micronutrientes. Como fonte de fósforo, foram utilizados 20,65g de super simples por vaso.

A adubação foi realizada antes da semeadura, quando foram colocados 20ml da solução de macronutrientes e 20ml de micronutrientes juntamente com 6g de super simples em cada vaso.

As características morfológicas recomendadas para soja pela LPC (Brasil, 1997) e pela UPOV (UPOV, 1998), foram utilizadas como descritores morfológicos.

De acordo com a LPC, as seguintes características foram avaliadas:

Plântula – (avaliação realizada durante a fase de emergência, com os cotilédones abertos, correspondendo ao estágio de desenvolvimento vegetativo VC):

- pigmentação de antocianina no hipocótilo (presente = Pr.).

Planta – (avaliações realizadas no início de formação das vagens e quando essas já se mostravam maduras, correspondendo aos estádios reprodutivos R3 e R8, respectivamente):

- tipo de crescimento (determinado = D, semi-determinado = SD ou indeterminado = I),
- altura da planta (baixa = B = 66cm, média = M = 88cm ou alta = A = 110cm),
- cor da pubescência na haste principal (cinza = C, marrom claro = MC ou marrom médio = MM),

Folha – (avaliações realizadas durante a floração plena, correspondendo ao estágio reprodutivo R2):

- intensidade da cor verde (clara = Cl, média = M ou escura = Es.),

- forma do folíolo lateral (lanceolada estreita = L-E, lanceolada = L, triangular = T, oval-pontiaguda = O-P ou oval-arredondada = O-Ar.),
- rugosidade (ausente ou muito fraca = +Fr., fraca = Fr., média = M, forte = F ou muito forte = +F).

Flor - (avaliação realizada durante a floração plena, correspondendo ao estágio reprodutivo R2):

- cor (branca = B ou roxa = R).

Vagem – (avaliação realizada com 95% das vagens maduras, correspondendo ao estágio reprodutivo R8):

- cor (cinza claro = CC, cinza escuro = CE, marrom claro = MC, marrom médio = MM ou marrom escuro = ME).

Semente – (avaliações realizadas após a colheita):

- tamanho (pequeno = P, médio = M ou grande = G),
- forma (esférica = Ef., esférica-achatada = Ef-Ac, alongada = Al ou alongado-achatada = Al-Ac),
- peso de 100 sementes (baixo = B = 12-14g, médio = M = 14-18g ou alto = 18-20g),
- intensidade do brilho do tegumento (baixa = B, média = M ou alta = A),
- cor do tegumento, excluindo o hilo (amarelo = Am, amarelo-esverdeada = Am-ev., verde = V, marrom claro = MC, marrom médio = MM, marrom escuro = ME ou preto),
- cor do hilo (cinza = C, amarelo = Am, marrom claro = MC, marrom = M, preto imperfeita = pretaI ou preta),
- reação à peroxidase (positiva, negativa ou negativa e positiva).

Ciclo vegetativo, avaliado da emergência à floração (precoce = Pc, médio = M ou tardio = T),

Ciclo total, avaliado da emergência à maturação (precoce = Pc = 139 dias, semi-precoce = SP = 139-178 dias, médio = M, semi-tardio = ST ou tardio = T = 178 dias).

O teste de peroxidase foi realizado de acordo com as prescrições das Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 1992). Foram utilizadas cinco sementes por cultivar, sendo o tegumento retirado com bisturi. Esses foram colocados individualmente em tubos de ensaio, aos quais adicionaram-se dez gotas de solução alcoólica de guaiacol 0,5%. Após dez minutos, adicionou-se uma gota de solução aquosa de água oxigenada 40 volumes na proporção de 1:32 (água oxigenada:água). A avaliação foi realizada após um minuto e constou da observação do aparecimento de cor marrom (reação positiva) ou não (reação negativa).

Além das características acima citadas, a UPOV (UPOV, 1998) também recomenda as seguintes características como descritores morfológicos para a caracterização de cultivares de soja, as quais foram avaliadas:

Plântula – (avaliação realizada durante a fase de emergência a cotilédones abertos, correspondendo ao estágio de desenvolvimento vegetativo VC):

- intensidade da coloração com antocianina no hipocótilo (muito fraca = +Fr., fraca = Fr., média = M, forte = F ou muito forte = +F).

Planta – (avaliação realizada quando a planta apresentar 60% das flores abertas, correspondendo aos estádios reprodutivos R1 e R2):

- porte (ereto = E, ereto para semi-ereto = E-SE, semi-ereto = SE, semi-ereto para horizontal = SE-H ou horizontal = H).

Semente – (avaliação realizada após a colheita):

- cor do funículo (igual ou diferente da cor do tegumento).

No momento da debulha das vagens, verificou-se que as mesmas apresentavam diferenças de cultivar para cultivar em relação à quantidade (A =

alta, M = média, B = baixa) e cor da pubescência (Ct = castanho, C = cinza) e posição (Mg. = marginal, Não mg. = não marginal) e tamanho do dente apical (P = pequeno, M = médio, G = grande). Tais características foram então sugeridas como marcadores, sendo incluídas na lista das características morfológicas avaliadas.

A análise dos descritores morfológicos consistiu na observação visual e quantificação, quando necessário, de cada característica e da posterior comparação dos genótipos.

A similaridade genética entre cada par de genótipos foi calculada considerando-se os 26 descritores morfológicos avaliados equivalentes a 100% de similaridade genética, e o número de descritores morfológicos em comum entre cada par de genótipos equivalente ao valor de similaridade genética a ser encontrado (x). Foi obtida uma matriz de similaridade genética, e, baseado nestes valores, construído um dendrograma no qual os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method), utilizando-se o programa NTSYS versão 2.11 (Rohlf, 1992).

A correlação de Pearson foi calculada utilizando-se o programa GENES (Cruz, 2001), com o objetivo de se verificar quanto a matriz de similaridade genética e o dendrograma obtido se ajustam. Para tanto, a matriz de similaridade genética foi transformada em uma matriz de distâncias genéticas, sendo cada valor subtraído de 1, e então comparada com a matriz das distâncias genéticas medidas no dendrograma.

Para a obtenção da linha de corte no dendrograma, o erro (sgs) associado a cada similaridade genética foi calculado pela fórmula:

$$S_{gs} = [g_{s_{ij}} * (1 - g_{s_{ij}}) / (n - 1)] * 0,5, \text{ onde:}$$

- sgs = erro
- $g_{s_{ij}}$ = similaridade genética
- n = número total de bandas polimórficas obtidas

Após, o valor da linha de corte (gsn) foi calculado aplicando-se o erro médio na seguinte fórmula (Hagiwara et al., 2001):

$$\text{gsn} = 1 - (t_{x\%} * \text{erro médio}), \text{ onde:}$$

- gsn = valor da linha de corte
- $t_{x\%}$ = valor de t com n-2 graus de liberdade

3.2 Extração de proteínas e eletroforese

Para a análise eletroforética de proteínas totais pelo método SDS-PAGE, foram seguidos os protocolos utilizados por Vieira (2000).

A representatividade de cada cultivar foi garantida pela utilização de uma única amostra com mais de 50 sementes por genótipo, sendo esse número o recomendado por Konarev (1988), para assegurar a autenticidade e a pureza de cultivares que apresentam autopolinização.

Foram utilizados dois tampões de extração, NaCl 0,5M e tampão borato 0,02M pH 9,0 juntamente com tampão desnaturante (0,02M de Tris HCl pH8,6; 1% de SDS; 0,3% de β -mercaptoetanol; 8,3% de glicerol), na quantidade de 1000 μ l por 100mg de sementes de cada cultivar, moídas em moinho refrigerado (Vieira, 2000).

Após a adição do tampão NaCl 0,5M, as amostras permaneceram em agitação por 30 minutos e foram centrifugadas a 16.000xg, por três minutos.

As amostras extraídas com tampão borato foram agitadas por 10 minutos e centrifugadas a 16.000xg, por três minutos. O sobrenadante de cada amostra foi retirado; 750 μ L de tampão desnaturante foram adicionados e as amostras foram aquecidas a 90°C por, dois minutos.

O preparo das amostras para aplicação no gel consistiu na adição de 40 μ L de tampão da amostra em 10 μ L do extrato protéico. Os tampões da amostra utilizados foram 5mL de glicerol; 0,6173M de Tris-HCl pH 6,8; 2,5mg

de azul de bromofenol para os extratos extraídos com tampão NaCl 0,5M, e 5mL de glicerol, 0,5M de Tris-HCl 0,4% de SDS pH 8; 0,5mL de β -mercaptoetanol e 2,5mg de azul de bromofenol para os extratos extraídos com tampão borato mais tampão desnaturante.

Foram aplicados 40 μ L de cada amostra e 10 μ L de padrão de peso molecular de proteínas variando de 10 a 200 Kda em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador).

O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina 0,4% de SDS pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, à temperatura ambiente e voltagem constante de 150V por quatro horas.

Terminada a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,05% por uma noite e descorados em solução de etanol 5%, ácido acético 10% e água 85%, conforme Alfenas et al. (1998).

Para a extração das proteínas resistentes ao calor, seguiu-se o protocolo utilizado por Roveri José et al. (2003), com algumas modificações. Sementes secas foram embebidas em água por um período de uma hora para facilitar a retirada dos eixos embrionários, os quais foram colocados em microtubos de 2ml. Foram utilizados 11 eixos embrionários para cada cultivar.

Para a extração das proteínas resistentes ao calor, os eixos embrionários foram colocados em cadinhos e macerados com tampão de extração (50mM de Tris HCl pH 7,5; 500mM de NaCl; 5mM de MgCl₂; 1mM de PMSF) na proporção de 1:10 (peso : volume). Após, as amostras foram centrifugadas a 16.000xg, por 30 minutos, a 4°C e os sobrenadantes pipetados em microtubos limpos, os quais foram incubados em banho-maria a 85°C, por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições anteriormente mencionadas, os sobrenadantes pipetados e os pellets descartados. O preparo das amostras para aplicação no gel consistiu na adição de 40 μ L de tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de SDS; 20mg de azul de bromofenol e Tris-

HCl pH 7,5 para completar um volume final de 20mL) em 10 μ L do extrato protéico. Foram aplicados 40 μ L de cada amostra e 10 μ L de padrão de peso molecular de proteínas variando de 10 a 200 Kda em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador).

As condições de corrida e o método de coloração dos géis foram os mesmos utilizados para a eletroforese de proteínas totais, anteriormente descritos.

A avaliação dos géis de proteínas totais e resistentes ao calor constou da observação da presença e ausência de bandas em cada genótipo.

3.3. Extração de enzimas e eletroforese

Foram utilizados 100 mg de sementes secas, de cada cultivar, moídas em moinho refrigerado e obtidas de uma única amostra de mais de 50 sementes por cultivar, de acordo com as recomendações de Konarev (1988). Adicionaram-se 700 μ L do tampão de extração, o qual consistiu de dois tampões: uma parte de tampão 0,2M de borato de lítio (0,2M de hidróxido de lítio pH 8,3, titulado com 0,4M de ácido bórico), nove partes de tampão 0,2M de Tris citrato pH 6,5 (0,2M de Tris-base pH 6,5, titulado com 0,4M de ácido cítrico) e 0,15% de β -mercaptoetanol (Aguero, 2002). Os tubos contendo as amostras de sementes de cada cultivar e tampão de extração foram deixados a 4°C por uma noite e centrifugados a 16.000xg por, 30 minutos, a 4°C. Foram aplicados 60 μ L do sobrenadante de cada amostra em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética realizada a 4°C, por quatro horas, a uma voltagem constante de 150V. Após, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos manose 6-fosfato isomerase (MPI), α e β -amilases, superóxido dismutase

(SOD), álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), lipoxigenase (LOX), uréase (EU), 6-fofogluconato desidrogenase (PGD), isocitrato desidrogenase (IDH), peroxidase (PO), manose 6-fosfato isomerase (MPI), fosfoglucomutase (PGM), fosfatase ácida (ACP) e diaforase (DIA), sendo os sete últimos recomendados pela UPOV (UPOV, 1998) para a caracterização de cultivares de soja.

A avaliação dos géis constou da observação da presença e ausência de bandas em cada genótipo, designadas por 1 e 0, respectivamente. Foi construída uma matriz de 0 e 1 e a estimativa da similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, pela seguinte expressão:

Coeficiente de Jaccard: $S_{gij} = \frac{a}{a + b + c}$, sendo:

a = presença da banda em ambos os genótipos i e j,

b = presença da banda no indivíduo i e ausência no indivíduo j,

c = ausência da banda no indivíduo i e presença no indivíduo j.

Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method), utilizando-se o programa NTSYS versão 2.11 (Rohlf, 1992).

A consistência do dendrograma obtido foi avaliada pelo método de “bootstrap”, utilizando-se, no mínimo, 10.000 bootstraps. Os cálculos de consistência foram realizados pelo programa BOOD versão 3.1 (Coelho, 2001).

A correlação de Pearson bem como o valor da linha de corte para o dendrograma, foram calculados como descrito anteriormente, utilizando-se os dados de similaridade genética gerados pelos marcadores isoenzimáticos.

A codificação dos alelos nos zimogramas foi realizada como recomendado por Hutchinson et al. (1983), citados por Alfenas et al. (1998), os quais utilizam o código 100 para o alelo mais freqüente, e os demais alelos são codificados de acordo com suas distâncias em relação a esse alelo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Descritores morfológicos

Os 26 descritores morfológicos avaliados nos estádios de plântula, planta adulta e sementes, e recomendados na Lei de Proteção de Cultivares e pela UPOV, possibilitaram a distinção de todas as cultivares (Tabela 1).

TABELA 1. Descritores morfológicos avaliados em plântulas, planta e sementes das cultivares de soja Conquista (1), BRIAC 21 (2), Liderança (3), Confiança (4), Splendor (5), UFV 16 (6), Garantia (7), FT 2000 (8), Monarca (9) e Vencedora (10). UFLA, Lavras, MG, 2003.

| Estádio desenvolvimento | Descritor morfológico | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------------------------|--------------------------------------|-----|------|------|------|------|-----|-----|------|------|------|
| Plântula | Antocianina hipocótilo ^a | Pr. | Pr. | Pr. | — | Pr. | — | — | — | Pr. | Pr. |
| | Intensidade antocianina ^b | +F | F | F | — | F | — | — | — | F | F |
| Planta | Crescimento ^c | D | D | D | D | D | D | I | I | D | D |
| | Altura ^d | M | A | A | M | M | B | M | A | A | M |
| | Cor pubescência caule ^e | MR | MR | MR | MR | C | MR | MR | C | C | MR |
| | Porte ^f | SE | SE | SE-E | E | SE-E | SE | SE | E | E | SE |
| | Intensidade verde ^g | M | M | M | M | Es. | M | Cl. | Es. | Es. | M |
| | Forma folíolo lateral ^h | T | T-OP | OP | T-OP | T | T | L-E | T-OP | T-OP | T-OP |
| | Rugosidade ⁱ | Fr | +Fr | M | +F | +Fr | Fr | M | +Fr | M | +Fr |
| | Tamanho folha ^j | M | G | G | P | M | M | P | M | G | M |
| | Cor da flor ^k | R | R | R | B | R | B | B | B | R | R |
| | Ciclo vegetativo ^l | M | M | M | Pc. | M | M | Tr | Pc | M | M |
| | Cor vagem ^m | MM | MM | MM | MM | MC | MM | MM | C | C | ME |
| | Cor pubescência vagem ^x | Ct. | Ct. | Ct. | Ct. | Ct. | Ct. | Ct. | Ct. | C | Ct. |
| Qt. pubescência ^y | A | M | M | M | A | A | M | B | B | B | |

Continua...

...Continuação

| | Posição dente apical ^w | Mg. | Mg. | Não Mg. | Não Mg. | Mg. | Mg. | Não Mg. | Mg. | Mg. | Mg. |
|---------|-----------------------------------|-------|-------|---------|---------|--------|-------|---------|-----|-----|--------|
| | Tamanho dente apical ^z | M | P | P | M | M | G | M | P | M | M |
| | Ciclo total ⁿ | STr | Tr | SPc | Pc | Pc | Pc | Tr | STr | STr | Pc |
| Semente | Forma semente ^o | Ef | Al-Ac | Ef | Ef | Ef-Ac | Al-Ac | Al | Ef | Al | Ef-Ac |
| | Peso 100 sementes ^p | M | M | M | B | B | M | A | A | M | M |
| | Brilho tegumento ^q | B | B | A | B | A | B | B | B | B | M |
| | Cor tegumento ^r | Am | Am | AmE | Am | Am | Am | Am | Am | Am | AmE |
| | Cor hilo ^s | Preto | Preto | Preto | MC | PretoI | Preto | PretoI | MC | MC | PretoI |
| | Cor funículo ^t | ≠ | ≠ | ≠ | = | ≠ | ≠ | = | ≠ | ≠ | ≠ |
| | Reação PO ^u | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - |
| | Tamanho semente ^v | M | G | M | P | M | M | G | M | M | M |

^a: Pr = presente; ^b: +F = muito forte, F = forte; ^c: D = determinado, I = indeterminado; ^{d, j, p, q, v, y, z}: B = baixo, M = médio, A = alto; ^e: MR = marrom, C = cinza; ^f: Se = semi ereto, E = ereto, SE-E = semi ereto a ereto; ^g: Cl = clara, M = média, Es. = escura; ^h: T = triangular, T-OP = triangular a oval pontiaguda, O-P = oval pontiaguda, L-E = lanceolada estreita; ⁱ: +Fr. = muito fraca, Fr. = fraca, M = média, +F = muito forte; ^k: R = roxa, B = branca; ^l: Pc. = precoce, M = médio, Tr. = tardio; ^m: MC = marrom claro, MM = marrom médio, ME = marrom escuro, C = cinza; ⁿ: STr. = semitardio, Tr. = tardio, SPC = semiprecoce, Pc = precoce; ^o: Ef. = esférica, Al-Ac = alongado achatado, Ef-Ac = esférico achatado, Al = alongado; ^r: Am = amarelo, AmE = amarelo escuro; ^s: MC = marrom claro, PretoI = preto imperfeito; ^x: Ct. = castanho, C = cinza; ^w: Marg. = marginal, Não marg. = não marginal.

Alguns descritores morfológicos foram específicos para determinadas cultivares, como intensidade de antocianina muito forte no hipocótilo das plântulas da cultivar Conquista; folíolos laterais oval-pontiagudos e ciclo total semiprecoce para a cultivar Liderança; rugosidade muito forte e sementes de tamanho pequeno para a cultivar Confiança; vagens de coloração marrom claro para a cultivar Splendor; plantas de altura baixa e dente apical grande para a cultivar UFV 16; intensidade clara da cor verde das folhas, folíolos laterais lanceolado-estreitos e ciclo vegetativo tardio para a cultivar Garantia, e brilho do tegumento de intensidade média para a cultivar Vencedora.

Cultivares como IAC 8, FT Cristalina, Paraná e Braxton são parentais de várias das cultivares analisadas no presente trabalho, como BRIAC 21, UFV 16, Garantia, Liderança, Confiança e Vencedora. Sendo assim, essas cultivares apresentaram vários descritores morfológicos em comum. Por exemplo, as cultivares BRIAC 21 e UFV 16, as quais possuem a cultivar IAC 8 como parental, se mostraram morfológicamente semelhantes em 14 dos 26 descritores morfológicos avaliados nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Dentre os descritores morfológicos em comum, pode-se citar crescimento determinado, porte ereto, vagens de cor marrom médio, sementes alongado-achatadas e de tegumento amarelo, entre outros (Tabela 1). As cultivares BRIAC 21 e Garantia apresentaram 10 descritores morfológicos em comum, provavelmente devido à presença da cultivar FT-Cristalina como um dos parentais. As cultivares Liderança e Confiança, Garantia e Vencedora, apesar de possuírem as cultivares Paraná e Braxton como respectivos parentais, apresentaram, respectivamente, somente sete e oito descritores morfológicos em comum. No caso das cultivares Liderança e Confiança, o número relativamente pequeno de descritores morfológicos em comum provavelmente se deve ao fato da cultivar Paraná ser um ancestral indireto da cultivar Liderança, uma vez que

participou do primeiro cruzamento dos três realizados para a obtenção dessa cultivar (Priolli et al., 2002; Abdelnoor et al., 1995).

Em relação às cultivares Garantia e Vencedora, as quais possuem a cultivar Braxton como parental direto, o baixo número de descritores morfológico em comum pode ser explicado pela presença de ancestrais diferentes como FT 5 e Dourados na genealogia da cultivar Vencedora.

Por outro lado, as cultivares Conquista e UFV 16 são as mais semelhantes morfológicamente, compartilhando 19 descritores morfológicos, apesar de não haver parentesco entre elas até onde se conhece sobre suas genealogias (Quadro 1). Provavelmente, a grande semelhança entre estas duas cultivares deve estar relacionada às cultivares Lo 76-4484 e FT 12, as quais são seus parentais e cujos dados genealógicos não são conhecidos.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de similaridade genética entre as dez cultivares de soja, calculados com base nos descritores morfológicos, sendo a similaridade genética média de 0,410.

TABELA 2. Similaridades genéticas entre as dez cultivares de soja, calculadas a partir dos dados obtidos pela avaliação dos descritores morfológicos. UFLA, Lavras, MG, 2003.

| Cultivar | Conquista | BRIAC 21 | Liderança | Confiança | Splendor | UFV 16 | Garantia | FT 2000 | Monarca | Vencedora |
|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|--------|----------|---------|---------|-----------|
| Conquista | 1,000 | | | | | | | | | |
| BRIAC 21 | 0,654 | 1,000 | | | | | | | | |
| Liderança | 0,538 | 0,654 | 1,000 | | | | | | | |
| Confiança | 0,384 | 0,346 | 0,307 | 1,000 | | | | | | |
| Splendor | 0,538 | 0,385 | 0,385 | 0,307 | 1,000 | | | | | |
| UFV 16 | 0,731 | 0,577 | 0,423 | 0,307 | 0,423 | 1,000 | | | | |
| Garantia | 0,346 | 0,385 | 0,269 | 0,462 | 0,192 | 0,307 | 1,000 | | | |
| FT 2000 | 0,307 | 0,307 | 0,192 | 0,346 | 0,307 | 0,269 | 0,192 | 1,000 | | |
| Monarca | 0,500 | 0,538 | 0,462 | 0,269 | 0,462 | 0,346 | 0,231 | 0,577 | 1,000 | |
| Vencedora | 0,615 | 0,577 | 0,500 | 0,307 | 0,577 | 0,500 | 0,269 | 0,269 | 0,500 | 1,000 |

Pelo dendrograma obtido (Figura 1), as cultivares foram separadas em quatro grupos: 1) Conquista, UFV 16, BRIAC 21 e Liderança; 2) Splendor e Vencedora; 3) FT 2000 e Monarca; 4) Confiança e Garantia. No grupo 1 estão contidas as cultivares que apresentaram o maior número de descritores morfológicos em comum, apesar de em alguns casos não haver parentesco entre elas, como mencionado anteriormente. A similaridade genética entre as cultivares do grupo 1 ainda pôde ser confirmada pela linha de corte de 0,65 com $t_{0,1\%}$ segundo a qual os agrupamentos à direita da referida linha são considerados semelhantes. Em relação aos demais agrupamentos obtidos no dendrograma, as cultivares Splendor e Vencedora foram colocadas em um mesmo grupo provavelmente devido a presença da cultivar Hill na genealogia de ambas. Quanto às cultivares FT 2000 e Monarca, Confiança e Garantia, não há relações de parentesco entre elas que justifique tais agrupamentos.

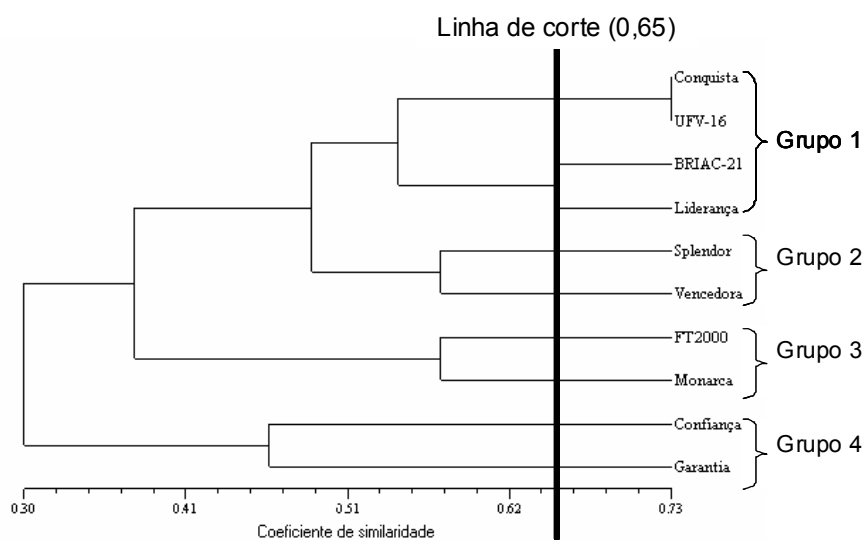


FIGURA 1. Dendrograma de dez cultivares de soja, obtido pela análise de agrupamento UPGMA com base nos dados obtidos pela avaliação dos descritores morfológicos. UFLA, Lavras, MG, 2003.

A correlação de Pearson entre a matriz de similaridade genética e o dendrograma foi de $r = 0,82$, o que indicou que os agrupamentos obtidos no dendrograma estão de acordo com os valores de similaridade genética entre cada para de genótipos.

Mesmo com a avaliação dos descritores morfológicos podendo ser realizada nos mais diferentes estádios de desenvolvimento das plantas de soja, deve-se dar preferência àqueles avaliados nas plântulas e sementes. Dessa forma, os resultados podem ser obtidos mais rapidamente, não sendo necessário esperar por plantas adultas, bem como não haver necessidade de grandes áreas de cultivo para a realização das avaliações.

Os descritores morfológicos avaliados na fase de plântula e os avaliados nas sementes foram eficientes na caracterização das dez cultivares de soja estudadas. Pela avaliação da intensidade de antocianina no hipocótilo das plântulas, brilho do tegumento e tamanho e forma das sementes, as dez cultivares puderam ser separadas em sete grupos: 1) Conquista; 2) Vencedora; 3) Confiança; 4) Liderança e FT 2000; 5) Splendor; 6) Garantia e Monarca; 7) BRIAC 21 e UFV 16. Os descritores que definiram cada grupo foram intensidade muito forte de antocianina no hipocótilo para a cultivar Conquista, brilho do tegumento de intensidade média para a cultivar Vencedora, sementes de tamanho pequeno para a cultivar Confiança, sementes de forma esférica para as cultivares Liderança e FT 2000, esférico-achatada para a cultivar Splendor, alongada para as cultivares Garantia e Monarca e alongado-achatada para as cultivares BRIAC 21 e UFV 16.

Resultados semelhantes foram obtidos por Camps et al. (1994), que obtiveram a separação de 20 cultivares de soja por meio de descritores morfológicos de plântula e sementes, sendo que a presença de antocianina no

hipocótilo possibilitou a separação das cultivares em dois grupos, a cor do hilo em quatro grupos e a reação à peroxidase em três grupos.

Pela Tabela 1 pode-se observar que a maioria das cultivares apresentou plantas com flores roxas, sementes de tamanho médio e tegumento amarelo. Tal resultado está de acordo com o observado por Perry e McIntosh (1991) nos acessos de *G.max* coletados no continente americano, os quais apresentaram esses mesmos descritores morfológicos.

As cultivares Liderança, Confiança, Garantia e Monarca são cultivares protegidas e possuem descritores morfológicos descritos no catálogo de cultivares de soja *G.max* (L.) Merrill, publicado pelo Ministério da Agricultura, (Brasil, 2002). A maioria dos descritores morfológicos observados no presente trabalho para essas cultivares está de acordo com aqueles publicados no referido catálogo. Entretanto, alguns descritores não foram coincidentes, como tipo de crescimento, altura de planta, cor da pubescência da haste principal, ciclo vegetativo e total, cor da vagem, forma da semente, intensidade de brilho e cor do tegumento e hilo. Segundo o catálogo de cultivares de soja protegidas, a cultivar Liderança possui plantas de altura média, ciclo vegetativo precoce, vagens de cor marrom claro, ciclo total médio e sementes com tegumento amarelo; a cultivar Confiança possui plantas altas, ciclo vegetativo médio, vagens de cor marrom claro e sementes com brilho do tegumento de intensidade média; a cultivar Garantia possui crescimento determinado, plantas de altura média a alta, ciclo vegetativo médio, vagens de cor marrom claro, ciclo total de médio a tardio, sementes esféricas e tegumento com brilho de intensidade média e hilo da cor preto-imperfeita; a cultivar Vencedora possui plantas altas, pubescência da haste principal na cor cinza, vagens de cor marrom claro, ciclo total médio, sementes esféricas, tegumento com brilho de intensidade alta e cor amarela e hilo da cor preto-imperfeita. Tal fato mostra que os descritores morfológicos são passíveis de variações, sendo sua avaliação e comparação

difíceis de serem realizadas. Apesar disso, a utilização de descritores morfológicos é de importância reconhecida, uma vez que estes têm sido eficientes na caracterização de cultivares de soja, como também de outras espécies de base genética estreita, como arroz e feijão, entre outras (Perry e McIntosh, 1991; Camps et al., 1994; Vieira, 2000; Bonow et al., 2001).

Ainda na Tabela 1, pode-se observar que todas as cultivares com presença de antocinina no hipocótilo apresentaram flores roxas e aquelas sem antocinina no hipocótilo, flores brancas. Tal fato está de acordo com as informações sobre o controle genético dos caracteres presença de antocianina no hipocótilo e cor da flor relatadas por Destro et al. (1990), segundo os quais essas duas características são codificadas pelo mesmo gene W1, o qual apresenta efeito pleiotrópico.

A época de florescimento e a maturação, ou seja, o ciclo vegetativo e total, possuem o mesmo controle genético, como relatado por Destro et al. (1990). Foi observada uma relação entre esses dois caracteres em cinco das dez cultivares de soja avaliadas. As cultivares Splendor e Garantia apresentaram ciclo vegetativo e total coincidentes, ou seja, a cultivar Splendor se mostrou precoce quanto ao florescimento e maturação, enquanto a cultivar Garantia foi tardia para esses dois caracteres. Os mesmos caracteres para as cultivares Conquista, Liderança e Monarca não coincidiram, mas tenderam a se igualar (Tabela 1). Apesar de recomendados como descritores mínimos para soja, tanto na Lei de Proteção de Cultivares e pela UPOV, ciclos vegetativo e total são caracteres muito influenciados pelo fotoperíodo, o qual varia em função da latitude. Dessa forma, na utilização desses caracteres como descritores deve-se levar em consideração o local de cultivo. Apesar de recomendados como descritores mínimos para soja tanto na Lei de Proteção de Cultivares como pela UPOV, ciclos vegetativo e total são características influenciadas pelo

fotoperíodo, o qual varia em função da latitude. Dessa forma, na utilização desses descritores deve-se levar em consideração o local de cultivo.

Pelos dados da Tabela 1, pode-se observar que as cultivares Conquista, BRIAC 21 e Liderança apresentaram pubescência da cor marrom, flores roxas e hilo preto; a cultivar UFV 16 apresentou pubescência marrom, flores brancas e hilo preto; a cultivar Splendor apresentou pubescência cinza, flores roxas e hilo preto imperfeito e a cultivar Confiança apresentou pubescência marrom, flores brancas e hilo marrom-claro. Tais resultados estão de acordo com as combinações fenotípicas propostas por Destro et al.(1990) para cor do hilo, uma vez que os genes que controlam esse caráter em sementes de soja estão ligados aos que controlam cor da pubescência e da flor. As combinações fenotípicas das outras cultivares em relação a esses três caracteres não coincidiram com as apresentadas por Destro et al. (1990), o que pode ser explicado pelo fato dos genes que controlam esses caracteres ainda estarem ligados a outros genes que controlam a distribuição de pigmentos nas sementes, segundo este mesmo autor.

Dentre os descritores morfológicos sugeridos para serem avaliados nas vagens, somente a cultivar UFV 16 apresentou vagens com dente apical grande, o que possibilitou sua separação das demais.

Os descritores morfológicos foram eficientes na caracterização das dez cultivares de soja estudadas, apesar das cultivares brasileiras de soja apresentarem-se similares. Vale ressaltar que para uma eficiente utilização de tais marcadores em testes de caracterização de cultivares, deve-se considerar o estado nutricional das plantas, o que garantirá a manifestação das características a serem avaliadas, minimizando o efeito do ambiente (Alfenas et al., 1998).

4.2 Marcadores bioquímicos de proteínas

Pela análise eletroforética de proteínas totais, não foi detectado polimorfismo quanto se utilizou o tampão NaCl 0,5M para extração.

Na Figura 2 podem ser visualizados os padrões eletroforéticos de proteínas total extraídas com o tampão borato 0,2M + tampão desnaturante (A) e de proteínas resistentes ao calor (B), os quais se mostraram polimórficos entre as dez cultivares de soja estudadas.

No padrão protéico obtido com o tampão de extração borato 0,02M + tampão desnaturante, foram observadas três bandas polimórficas, sendo uma de peso molecular na faixa de 20Kda presente nas cultivares Conquista, BRIAC 21, Garantia e Monarca, uma segunda de peso molecular semelhante a 30 Kda presente nas cultivares Conquista, BRIAC 21 e Garantia, e uma terceira de peso molecular entre 50 e 60 Kda presente nas cultivares Conquista, BRIAC 21, Liderança, Confiança, Garantia e Monarca (Figura 2). Em função dos três padrões eletroforéticos, as cultivares foram separadas em três grupos: 1) contendo as cultivares Conquista, BRIAC 21 e Garantia; 2) contendo as cultivares Liderança, Confiança e Monarca; 3) contendo as cultivares Splendor, UFV 16, FT 2000 e Vencedora. O agrupamento das cultivares BRIAC 21 e Garantia pode ser explicado pela presença de um progenitor em comum, a cultivar FT Cristalina. Apesar da cultivar Conquista ter apresentado o mesmo padrão protéico das cultivares BRIAC 21 e Garantia, pela genealogia apresentada no Quadro 1, não há progenitores em comum entre essas cultivares. A semelhança dos padrões protéicos entre as cultivares Liderança e Confiança provavelmente se deve ao fato dessas cultivares possuírem a cultivar Paraná como um de seus progenitores. A cultivar Monarca se originou de uma seleção de CAC 1, a qual foi obtida a partir de IAC 8 que, por sua vez, possui a cultivar D49-2491, irmã de Lee, em sua genealogia. Sendo a cultivar Bossier resultado

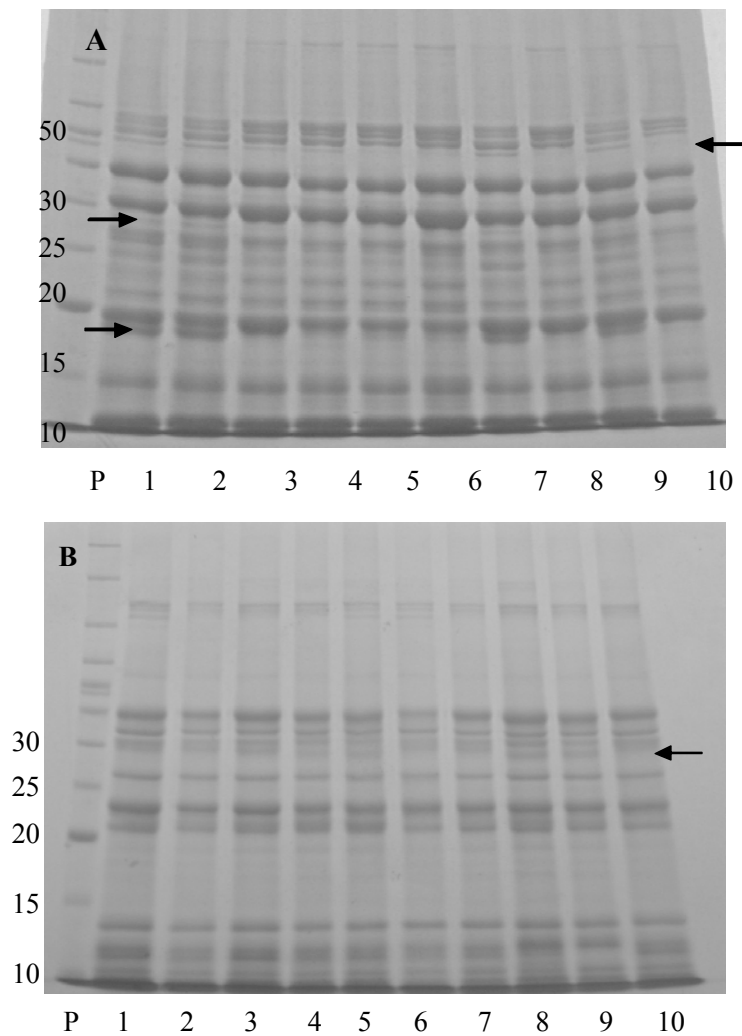


FIGURA 2. Padrões eletroforéticos das proteínas totais extraídas com o tampão borato (A) e proteínas resistentes ao calor (B) de sementes das cultivares de soja Conquista (1), BRIAC 21 (2), Liderança (3), Confiança (4), Splendor (5), UFV 16 (6), Garantia (7), FT 2000 (8), Monarca (9) e Vencedora (10). P: padrão de peso molecular (Kda). UFLA, Lavras, MG, 2003.

de uma mutação natural em Lee e estando presente na genealogia da cultivar Liderança, pode-se explicar o agrupamento das cultivares Monarca com Liderança e Confiança.

O agrupamento das cultivares Splendor, UFV 16, Vencedora e FT 2000 provavelmente está relacionado com a presença da cultivar Hill nas genealogias das três primeiras. As cultivares FT 2 e IAC 8, progenitores das cultivares Splendor e UFV 16, respectivamente, possuem a cultivar Hill em suas genealogias, enquanto a cultivar Vencedora possui Ocepar 9-SS1 como progenitor, sendo essa resultado de uma mutação natural na cultivar Paraná a qual também possui a cultivar Hill em sua genealogia. Apesar dos dados genealógicos da cultivar FT 2000 não serem conhecidos, pelo menos uma das cultivares mencionadas acima deve ser um de seus progenitores, o que explicaria o seu agrupamento com as cultivares Splendor, UFV 16 e Vencedora.

Em relação às proteínas resistentes ao calor, o polimorfismo encontrado foi menor do que o esperado, uma vez que essas se mostraram altamente polimórficas na caracterização de cultivares de algodão e milho (Mann, 2002; Roveri José et al., 2003). Foi observada somente uma banda polimórfica na faixa correspondente ao peso molecular de 30Kda, a qual está presente somente nas cultivares Conquista, Confiança, Splendor, FT 2000 e Monarca. Provavelmente, a existência dessa banda em comum deve estar relacionada à presença de progenitores em comum na genealogia dessas cinco cultivares. As cultivares Conquista e Confiança possuem como progenitores em comum as cultivares Roanoke e Ogden. A cultivar Confiança possui a cultivar Hill em sua genealogia, a qual também é um dos progenitores das cultivares Splendor e Monarca. Apesar da genealogia da cultivar FT 2000 não ser conhecida, provavelmente as cultivares Roanoke, Ogden e/ou Hill devem estar presentes, o que explicaria o mesmo padrão protéico observado nessas cultivares.

Larsen (1967) observou uma associação entre cor de hilo e padrões protéicos em cultivares de soja. Segundo o autor, cultivares possuindo sementes de hilo preto ou preto-imperfeito apresentaram a banda denominada B, enquanto cultivares com sementes de hilo amarelo apresentaram a banda denominada A.

O baixo polimorfismo detectado pelos marcadores bioquímicos de proteínas está de acordo com o observado por Agüero (2002), Pinto et al. (1995), Savoy (1977) e Larsen (1967). Segundo esses autores, a ocorrência de um padrão geral de proteínas entre diferentes cultivares de soja pode ser atribuída à composição semelhante de proteínas presentes na semente. Outro fator que pode estar contribuindo para o baixo polimorfismo protéico encontrado deve ser a presença de um grande número de progenitores em comum, o que torna as cultivares semelhantes entre si.

4.3 Marcadores bioquímicos de enzimas

Dentre os sistemas enzimáticos testados, não foi detectada atividade para as enzimas manose 6-fosfato isomerase (MPI), fosfatase ácida (ACP) e lipoxigenase (LOX). As enzimas 6-fosfogluconato desidrogenase (PGD), urease (EU) e α e β -amilases foram monomórficas.

Apesar das três últimas enzimas não terem sido eficientes na separação das dez cultivares de soja, elas já foram utilizadas com sucesso em outros trabalhos para a caracterização de cultivares de soja. Anti (2000) relata a separação das cultivares IAC 6 e IAC 9 por meio do sistema enzimático urease, enquanto Hymowitz e Kaizuma (1981), citados por Perry et al. (1991), separaram 1.603 acessos de *G.max*, coletados em diferentes regiões da Ásia, em sete grupos, utilizando a enzima β -amilase. Além disso, os autores obtiveram indicações das rotas de disseminação de *G.max* para as demais regiões onde a

soja é hoje cultivada em escala comercial. Segundo Griffin e Palmer (1995), 13 locos isoenzimáticos foram úteis para a caracterização de acessos de *G.max* e de *G.soja* do Banco de Germoplasma dos Estados Unidos, dentre os quais, alelos de β -amilase estavam incluídos.

Foram observadas variações nos padrões eletroforéticos dos sistemas enzimáticos superóxido dismutase (SOD), diaforase (DIA), fosfoglucomutase (PGM), esterase (EST), álcool desidrogenase (ADH), isocitrato desidrogenase (IDH) e peroxidase (PO), sendo considerados polimórficos para as cultivares em estudo (Figuras 2, 3 e 4). As codificações dos alelos de cada sistema enzimático polimórfico estão apresentadas na Tabela 3.

O polimorfismo encontrado para o sistema enzimático superóxido dismutase (SOD) também foi observado por Griffin e Palmer (1995) e Perry et al. (1991). Segundo os últimos autores, esse sistema enzimático é codificado por dois locos (Sod-1 e Sod-2), dois deles possuindo dois alelos (Sod₁ e sod₁, e Sod₂ e sod₂). Essa enzima, no presente trabalho, parece ser codificada por dois locos, cada um deles possuindo um maior número de alelos em relação ao número observado por Perry et al. (1991) (Figura 3). Provavelmente essa diferença de resultados seja devido ao fato de o zimograma da superóxido dismutase ter sido obtido de extratos de sementes secas, enquanto Perry et al. (1991) observaram a variação alélica para superóxido dismutase a partir de extratos de cotilédones de plântulas de dois a quatro dias. Como citado por Alfenas et al. (1998), certas enzimas podem ser controladas por diferentes locos nos vários estádios de desenvolvimento e tecidos, o que deve ser levado em consideração ao se utilizar enzimas como marcadores.

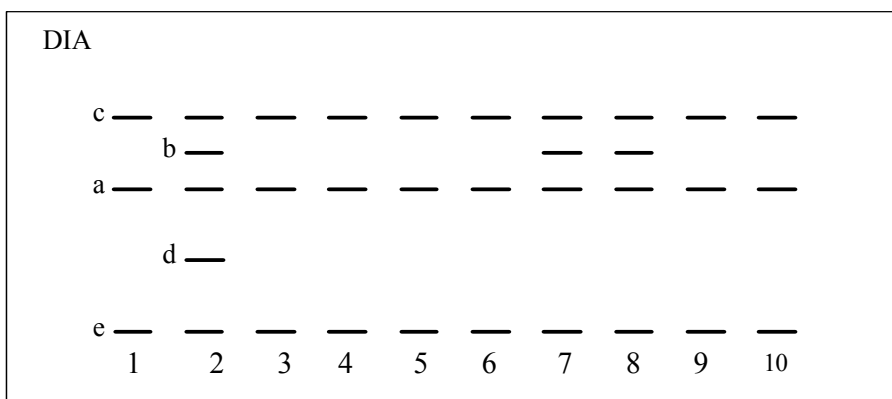
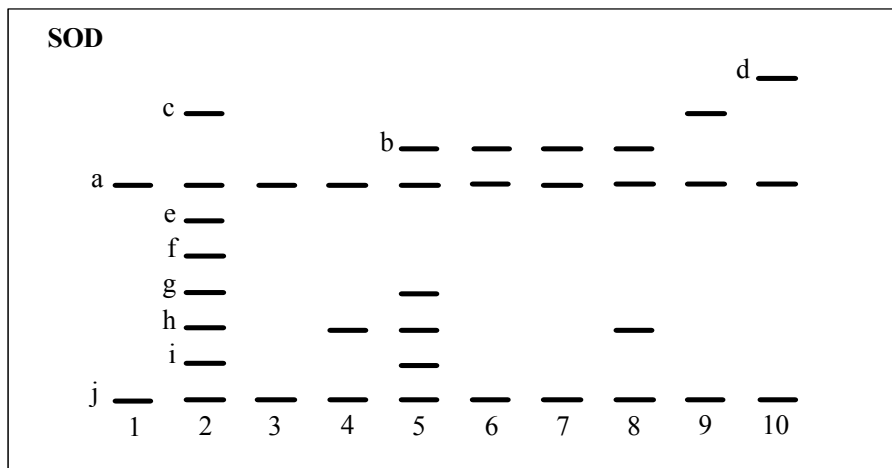


FIGURA 3. Zimogramas das enzimas superóxido dismutase (SOD) e diaforase (DIA) de sementes secas de soja das cultivares Conquista (1), BRIAC 21 (2), Liderança (3), Confiança (4), Splendor (5), UFV 16 (6), Garantia (7), FT 2000 (8), Monarca (9) e Vencedora (10). UFLA, Lavras, MG, 2003.

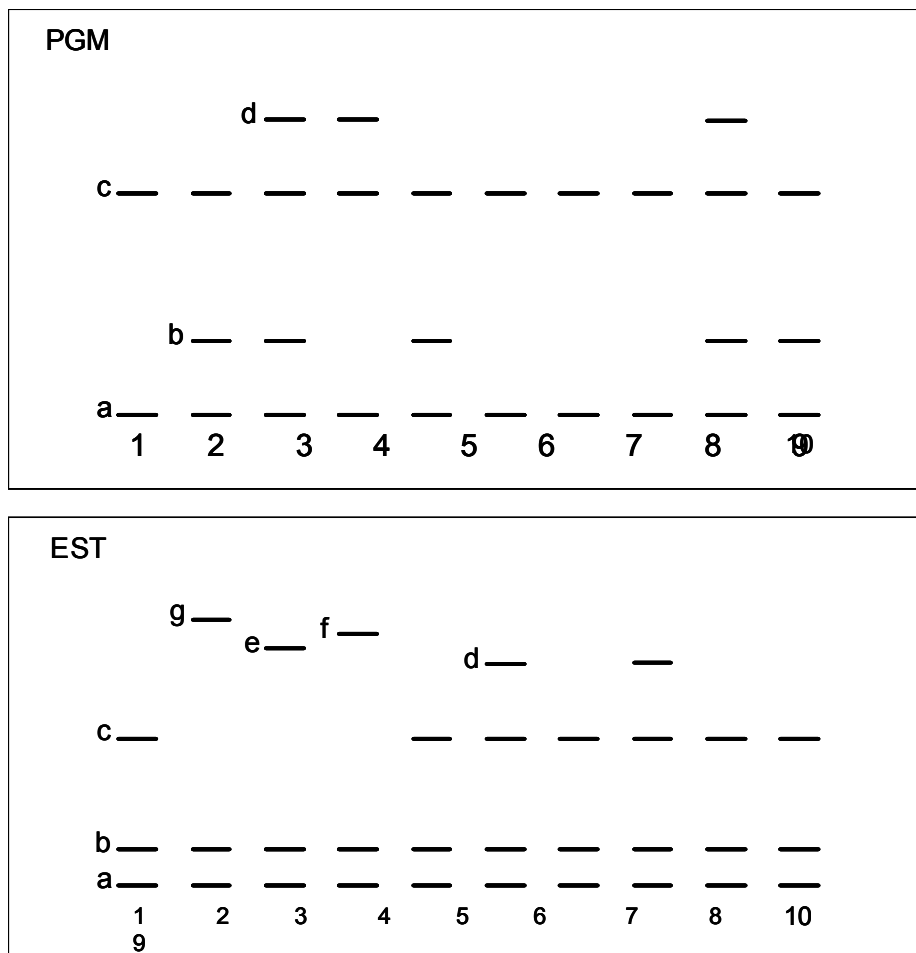


FIGURA 4. Zimogramas das enzimas fosfoglucomutase (PGM) e esterase (EST) de sementes secas de soja das cultivares Conquista (1), BRIAC 21 (2), Liderança (3), Confiança (4), Splendor (5), UFV 16 (6), Garantia (7), FT 2000 (8), Monarca (9) e Vencedora (10). UFLA, Lavras, MG, 2003.

TABELA 3. Codificação dos alelos observados nos zimogramas dos sistemas enzimáticos polimórficos. UFLA, Lavras, MG, 2003.

| Sistema enzimático | Alelo | Codificação (cm) |
|--------------------------------|-----------------|------------------|
| Superóxido dismutase (SOD) | a | 100/100 |
| | b | 100/101 |
| | c | 100/100,5 |
| | d | 100/101,5 |
| | e | 99,5/100 |
| | f | 99/100 |
| | g | 98,5/100 |
| | h | 98/100 |
| | i | 97,5/100 |
| | j | 97/100 |
| | Diaforase (DIA) | a |
| b | | 100/100,5 |
| c | | 100/101 |
| d | | 99/100 |
| e | | 98/100 |
| Fosfoglucomutase (PGM) | a | 100/100 |
| | b | 101/100 |
| | c | 103/100 |
| | d | 104/100 |
| Esterase (EST) | a | 100/100 |
| | b | 100/100,5 |
| | c | 100/102 |
| | d | 100/103 |
| | e | 100/103,2 |
| | f | 100/103,4 |
| | g | 100/103,6 |
| Álcool desidrogenase | a | 100/100 |
| | b | 100/100,5 |
| | c | 99,5/100 |
| | d | 99,3/100 |
| | e | 99/100 |
| | f | 98/100 |
| | g | 97,5/100 |
| Isocitrato desidrogenase (IDH) | a | 100/100 |
| | b | 100/100,3 |
| | c | 100/100,5 |
| | d | 100/101 |
| | e | 100/101,3 |
| | f | 100/101,8 |
| Peroxidase (PO) | a | 100/100 |
| | b | 100/101 |

Oito padrões eletroforéticos diferentes foram obtidos para a superóxido dismutase, sendo as cultivares separadas em oito grupos: 1) Conquista e Liderança; 2) BRIAC 21; 3) Confiança; 4) Splendor; 5) UFV 16 e Garantia; 6) FT 2000; 7) Monarca e 8) Vencedora (Figura 2). Vale ressaltar que foram obtidos padrões eletroforéticos específicos para as cultivares BRIAC 21, Confiança, Splendor, FT 2000, Monarca e Vencedora, o que é de grande interesse para os estudos de caracterização de cultivares. O sistema enzimático SOD foi o mais discriminativo para as dez cultivares de soja estudadas, sendo o loco Sod-2 o mais discriminativo no estudo de caracterização de cultivares de soja realizado por Perry et al. (1991).

Quanto ao sistema enzimático diaforase (DIA), o polimorfismo observado está de acordo com Griffin e Palmer (1995) e também com o polimorfismo observado por Yu e Kiang (1993) em *G. soja*.

Pelo zimograma apresentado na Figura 3, a DIA parece ser uma enzima tetramérica, o que está de acordo com o manual da UPOV (UPOV, 1998) para caracterização de cultivares de soja. Ainda segundo o mesmo manual, essa enzima é codificada por dois locos (Dia3 e Dia4), possuindo alelos nulos. De acordo com Tanksley e Orton (1983), a diaforase é codificada por quatro locos com um número variável de alelos, sendo seu zimograma bastante complexo e de difícil interpretação. Segundo Yu e Kiang (1993), em *G. soja*, a diaforase é codificada por três locos, cada um possuindo de um a três alelos. No presente trabalho, este sistema enzimático permitiu a obtenção de três padrões eletroforéticos diferentes, o que possibilitou a separar as cultivares Conquista, Liderança, Confiança, Splendor, UFV 16, Monarca e Vencedora; BRIAC 21; Garantia e FT 2000. Um padrão eletroforético específico para a cultivar BRIAC 21 foi obtido, permitindo sua separação das demais.

A enzima fosfoglucomutase (PGM) parece ser monomérica, codificada por dois locos, cada um possuindo dois alelos (Figura 4).

Segundo o manual da UPOV (UPOV, 1998), em soja, a fosfoglucomutase é uma enzima monomérica codificada por um loco, e, de acordo com Tanksley e Orton (1983), é codificada por três locos, sendo somente o controle dos dois primeiros locos conhecido, os quais possuem dois alelos cada um.

Quatro padrões eletroforéticos diferentes foram obtidos para a enzima PGM, sendo separadas as cultivares Conquista, UFV 16, Garantia e FT 2000; BRIAC 21, Splendor e Vencedora; Liderança e Monarca, e Confiança, a qual pode ser separada das demais, possuindo um padrão eletroforético próprio.

A enzima esterase parece ser monomérica, codificada por dois locos, cada um possuindo dois alelos (Figura 4). Anti (2000) relata que a referida enzima apresenta cinco locos nos zimogramas de sementes secas de soja, enquanto Yu e Kiang (1983) relataram a mesma enzima sendo codificada por um loco com dois alelos em *G. soja*. Provavelmente, essa divergência de resultados esteja relacionada à falta de conhecimento do controle genético da enzima em questão (Tanksley e Orton, 1983).

Apesar de ser um sistema enzimático altamente polimórfico, a esterase é uma enzima que atua sobre vários substratos, podendo mostrar padrões variados quando diferentes substratos estão presentes na reação de revelação (Hall, 1969, citado por Alfenas et al., 1998). O grande número de bandas gerado pela esterase pode ser resultado da quebra da ligação naftil por qualquer outra enzima, cuja atividade também será detectada. Além disso, a atividade da esterase varia com o estágio de desenvolvimento da planta, com as condições fisiológicas e com o tecido utilizado (Alfenas et al., 1998). Todos esses fatores podem levar a uma interpretação errada dos zimogramas obtidos para esta enzima, podendo o polimorfismo ser superestimado. Sendo assim, apesar deste sistema ser utilizado em muitos trabalhos de caracterização de cultivares de soja, não é recomendado pela UPOV (Genebra, 1998).

Pelo zimograma da enzima esterase, cinco padrões eletroforéticos diferentes foram obtidos para as cultivares Conquista, Splendor, Garantia, Monarca e Vencedora; UFV 16 e FT 2000; BRIAC 21; Liderança e Confiança, tendo as três últimas cultivares apresentado padrões eletroforéticos específicos. Agüero (2002) observou um elevado nível de polimorfismo para a enzima esterase entre 22 cultivares de soja, as quais foram separadas em três grupos. Camps et al. (1994) conseguiram a separação de 20 cultivares de soja em dois grupos, um contendo 12 cultivares e outro contendo oito, utilizando a mesma enzima. Payne e Koszykowski (1978) também obtiveram cinco padrões eletroforéticos diferentes para a enzima esterase entre 44 cultivares de soja. Contudo esse sistema enzimático não se mostrou polimórfico para as cultivares de soja IAC 6 e IAC 9 (Anti, 2000).

A esterase é uma das enzimas que mais apresentam polimorfismo nas diferentes espécies. Vieira (2000), Bonow et al. (2001) e Cardoso e Nedel (2002) conseguiram a separação de cultivares de feijão, arroz e trigo, respectivamente, utilizando a esterase como marcador isoenzimático

Quanto ao sistema enzimático álcool desidrogenase (ADH), o zimograma obtido apresenta sete bandas (Figura 5), o que está de acordo com o observado por Tanksley e Orton (1983), os quais relatam a ocorrência de três tipos de padrões eletroforéticos para essa enzima em *G.max* e *G.soja*, sendo o primeiro constituído por sete bandas. Os mesmos autores ainda relatam que a álcool desidrogenase é codificada por dois locos (Adh1 e Adh4), ambos com um alelo nulo e outro dominante. Por outro lado, Yu e Kiang (1993) relatam que a mesma enzima é codificada por três locos em *G.soja*.

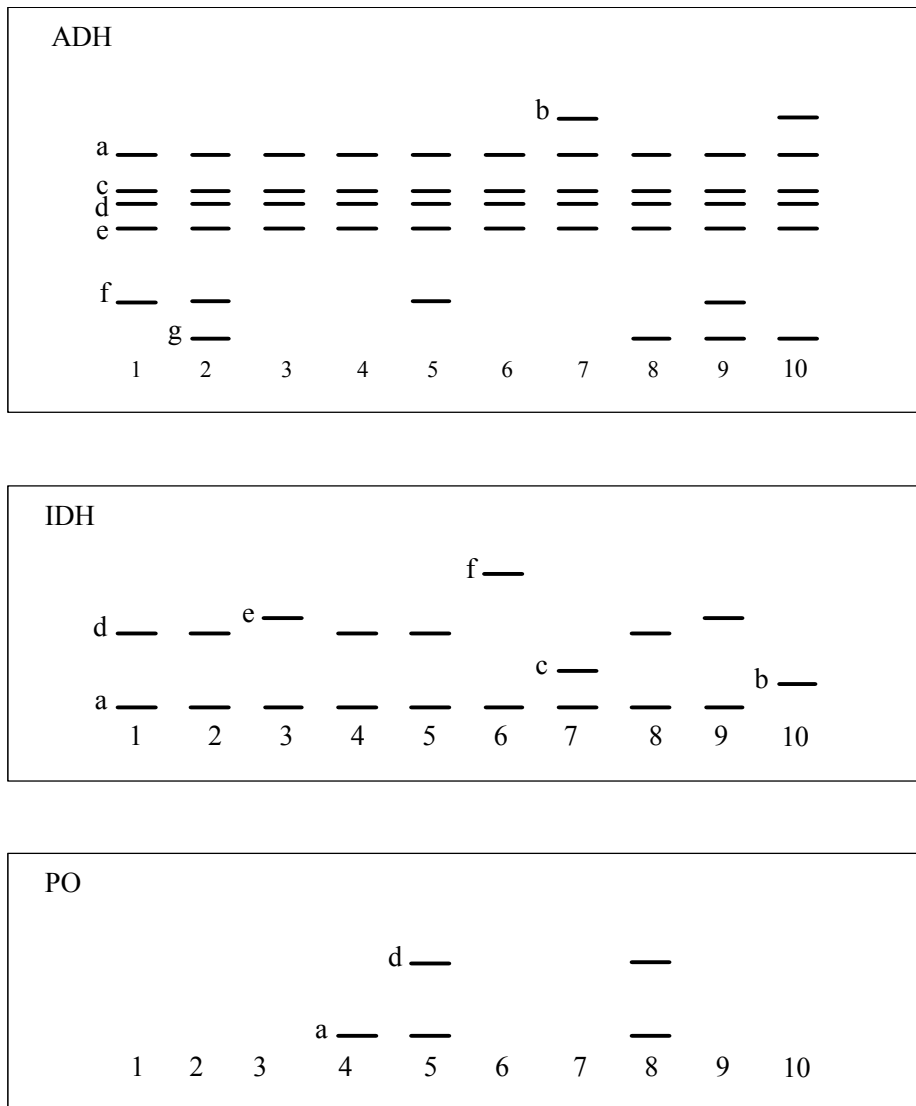


FIGURA 5. Zimogramas das enzimas álcool desidrogenase (ADH), isocitrato desidrogenase (IDH) e peroxidase (PO) de sementes secas de soja das cultivares Conquista (1), BRIAC 21 (2), Liderança (3), Confiança (4), Splendor (5), UFV 16 (6), Garantia (7), FT 2000 (8), Monarca (9) e Vencedora (10). UFLA, Lavras, MG, 2003.

Observa-se, pelo zimograma apresentado na Figura 5, que seis padrões eletroforéticos diferentes foram obtidos, permitindo a separação das seguintes cultivares de soja: Conquista e Splendor; BRIAC 21 e Monarca; Liderança, Confiança e UFV 16; Garantia; FT 2000 e Vencedora. As últimas três apresentaram padrões eletroforéticos próprios, podendo ser separadas das demais cultivares. Para Aguero (2002), a enzima álcool desidrogenase foi a mais discriminativa na caracterização de 22 cultivares de soja, as quais foram separadas em cinco grupos. Nesse estudo, padrões eletroforéticos específicos também foram obtidos, possibilitando a distinção das cultivares Ocepar-13, Ocepar-14 e CD-206. A referida enzima também foi eficiente na caracterização de cultivares de feijão (Vieira, 2000). Contudo este sistema enzimático se mostrou monomórfico na caracterização de três cultivares de cevada (Bonow et al., 2001).

Em relação à enzima isocitrato desidrogenase (IDH), essa parece ser monomérica e codificada por dois locos (Figura 5). De acordo com o manual da UPOV (Genebra, 1998), a isocitrato desidrogenase é uma enzima dimérica, codificada por dois locos, cada um possuindo dois alelos. Tanksley e Orton (1983) e Griffin e Palmer (1995) relataram o mesmo número de locos e alelos para a referida enzima em *G.max*, enquanto Yu e Kiang (1993) citaram quatro locos, cada um possuindo dois alelos, codificando a mesma enzima em *G.soja*. Provavelmente, a diferença de resultados obtidos para *G.max* pode estar relacionada à utilização de genótipos diferentes. Além disso, deve-se levar em consideração fatores como estágio de desenvolvimento, diferentes tecidos e a presença de microrganismos, causando variações nos zimogramas e, conseqüentemente, diferentes interpretações.

No presente estudo, cinco padrões eletroforéticos diferentes foram gerados pela enzima isocitrato desidrogenase, o que possibilitou distinguir as cultivares Conquista, BRIAC 21, Confiança, Splendor e FT 2000; Liderança e

Monarca; UFV 16; Garantia, e Vencedora, possuindo, as três últimas, padrões eletroforéticos específicos. O mesmo sistema enzimático foi útil na separação de cultivares de *G.max* e *G.soja*, como relatado por Griffin e Palmer (1995) e Yu e Kiang (1993), respectivamente.

Quanto à enzima peroxidase (PO), essa parece ser uma enzima monomérica codificada por um loco com três alelos, sendo um nulo (Figura 5). De acordo com o manual da UPOV (UPOV, 1998) e Tanksley e Orton (1983), a peroxidase em soja é codificada por um loco com dois alelos, sendo um nulo. Ainda segundo o mesmo manual, a referida enzima seria dimérica.

Buttery e Buzzel (1968), citados por Tanksley e Orton (1983), observaram alta e baixa atividade da peroxidase no tegumento de sementes de soja. Por meio de análises genéticas foi verificado que a alta atividade, que corresponde à reação positiva do teste de peroxidase, é codificada pelo alelo dominante (Ep), e que a baixa atividade, correspondendo à reação negativa do teste de peroxidase, é resultado da falta do segundo alelo do loco que codifica esse caráter.

De acordo com o zimograma da peroxidase apresentado na Figura 5, três padrões eletroforéticos diferentes foram obtidos, o que possibilitou a separação das cultivares Confiança; Splendor e FT 2000 das demais, cujo padrão eletroforético corresponde à ausência de bandas ou ao alelo nulo do loco em questão. Um padrão específico foi obtido para a cultivar Confiança. Apesar desse polimorfismo encontrado entre as dez cultivares de soja para o sistema enzimático peroxidase, Anti (2000) não pode separar as cultivares IAC 6 e IAC 9 por meio dessa enzima.

A atividade da peroxidase detectada na técnica de eletroforese correspondeu aos resultados obtidos no teste de peroxidase, segundo o qual somente as cultivares Confiança, Splendor e FT 2000 apresentaram reação positiva.

O controle genético para a maioria das isoenzimas é geralmente conhecido (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Mais de 40 locos codificando variantes de enzimas e proteínas já foram descritos para *G.max* e *G.soja* (Griffin e Palmer, 1995). No entanto, diferentes interpretações do zimograma de um mesmo sistema enzimático são relatadas na literatura, o que provavelmente se deve à falta de protocolos padronizados e às variações inerentes de cada genótipo, não havendo, na maioria das vezes, um padrão eletroforético fixo de determinada enzima para cada espécie em estudo, e sim padrões eletroforéticos correspondentes a cada cultivar.

De maneira geral, oito das dez cultivares de soja puderam ser distintas por meio dos marcadores isoenzimáticos, tendo, para cada uma destas cultivares, sido obtido pelo menos um padrão eletroforético específico. A cultivar BRIAC 21, por exemplo, pode ser distinguida das demais pelos sistemas enzimáticos superóxido dismutase, diaforase e esterase; a cultivar Liderança pela enzima esterase; Confiança pela fosfoglucomutase, esterase e peroxidase; UFV 16 pela isocitrato desidrogenase; Garantia pela álcool desidrogenase e isocitrato desidrogenase; FT 2000 pela álcool desidrogenase; Monarca pela superóxido dismutase e Vencedora pela superóxido dismutase, álcool desidrogenase e isocitrato desidrogenase. Somente as cultivares Conquista e Splendor não apresentaram padrões eletroforéticos específicos.

Apesar da base genética do germoplasma brasileiro de soja ser considerada estreita, o que foi comprovado por marcadores moleculares microssatélite, AFLP e RAPD (Priolli et al., 2002; Bonato, 2000; Abdelnoor et al., 1995) e também por marcadores bioquímicos (Aguero, 2002), os marcadores isoenzimáticos testados no presente trabalho permitiram a caracterização das dez cultivares de soja avaliadas. Contudo, vale ressaltar que, na utilização de isoenzimas como marcadores em estudos de caracterização de cultivares, fatores como presença de microrganismos, nível de qualidade fisiológica, diferentes

tecidos e estádios de desenvolvimento, devem ser considerados, uma vez que podem alterar os padrões eletroforéticos levando a erros de interpretação.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se a caracterização do maior número possível de cultivares de soja quanto aos marcadores isoenzimáticos, para que esses possam ser utilizados com segurança nos testes de caracterização de cultivares.

De acordo com os dados gerados pelos marcadores isoenzimáticos polimórficos, a similaridade genética média entre as dez cultivares de soja foi de 0,300 (Tabela 4). No entanto, a base genética dos germoplasma brasileiro de soja é considerada estreita (Priolli et al., 2002; Bonato, 2000; Abdelnoor et al., 1995; Agüero, 2002).

TABELA 4. Similaridades genéticas entre as dez cultivares de soja, calculadas pelo coeficiente de Jaccard a partir dos dados obtidos pela eletroforese de enzimas. UFLA, Lavras, MG, 2003.

| Cultivar | Conquista | BRIAC 21 | Liderança | Confiança | Splendor | UFV 16 | Garantia | FT 2000 | Monarca | Vencedora |
|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|--------|----------|---------|---------|-----------|
| Conquista | 1,000 | | | | | | | | | |
| BRIAC 21 | 0,200 | 1,000 | | | | | | | | |
| Liderança | 0,125 | 0,118 | 1,000 | | | | | | | |
| Confiança | 0,430 | 0,111 | 0,222 | 1,000 | | | | | | |
| Splendor | 0,500 | 0,222 | 0,182 | 0,400 | 1,000 | | | | | |
| UFV 16 | 0,286 | 0,556 | 0,111 | 0,222 | 0,300 | 1,000 | | | | |
| Garantia | 0,250 | 0,111 | 1,000 | 0,200 | 0,273 | 0,375 | 1,000 | | | |
| FT 2000 | 0,300 | 0,211 | 0,770 | 0,363 | 0,545 | 0,400 | 0,364 | 1,000 | | |
| Monarca | 0,300 | 0,278 | 0,400 | 0,250 | 0,308 | 0,167 | 0,154 | 0,200 | 1,000 | |
| Vencedora | 0,125 | 0,118 | 0,111 | 1,00 | 0,182 | 0,111 | 0,222 | 0,167 | 0,273 | 1,000 |

Pelo dendrograma obtido a partir dos coeficientes de similaridade de Jaccard (Figura 6), as dez cultivares de soja foram agrupadas em seis grupos: 1) contendo as cultivares Conquista e Confiança; 2) contendo Splendor e FT 2000; 3) contendo UFW 16 e Garantia; 4) contendo somente a cultivar BRIAC 21; 5) contendo as cultivares Liderança e Monarca, e 6) contendo a cultivar Vencedora. O agrupamento obtido está de acordo com a genealogia das cultivares apresentada no Quadro 1.

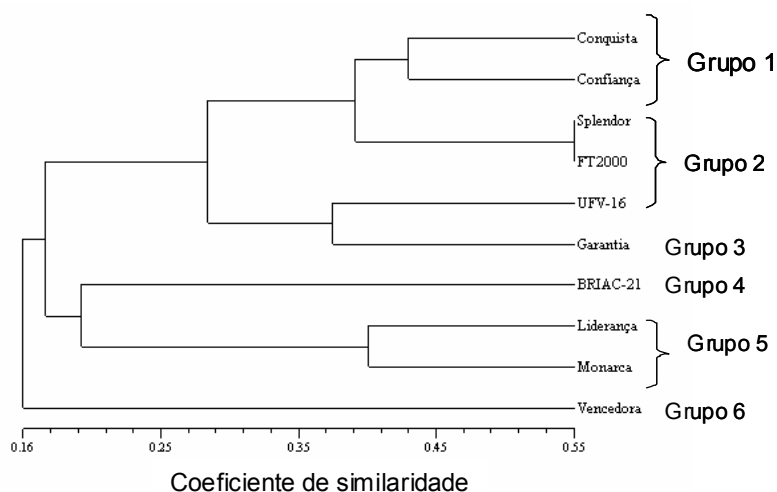


FIGURA 6. Dendrograma de dez cultivares de soja, obtido pela análise de agrupamento UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores isoenzimáticos. UFLA, Lavras, MG, 2003.

De acordo com o dendrograma, o maior valor de similaridade genética é 0,55 entre as cultivares Splendor e FT 2000, e o valor da linha de corte mesmo com a menor porcentagem do valor de $t(t_{0,1\%})$ foi de 0,72. Dessa forma, todos os agrupamentos obtidos estão à esquerda da referida linha, ou seja, com

similaridades abaixo de 0,72, indicando que as dez cultivares estudadas possuem uma baixa similaridade genética entre si.

A correlação de Pearson entre a matriz de similaridade obtida a partir dos dados isoenzimáticos e o dendrograma foi de $r = 0,414$, o que indicou que os agrupamentos obtidos no dendrograma não estão totalmente de acordo com os valores de similaridade entre cada par de genótipos. Por exemplo, as cultivares UFV 16 e BRIAC 21, FT 2000 e Liderança, e Vencedora e Confiança apareceram em agrupamentos distintos no dendrograma, enquanto se mostraram semelhantes pelos dados de similaridade genética apresentados na Tabela 4. Em relação ao último par de cultivares, essas apresentaram uma similaridade genética igual a um, enquanto, no dendrograma, a cultivar Vencedora foi separada das demais, formando um grupo único. Provavelmente, a baixa correlação obtida deve estar relacionada com a dificuldade de se transpor a distribuição das similaridades genéticas no espaço para uma distribuição bidimensional no dendrograma, levando à não coincidência dos dados. Apesar disso, a maior parte das informações apresentadas, tanto na matriz de similaridade como no dendrograma, foi justificada pelos dados genealógicos.

Os valores de bootstrap (BS) para os agrupamentos apresentados no dendrograma foram todos abaixo de 50%, o que revela uma inconsistência. Um bootstrap de 53,52% foi obtido para um agrupamento contendo as cultivares BRIAC 21 e FT 2000, o qual não está presente no dendrograma. Provavelmente, a inconsistência dos agrupamentos e a baixa correlação entre a matriz de similaridade genética e o dendrograma, apesar da maior parte dos agrupamentos obtidos poder se explicar pelos dados genealógicos, pode estar relacionada à utilização de um número insuficiente de locos enzimáticos. No presente trabalho foram obtidos sete locos enzimáticos polimórficos, sendo recomendados 20 locos para estudos de caracterização de cultivares (Konarev, 1988). No entanto, vale ressaltar que a obtenção de 20 locos enzimáticos polimórficos é difícil não

somente para soja, mas também para as mais diversas culturas, o que provavelmente é devido ao estreitamento da base genética como consequência da domesticação e do melhoramento ao qual as culturas foram submetidas.

A similaridade genética entre as cultivares Conquista e Confiança, cujo valor foi de 0,430, pode ser explicada pelo fato dessas possuírem as cultivares Roanoke e Ogden como progenitores. Tais cultivares estão presentes na genealogia das cultivares Numbaíra e Paraná, que são os parentais das cultivares Conquista e Confiança, respectivamente.

A elevada similaridade genética entre as cultivares Splendor e FT 2000 provavelmente se deve à existência de progenitores em comum entre essas duas cultivares. Apesar do não conhecimento da genealogia da cultivar FT 2000, essa, provavelmente, foi obtida de cruzamentos envolvendo as cultivares IAC ou FT 2, que são os parentais da cultivar Splendor.

A proximidade dos agrupamentos 1 e 2, que contêm as cultivares Conquista e Confiança, e Splendor e FT-2000, respectivamente, pode ser explicada pela presença das cultivares Hill ou Davis na genealogia de pelo menos três daquelas cultivares.

As cultivares UFV 16 e Garantia possuem um ancestral comum, a cultivar D49-2491. A cultivar UFV 16 foi obtida do cruzamento de FT 12 e IAC 8, sendo essa última resultado do cruzamento de Bragg e (Hill X PI240664). A cultivar Bragg foi obtida do cruzamento de Jackson e D49-2491. No caso da cultivar Garantia, essa possui a cultivar FT Cristalina em sua genealogia, a qual se originou de um cruzamento natural em UFV 1, que possui a cultivar D49-2491 em sua genealogia.

A cultivar Liderança tem como um de seus parentais a cultivar Paraná, que foi obtida do cruzamento de Hill e da geração F1 do cruzamento de Roanoke e Ogden. A cultivar Monarca é resultado de uma seleção em CAC 1, a qual foi obtida também de uma seleção em IAC 8 que possui a cultivar Hill em sua

genealogia. Dessa forma, as cultivares Liderança e Monarca possuem a cultivar Hill como ancestral, o que explica a similaridade genética existente entre elas.

A presença de cultivares como Hill, Davis, D49-2491, Hood e Lee na genealogia das cultivares avaliadas no presente trabalho, demonstra que ainda há uma forte presença de cultivares americanas no germoplasma brasileiro de soja.

A maior distância genética da cultivar Vencedora em relação às demais pode ser explicada pelo fato dessa cultivar possuir ancestrais diferentes daqueles das demais cultivares, como Dourados e FT 5 estão presentes nos cruzamentos que lhe deram origem, o que a torna menos semelhante às outras cultivares.

Apesar da cultivar BRIAC 21 ter sido colocada em um grupo separado, ela possui progenitores em comum com outras cultivares, como UFV 16 e Garantia. A similaridade genética entre as cultivares BRIAC 21 e UFV 16 é de 0,556, sendo esse um dos maiores valores observados. A não coincidência de alguns agrupamentos obtidos no dendrograma com os dados genealógicos foi relatada até mesmo para marcadores moleculares. Priolli et al. (2002), trabalhando com a caracterização de cultivares brasileiras de soja por meio de marcadores SSR, relatam a ocorrência de cerca de 10% de dados discrepantes quanto ao agrupamento e à genealogia, o que, provavelmente, foi devido à falta de informações corretas quanto ao pedigree.

5 CONCLUSÕES

Cultivares de soja podem ser caracterizadas por descritores morfológicos.

A cultivar Conquista apresenta antocianina muito forte no hipocótilo das plântulas como descritor morfológico específico.

A cultivar Liderança apresenta folíolos laterais oval-pontiagudos e ciclo total semiprecoce como descritores morfológicos específicos.

A cultivar Confiança apresenta rugosidade muito forte e sementes de tamanho pequeno como descritores morfológicos específicos.

A cultivar Splendor apresenta vagens de coloração marrom-claro como descritor morfológico específico.

A cultivar UFV 16 apresenta plantas de altura baixa e dente apical grande como descritores morfológicos específicos.

A cultivar Garantia apresenta intensidade clara da cor verde das folhas, folíolos laterais lanceolado-estreitos e ciclo vegetativo tardio como descritores morfológicos específicos.

A cultivar Vencedora apresenta brilho do tegumento de intensidade média como descritor morfológico específico.

Marcadores bioquímicos de proteínas totais e resistentes ao calor não são eficientes na caracterização de cultivares de soja.

Marcadores bioquímicos de enzimas são eficientes na caracterização de cultivares de soja.

A cultivar BRIAC 21 é distinta das demais pelas enzimas superóxido dismutase, diaforase e esterase, assim como a cultivar Liderança pela enzima esterase; Confiança pelas enzimas fosfoglucomutase, esterase e peroxidase; UFV 16 pela enzima isocitrato desidrogenase; Garantia pelas enzimas isocitrato desidrogenase e álcool desidrogenase; FT 2000 pela enzima álcool desidrogenase e Monarca pela enzima superóxido dismutase.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R. V.; BARROS, D. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA technique and comparative analysis with pedigree data. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 265-273, set. 1995.
- AGRIANUAL – Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2004, 469p.
- AGUERO, C. O. P. **Padrões eletroforéticos de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 2002. 36 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.
- ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. S.; ABDELNOOR, R. V. Melhoramento de soja. In: ABREU, A. F. B.; GONÇALVES, M. A.; MARQUES JR., O. G.; RIBEIRO, P. H. E. (Ed.). **Simpósio sobre atualização em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: Editora UFLA/GEN, 1997. 290 p.
- ANTI, A. B. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isoenzimas da semente. **Bragantia**, Campinas, v. 59, n. 2, p. 139-142, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Cultivar purity testing**. Lansing, 1991. 371 p.
- BLOOG, D.; IMRIE, B. C. Starch gel electrophoresis for soybean cultivar identification. **Seed Science and technology**, Zurich, v. 10, n. 1, p. 19-24, 1982.
- BONATO, A. L. V. **Avaliação da diversidade genética entre cultivares brasileiras de soja, através de marcadores AFLP**. 2000. 89 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1987. 61 p. (Embrapa CNPSo. Documentos, 21).
- BONATO, E. R.; DALL'AGNOLL, A.; Soybean in Brazil: Production and Research. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., 1985, Ames. **Proceedings...** Boulder: Westveew Press, 1986. p. 1248-1256.
- BONETTI, L. P. Cultivares e seu melhoramento genético. In: VERNETTI, F. de J. (Coord.). **Soja, genética e melhoramento**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. v. 2, p. 741-800.
- BONOW, S.; AUGUSTIN, E.; FRANCO, D. F.; PETERS, J. A.; TERRES, A. L. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 291-300, fev. 2001.
- BRASIL. Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.
- BRASIL. Decreto-lei 10. 711 de 5 de agosto de 2003. Nova Lei de Sementes e Mudanças. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 150, p. 1 – 4, 6 de ag. 2003. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Normas Climatológicas**. Rio de Janeiro, 1969, 99p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Divisão de Sementes e Mudanças. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Catálogo de Cultivares Protegidas de Soja (*Glycine max. (L.) Merrill*)**. Brasília, 2002. 130 p.
- BRATUAGAR, P. S. Importance and future prospects for genetic diversity for yield improvement. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 6., 1999, Chicago. **Proceedings....** Chicago, 1999. p. 185.
- CAMPS, G.; VERNETTI, F. D. J.; AUGUSTIN, E.; IRIGON, D. Caracterização morfológica e eletroforética de 20 cultivares de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 11, p. 1779-1787, nov. 1994.

- CARDOSO, E. T.; NEDEL, J. L. Padrões eletroforéticos de cultivares de trigo indicadas para região sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 203-209, 2002.
- CARDY, V. J.; BEVERSDORF, W. D. Identification of soybean cultivars using isoenzyme electrophoresis. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 12, n. 3, p. 943-955, 1984.
- CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; VON PINHO, E. V. R. Técnicas moleculares em sementes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 17, p. 44-47, nov./dez. 2000.
- CASH. Agronegócio é um dos destaques de 2004. **Jornal O Tempo**, 3 de janeiro de 2004.
- COELHO, A. S. G. BOOD – Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridade genéticas através do procedimento de bootstrap, versão 3.0. Goiânia, GO: Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2001.
- COOKE, F. J. The standartization of electrophoresis methods for variety identification. Proceeding of ISTA Symposium, Leningrad, 1998. p. 14-27.
- CRUZ, D. D. **Programa GENES** – versão Windows. Viçosa, Minas Gerais: Editora UFV, 2001. 642 p.
- DESTRO, D.; DEDIYAMA, T.; GOMES J. L. L. **Genes qualitativos em soja (alguns comentários e listagem)**. Viçosa: Imprensa Universitário, 1990. 67 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- GIZLICE, Z.; CARTER JÚNIOR, T. E.; BURTON, J. W. Genetic base for North American public soybean cultivars released between 1947 and 1988. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 5, p. 1143-1151, Sept./Oct. 1994.
- GRIFFIN, J. D.; PALMER, R. G. Variability of thirteen isozyme loci in the USDA soybean germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 3, p. 897-904, May/June 1995.

HAGIWARA, W. E.; SANTOS, J. B.; CARMO, S. L. M. Use of RAPS to aid selection in common bean backcross breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 355-362, 2001.

HIROMOTO, D. M.; VELLO, N. A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 295-306, jun. 1986.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economy Botany**, New York, v. 24, p. 408-421, 1970.

IMOLESI, A. S.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; VIEIRA, M. G. G. C.; CORRÊA, R. S. B. Efeito da adubação nitrogenada em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 17-24, 2001.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. **Rules for seed testing**. Switzerland, 1996. 44 p.

INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS - UPOV. **Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homegeneidad y la estabilidad (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Genebra, 1998. 12 p.

KIANG, Y. T.; GORMAN, M. B. Soybean. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozyme in Plant Genetics and Breeding**. New York: Elsevier, 1983. p. 295-328.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed developmet and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.

KIIHL, R. A. S.; BAYS, I. A.; ALMEIDA, L. A. Soybean breeding for the brazilian tropics. In: SOYBEAN IN TROPICAL AND SUBTROPICAL CROPPING SYSTEMS, 1., 1983, Tsukuba, Japan. **Proceedings...** Tsukuba, Japan, 1986. p. 141-144.

KONAREV, V. G. Proteins in cultivar identification. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, ISTA, 3., 1987, Leningrad, 1988. p. 9-14.

LARSEN, L. Electrophoretic differences in seed proteins among varieties of soybean. **Crop Science**, Madison, v. 7, n. 4, p. 311-313, July/Aug. 1967.

- MANN, R. S. **Diversidade do complexo colletotrichum e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares.** 2002. 146 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PAYNE, R. C.; KOSZYKOWSKI, T. J. Esterase isozyme differences in seed extract among soybean cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 4, p. 557-559, July/Aug. 1978.
- PERRY, M. C.; MCINTOSH, M. S. Geographical Patterns of Variation in the USDA soybean germplasm collection: I. Morphological traits. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1350-1355, Sept./Oct. 1991.
- PERRY, M. C.; MCINTOSH, M. S.; TONER, A. K. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection : II. Allozyme frequencies. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1356-1360, Sept./Oct. 1991.
- PINTO, L. R.; SADER, B.; LEMOS, V. G. M. Identificação bioquímica de cultivares de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill) através da eletroforese em gel de poliacrilamida. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 96-100, 1995.
- PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JÚNIOR, C. T. ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 185-193, June 2002.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system:** version 2. 11. New York, 1992. 470 p.
- ROVERI JOSÉ, S. C. B.; VON PINHO, E. V. R.; SALGADO, K. C.; VON PINHO, R. G. Identificação de cultivares de milho por meio de marcador molecular de proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, (submetido).
- SALGADO, K. C. de C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares.** 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SAVOY, F. C. Electropherogram pattern similarity of seed proteins from 21 different soybean (*Glycine max*) varieties. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 55, n. 16, p. 2245-2250, Aug. 1977.

SILVA, E. A. A. **Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleóptilos de milho em associação com microrganismos**. 1997. 88 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Developments in plant genetics and breeding. I. Isozymes in plant genetics and breeding. Part B**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. 197 p.

VELLO, N. A.; HIROMOTO, D. M.; AZEVEDO-FILHO, A. J. B. V. Coefficient of parentage and breeding of Brazilian soybean germplasm. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 3, p. 679-697, set. 1988.

VIEIRA, E. S. N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética**. 2000. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 114 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WAGNER, C. K.; MCDONALD JUNIOR, M. B. **Identification of soybean *Glycine max* (L.) Merrill cultivars using rapid laboratory techniques**. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1981. 21 p. (Research Bulletin, 1133).

YU, H.; KIANG, Y. T. Genetic variation in South Korean natural populations of wild soybean (*Glycine soja*). **Euphytica**, Wageningen, v. 68, n. 3, p. 213-221, 1993.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a utilização de descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas em estudos de caracterização de cultivares, deve-se levar em consideração as limitações que cada um desses marcadores apresentam, como serem afetados por fatores ambientais, qualidade fisiológica e presença de microrganismos.

Apesar dessas limitações, tais marcadores têm se mostrado eficientes na caracterização de cultivares de soja e têm sua importância reconhecida, não havendo um melhor marcador a ser recomendado, mas sim a sua associação a fim de se obter resultados mais rápidos e precisos.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITE PARA A CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE *COFFEA ARABICA* L.

RESUMO

VIEIRA, Elisa Serra Negra. **Desenvolvimento de marcadores microssatélite para a caracterização de cultivares de *Coffea arabica* L.** 2004. Cap. 2, 60 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Marcadores microssatélite têm provado ser uma excelente ferramenta para a caracterização de cultivares e estudos da relação genética entre plantas. O número de locos microssatélite específicos para *Coffea arabica* ainda é reduzido, sendo necessário o desenvolvimento de novos locos mediante o enriquecimento de bibliotecas genômicas. Cento e quarenta marcadores microssatélite foram utilizados para analisar a similaridade genética entre vinte e cinco cultivares de *C. arabica*, sendo dezenove cultivares brasileiras de importância econômica e seis híbridos indianos de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. liberica*. Do número total de marcadores microssatélite testados, cento e vinte e sete marcadores nucleares foram desenvolvidos a partir de seqüências obtidas mediante a construção de bibliotecas genômicas e seqüências microssatélite específicas para *C. arabica* disponíveis no banco de dados NCBI, e treze marcadores do DNA de cloroplasto, também foram testados. Vinte e dois locos foram polimórficos, com 2-7 alelos detectados para cada loco, sendo 3,5 o número médio de alelos por loco. Os locos 59 e 17 apresentaram-se como sendo os mais discriminativos para as cultivares brasileiras, apresentando ambos 6 fenótipos alélicos e número efetivo de alelos igual a 3,9 e 3,4, respectivamente. A maioria dos locos microssatélite apresentou repetições de di-nucleotídeos GT,

* Comitê Orientador: Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Orientadora), Dr. Ben Vosman – Plant Research International (PRI), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA.

estando o polimorfismo positivamente correlacionado com o número de repetições. Baseado no padrão de bandas gerado pelos locos polimórficos, as 25 cultivares foram separadas em dois grandes grupos, sendo um grupo composto pela maioria das cultivares brasileiras e um segundo composto pelos híbridos indianos. Muitos mutantes que se diferenciavam pela cor de fruto não puderam ser separados. Pelos dados do agrupamento foi observado elevado nível de similaridade genética entre as cultivares brasileiras de *C.arabica*, o que está de acordo com a genealogia.

ABSTRACT

VIEIRA, Elisa Serra Negra. **Development of microsatellite markers for the characterization of *Coffea arabica* L. cultivars.** 2004. Cap. 2, 60 p. Thesis (Doctorate in Plant Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Microsatellite markers or SSR (Simple Sequence Repeats) have proved to be an excellent tool for cultivar characterization and genetic relationship studies in plants. The number of SSR loci specific for *Coffea arabica* is still limited, being necessary to develop new ones using genomic library enrichment. A set of 140 SSR markers were used to analyze the genetic similarity among twenty five *C. arabica* cultivars composed of nineteen brazilian cultivars of commercial importance, and six indian hybrids of *C. arabica*, *C. canephora* and *C. liberica*. Of the total number of SSR markers tested 127 DNA nuclear markers were developed using enriched small insert libraries and the coffee SSR sequences available in the NCBI database. Beyond these, thirteen universal chloroplast DNA markers were also tested. Among the twenty-two polymorphic loci 2-7 alleles were detected for each locus with an average of 3.5 alleles per locus. The loci 59 and 17 were the most discriminating for brazilian cultivars, both with 6 allelic phenotypes and 3.9 and 3.4 effective alleles, respectively. The majority of the SSR loci contained di-nucleotide (GT) repeats and the polymorphism was positively correlated with the number of repeats. Based on the band patterns generated by the polymorphic SSR loci, the set of twenty-five coffee cultivars were clustered in two main groups. One group composed of the most part of the brazilian cultivars and a second one composed of the indian hybrids. Many of the color mutants were not separated. Based on the clustering a high level of genetic similarity was observed among the brazilian cultivars, what is in agreement with the genealogy data.

* Guidance Committee: Dr. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Major Professor), Dr. BenVosman – Plant Research International (PRI), Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O café, desde sua introdução no Brasil, tem sido uma das culturas de maior importância econômica, estando sua produção ligada ao desenvolvimento e a industrialização do país. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café.

Em 2000, cultivares da espécie arábica, como Acaia, Catuaí, Rubi, Topázio, Mundo Novo e Icatu, entre outras, foram inscritas no Registro Nacional de Cultivares (RNC). Para tanto, são requeridas informações sobre a identidade genética de cada cultivar a ser registrada. De acordo com Lei de Proteção de Cultivares, a identidade genética de uma cultivar é definida como o conjunto de características fenotípicas e genotípicas que a difere das demais. Entretanto, caracteres genotípicos não estão incluídos na lista de descritores mínimos para a caracterização de cultivares de café, bem como para cultivares de nenhuma outra espécie. Informações genotípicas são ainda mais importantes para cultivares de espécies de base genética estreita, como o café.

Os descritores atualmente utilizados para a caracterização de cultivares de café são morfológicos e, em casos especiais, avaliações adicionais por meio de marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas são realizadas.

Os descritores morfológicos têm importância reconhecida na caracterização de cultivares de café, apesar de apresentarem limitações como a instabilidade e o espaço e tempo necessários para a avaliação, a qual é realizada nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Para o café, as duas últimas limitações são ainda mais relevantes por ser essa uma cultura perene.

Dessa forma é necessário, para a caracterização de cultivares de café, a obtenção de marcadores mais estáveis e que possam ser avaliados de modo mais rápido, sendo recomendados, nesse caso, marcadores moleculares de DNA.

Marcadores microssatélite (SSR) têm sido considerados como os mais eficientes em estudos de caracterização de cultivares, além de gerarem uma grande quantidade de informações genéticas da espécie em estudo. Para o desenvolvimento de marcadores SSR é necessário a construção e enriquecimento de bibliotecas genômicas, bem como o sequenciamento de um elevado número de clones, sendo essas atividades demoradas e de custo elevado. Por essas razões, o número de locos SSR desenvolvidos especificamente e disponíveis para *C. arabica* ainda é bastante reduzido, o que limita a aplicação de marcadores SSR nos estudos genéticos da referida espécie.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver novos marcadores SSR para *C. arabica* e testá-los, juntamente com os poucos já publicados, na caracterização de cultivares brasileiras de café arábica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cafeeiro: classificação botânica, origem, disseminação e importância econômica

O café pertence ao gênero *Coffea*, família Rubiaceae, na qual as seções *Eucoffea* e *Mascarocoffea* são as mais importantes (Chavier e Berthaud, 1985).

O gênero *Coffea* compreende cerca de 80 espécies, dentre as quais podem ser citadas *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Coffea eugenioides*, *Coffea liberica*, *Coffea congensis*, *Coffea dewevrei*, *Coffea racemosa* e *Coffea stenophylla*. Dessas, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as espécies de maior importância econômica na produção mundial de café (Mendes e Guimarães, 1998). *C. arabica* é a espécie preferida devido às características dos grãos que produzem uma bebida de suave sabor, enquanto *C. canephora* é

preferencialmente destinada à produção de café solúvel (Mendes e Guimarães, 1998). *C. arabica* e *C. canephora* são responsáveis por 74% e 25%, respectivamente, da produção mundial de café, e as demais espécies correspondem a 1% da produção (Cardoso, 1994).

Dentro do gênero *Coffea*, todas as espécies são alógamas e diplóides com $2n=2x=22$ cromossomos, existindo uma exceção, *C. arabica*, que é autógama e poliplóide, com $2n=4x=44$ cromossomos (Mendes e Guimarães, 1998). Por meio de análises genéticas e citológicas, de estudos de quimiotaxonomia, compatibilidade de cruzamento e serologia, tem-se procurado explicar a natureza alotetraplóide de *C. arabica*, sendo a hipótese mais aceita a hibridização entre espécies diplóides. Acredita-se que uma das espécies envolvidas na origem de *C. arabica* seja a espécie *C. eugenioides* (Mendes e Guimarães, 1998; Lashermes et al., 1999). Quanto a outra espécie envolvida, existiam dúvidas entre *C. canephora*, *C. congensis*, *C. dewevrei* e *C. liberica*. Lashermes et al. (1999), por meio de hibridização *in situ*, demonstraram que, provavelmente, *C. canephora* e *C. eugenioides* foram as espécies que originaram *C. arabica*.

O café é originário do continente Africano e a espécie *C. arabica* tem seu centro de origem na região sudoeste da Etiópia (Sylvain, 1955).

Informações referentes à dispersão do cafeeiro sinalizam a introdução de plantas de café arábica no Yemen em 575AC ou mesmo três a quatro séculos antes (Wellman, 1961; Eskes, 1989). A partir daí, duas bases genéticas se formaram e se disseminaram para outras regiões, dando origem às atuais cultivares. Tais bases genéticas têm sido descritas como sendo duas variedades botânicas distintas: *C. arabica* var. *arabica*, conhecida como *Typica*, e *C. arabica* var. *bourbon* (Carvalho et al., 1946). Pelos dados históricos, a variedade *Typica* consistia de uma única planta de café retirada da Indonésia e levada para o Jardim Botânico de Amsterdã, no início do século XVIII (Carvalho, 1946). A

variedade Bourbon originou-se de um número maior de plantas provenientes do Yemen e levadas para as Ilhas Bourbon, atualmente Ilhas Reunião (Haarer, 1956). As cultivares derivadas de Bourbon apresentam um hábito de crescimento mais compacto e ereto, maior produtividade e melhor qualidade de bebida quando comparadas às cultivares derivadas de Typica (Carvalho, 1946). Pode-se considerar que as variedades de café de maior valor comercial atualmente cultivadas e comercializadas no mercado nacional e internacional são derivadas basicamente das duas variedades botânicas acima citadas.

A introdução do café no Brasil se deu no século XVIII. Sementes e mudas obtidas de uma única planta da variedade Typica foram levadas do Jardim Botânico de Amsterdã, Holanda, para as Guianas e a partir daí trazidas para o Brasil, com o objetivo de se obter materiais mais adaptados e produtivos. No século XIX, foram realizadas novas introduções, como a cultivar Bourbon Vermelho vinda da Ilhas Reunião, e da cultivar Sumatra, da Ilha de Sumatra (Mendes e Guimarães, 1998).

Desde a dispersão de seu centro de origem para outras regiões, o café se tornou o segundo produto mundial em valor agregado, só perdendo para o petróleo. Produto de exportação mundial, o café movimentou bilhões de dólares na economia de países da América Latina, África e Ásia, representando, para 30% desses países, mais da metade de sua receita cambial (Agrianual 2004).

O Brasil, é, atualmente, o maior produtor e exportador de café, sendo a referida cultura de grande importância para o agronegócio brasileiro (Agrianual, 2004).

2.2 Diversidade genética

Apesar do gênero *Coffea* compreender cerca de 80 espécies, além de *C. arabica* e *C. canephora*, pouco se conhece sobre as outras espécies, às quais podem representar valiosa fonte de genes relacionados à resistência de pragas, doenças, seca e outras condições adversas de clima e solo (Carvalho, 1946; Lashermes et al., 1993).

Durante todo o processo de dispersão do cafeeiro no Brasil, sempre foram utilizadas pequenas quantidades de sementes e mudas obtidas basicamente das variedades Typica e Bourbon. Tal fato certamente contribuiu para o estreitamento da base genética do cafeeiro no Brasil. Como tentativas de se ampliar a base genética, houve a introdução de mutantes (Murta e Polysperma) e variedades exóticas (Laurina e Mokka). Além disso, houve uma seleção por parte dos próprios agricultores de materiais que apresentavam expressões fenotípicas como cor de fruto, tamanho da semente e porte da planta distintas das cultivares tradicionais. Como resultado dessas seleções, as cultivares Amarelo de Botucatu, Maragogipe, Caturra e Bourbon Amarelo foram obtidas.

Mesmo após a introdução e seleção de materiais distintos, a base genética do cafeeiro no Brasil ainda é considerada estreita, como constatado por Teixeira et al. (1999), Diniz (2000), Silveira et al. (2003) e Ruas et al. (2003), os quais avaliaram a diversidade genética entre cultivares brasileiras de *C. arabica* por meio de marcadores enzimáticos, RAPD e microssatélite (SSR).

Como resultado dos programas de melhoramento do cafeeiro no Brasil, cultivares bem adaptadas e produtivas foram obtidas. Dentre elas podem ser citadas as cultivares Mundo Novo, Acaia, Icatu, Catuaí, Rubi, Topázio e Ouro Verde, as quais são as mais utilizadas no Brasil. Além dessas, existem outras ainda em estudo quanto à adaptação e produção em escala comercial como as

cultivares Catimor, Catucaí, Sarchimor e Apatã (*C. canephora*) (Mendes e Guimarães, 1998). Mesmo havendo, atualmente, um grande número de cultivares de café no Brasil, todas possuem progenitores em comum.

Nos últimos anos, a diversidade genética inter e intra-específica do gênero *Coffea* tem sido estudada, tendo-se como objetivos o maior conhecimento taxonômico das espécies do gênero, o melhor manejo dos recursos genéticos existentes, a geração de marcadores úteis nos programas de melhoramento assistido, além da diferenciação de genótipos (Silveira et al., 2003; Ruas et al., 2003; Steiger et al., 2002; Diniz, 2000). Para tanto, vários tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados.

Isoenzimas foram os primeiros marcadores moleculares aplicados no estudo da diversidade genética em café, mas com moderado sucesso (Berthon e Trouslot, 1977; Bertrand e Chavier, 1988). Bustamante e Polanco (1999) tentaram caracterizar 20 cultivares de *C. arabica* do Banco de Germoplasma de Bramón, Venezuela, utilizando os sistemas enzimáticos aconitase e fosfogluconato isomerase. Como resultado, os autores conseguiram apenas a diferenciação da cultivar Blue Montain das demais cultivares por meio do sistema enzimático aconitase.

A diversidade genética em café no nível de DNA tem sido avaliada por meio de marcadores RAPD. Teixeira et al. (1999) avaliaram a diversidade genética entre 38 genótipos de café do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Viçosa e 16 linhagens comerciais de *C. arabica* como Catucaí, Mundo Novo, Topázio e Acaiaí Cerrado. Cento e trinta e um marcadores RAPD possibilitaram a separação dos 38 genótipos do Banco de Germoplasma em três grandes grupos: grupo A contendo *C. racemosa*; grupo B, contendo 36 genótipos de *C. arabica* e grupo C, contendo *C. canephora*. O grupo B continha progênies de Mundo Novo, Catucaí, Bourbon, Caturra e Catimor, entre outras, apresentando os maiores valores de similaridade genética. Muitos genótipos

dentro desse grupo não puderam ser separados, como as progênies UFV-2163 e UFV-2164 de Mundo Novo, Bourbon de Portugal e Typica da China. Dezesesseis marcadores RAPD foram utilizados para avaliar as 16 linhagens comerciais e, destes, apenas nove geraram fragmentos polimórficos, revelando uma baixa variabilidade genética entre as linhagens comerciais. De acordo com o agrupamento obtido, as linhagens comerciais foram separadas em quatro grupos, sendo a linhagem Acaia Cerrado a mais divergente.

Por outro lado, Orozco-Castillo et al. (1994) e Lashermes et al. (1996) relatam que poucos marcadores RAPD foram eficientes na detecção de polimorfismo e geração de fragmentos reprodutíveis em *C. arabica*.

Como uma tentativa de aumentar as chances de encontrar polimorfismo com marcadores RAPD, tem-se sugerido a combinação da técnica RAPD com a digestão de fragmentos de DNA com enzimas de restrição anteriormente à amplificação. O aumento de polimorfismo pode ser devido ao fato dos sítios de anelamento se tornarem mais acessíveis e também ao aumento da eficiência de anelamento dos “primers” ao longo de fragmentos de DNA mais curtos (Koeber, 1995). Tal adaptação da técnica RAPD foi utilizada por alguns autores como uma forma mais eficiente de se avaliar a variabilidade genética existente em *C. arabica*.

Diniz (2000) tentou diferenciar 40 cultivares de café da coleção do Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), utilizando inicialmente, 185 marcadores RAPD, os quais não geraram praticamente nenhum polimorfismo. Nessa mesma pesquisa, quando foi realizada a digestão dos fragmentos de DNA anteriormente à amplificação, os padrões eletroforéticos mudaram completamente, podendo ser detectado polimorfismo. Dessa forma, as 40 cultivares puderam ser agrupadas em quatro grandes grupos separados ainda em subgrupos, de acordo com a genealogia, sendo a similaridade genética média de 90%. Estudo semelhante foi realizado por Silveira et al. (2003), os quais

compararam o polimorfismo existente entre seis progênies da cultivar IAPAR 77028-11 derivadas do germoplasma Sarchimor, IAPAR 59, Catuaí Vermelho IAC 81 e PR 7705-40-10, sendo esta última uma progênie F5 derivada do cruzamento de Icatu e Catuaí Vermelho IAC 81. A combinação de 18 “primers” RAPD com as enzimas de restrição BamHI, EcoRI, HaeIII, HindIII e RsaI gerou fragmentos polimórficos e reprodutíveis. O maior polimorfismo foi detectado nas cultivares derivadas do germoplasma Sarchimor e na progênie PR 77054-40-10, polimorfismo intermediário foi encontrado na cultivar IAPAR 59 e quase nenhum polimorfismo na cultivar Catuaí.

Marcadores AFLP também têm sido utilizados em estudos de variabilidade genética em café. Anthony et al. (2002a) avaliaram o polimorfismo existente entre 26 acessos de café, dentre os quais 15 eram cultivares comerciais e 11 acessos obtidos de bancos de germoplasma do Yemem e Etiópia, denominados acessos subespontâneos. Dentre as cultivares comerciais, foram incluídas *C. arabica* var. *typica* e *C. arabica* var. *bourbon*, duas cultivares derivadas de Typica (Blue Mountain e Pluma Hidalgo), duas derivadas de Bourbon (Caturra e Villa Sarchi), dois acessos de Catuaí, um mutante derivado de Typica (Cera) e outro de Bourbon (Mokka), uma cultivar di-haplóide derivada de Bourbon e quatro cultivares produzidas no Yemem. Os autores utilizaram 107 marcadores AFLP e agruparam os acessos de café de acordo com sua origem. O polimorfismo encontrado dentro dos acessos subespontâneos foi maior do que aquele encontrado dentro do material cultivado. Os mesmos autores também relataram que houve maior polimorfismo dentro das cultivares derivadas de Bourbon quando comparado com o polimorfismo encontrado dentro das cultivares derivadas de Typica, o que segundo eles, pode ser explicado pelo fato de um maior número de plantas de Bourbon ter sido introduzido na América Latina. Neste estudo, dois acessos de Catuaí foram avaliados e não puderam ser separados. Os autores ainda sugeriram que está

havendo uma diminuição no polimorfismo durante os ciclos de seleção dos programas de melhoramento de *C. arabica* devido à homogenização da estrutura genética favorecida pela própria autogamia da espécie (Carvalho et al, 1962). Além disso foi confirmado o centro de origem de *C. arabica* como realmente sendo o sudoeste da Etiópia.

Steiger et al. (2002) também utilizaram marcadores AFLP para estudar a diversidade genética entre 61 acessos de *Coffea*, incluindo cultivares de arabica como Typica, Bourbon, Catimor, Catuaí, Caturra, Mokka e duas outras espécies, *C. canephora* e *C. liberica*. Duzentos e setenta e quatro marcadores foram gerados e o maior valor de similaridade genética foi encontrado entre os acessos de Caturra, o qual foi de 98,3%. Entre as três espécies avaliadas, maior similaridade genética foi encontrada entre *C. arabica* e *C. canephora*. Os autores ainda sugeriram que mais estudos são necessários sobre as relações genéticas entre cultivares de arábica, as quais são as de maior interesse comercial, sendo o número de trabalhos publicados que tratam mais a fundo desses materiais ainda limitado.

Marcadores microssatélite também foram empregados nos estudos de variabilidade genética entre e dentro das diferentes espécies do gênero *Coffea*. Combes et al. (2000) avaliaram a diversidade genética utilizando marcadores SSR entre várias espécies de café, e também entre indivíduos do gênero *Psilanthus*, o qual também faz parte da família Rubiaceae. Como resultado, somente cinco dos 11 marcadores SSR utilizados mostraram-se polimórficos para *C. arabica*. Os 11 marcadores amplificaram fragmentos de DNA das outras espécies, mesmo tendo sido desenvolvidos especificamente para *C. arabica*, além de mostrarem-se altamente polimórficos. Também os fragmentos de DNA do gênero *Psilanthus* foram amplificados pelos mesmos marcadores, o que dá suporte à hipótese de que os gêneros *Coffea* e *Psilanthus* são similares (Cros et al., 1998).

Dezesseis cultivares de *C. arabica* derivadas de Typica, Bourbon e acessos selvagens, além de quatro acessos de *C. canephora* coletados na região Central e Oeste da África, foram avaliadas quanto à variabilidade genética por meio de marcadores SSR (Anthony et al., 2002b). Os autores utilizaram 31 marcadores SSR que geraram 92 alelos polimórficos, tendo o número médio de alelos por loco variado de dois a sete. Os acessos de *C. arabica* e *C. canephora* apresentaram, respectivamente, 17 e 33 alelos específicos, o que comprovou a baixa variabilidade genética existente na espécie arábica. As cultivares arábica derivadas de Typica e Bourbon e os acessos de *C. canephora* coletados em diferentes regiões da África foram agrupados de acordo com sua origem genética.

Anthony et al. (2002a) ao avaliarem a variabilidade genética entre diferentes genótipos da espécie arábica por meio de marcadores AFLP, também utilizaram marcadores SSR. Seis marcadores SSR foram utilizados, os quais se mostraram polimórficos. O número total de alelos detectados foi de 28, tendo o número médio de alelos por loco variado de dois a sete. A separação das cultivares, obtida por marcadores AFLP, foi confirmada pelos marcadores SSR.

Vários trabalhos relataram elevada correlação entre marcadores RFLP, AFLP e SSR, sendo a correlação destes com marcadores RAPD sempre menor (Pejic et al., 1998; Russel et al., 1997).

Ruas et al. (2003) utilizaram marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) para avaliar a divergência genética entre oito espécies do gênero *Coffea* e o grau de parentesco de seis híbridos interespecíficos de *Coffea*. Um total de 14 “primers” contendo diferentes microssatélites foram empregados, sendo observada uma elevada variabilidade genética entre as espécies. Ainda no mesmo estudo, foi observado que cinco dos híbridos interespecíficos apresentaram grande parte dos fragmentos amplificados em *C. arabica*, indicando que essa espécie seria um dos parentais dos híbridos.

Marcadores citoplasmáticos, como os desenvolvidos a partir do genoma de cloroplastos, foram utilizados em estudos filogenéticos em diferentes espécies de plantas. Apesar da baixa taxa de evolução e da reduzida frequência de mudanças estruturais que ocorrem no genoma de cloroplastos, marcadores de DNA de cloroplasto (cpDNA) têm detectado maior polimorfismo interespecífico em angiospermas (Clegg et al., 1991). Em café, alguns autores têm utilizado marcadores de cpDNA na avaliação da variabilidade genética entre diferentes espécies. Cros et al. (1998) analisaram a relação genética entre 23 espécies do gênero *Coffea* e uma espécie do gênero *Psilanthus*, coletadas em diferentes regiões da África, por meio de marcadores de cpDNA. Os genótipos foram agrupados de acordo com a localização geográfica. Orozco-Castillo et al. (1996) relatam que a amplificação de seqüências do DNA de cloroplasto após a digestão com enzimas de restrição possibilitou a separação de diferentes espécies de *Coffea* em três grandes grupos, o primeiro contendo as espécies *C. arabica*, *C. eugenioides*, *C. humilis* e *C. stenophylla*; o segundo contendo *C. canephora*, *C. liberica*, *C. brevipes*, e o terceiro contendo *C. pseudozanguebariae*, *C. sessiliflora* e *C. racemosa*. Apesar de se esperar um maior polimorfismo interespecífico com marcadores de cpDNA, a variabilidade genética pôde ser detectada entre quatro diferentes populações de copaíba por meio deste tipo de marcador (Ciampi, 1999).

De maneira geral, como relatado por Bustamante e Polanco (1999), Diniz (2000), Teixeira et al. (1999), Combes et al. (2000), Anthony et al. (2002a e b), Steiger et al. (2002), Ruas et al. (2003) e Silveira et al. (2003), a diversidade genética em *C. arabica* é muito baixa, apesar de existirem diferenças morfológicas entre cultivares, como altura de planta, forma, tamanho e cor das folhas. Uma série de fatores contribui para essa estreita base genética, podendo-se citar o reduzido número de genótipos os quais deram origem às atuais cultivares de café, além do sistema reprodutivo autógamo da espécie *C.*

arabica, o qual não favorece o surgimento de novas características (Lashermes et al., 1999). Uma vez que diferenças entre cultivares de *C. arabica* no nível de DNA são limitadas, um trabalho minucioso de geração e teste de novos marcadores moleculares de DNA torna-se de grande utilidade para a caracterização de cultivares.

2.3 Identidade genética e registro de cultivares

Desde a promulgação da Lei de Proteção de Cultivares (Brasil, 1997) no Brasil, tem havido um crescente interesse na caracterização de cultivares para fins de registro e proteção.

Em 2001 *C. arabica* foi incluída na lista brasileira de cultivares de espécies registradas, sendo que, atualmente, constam desta lista cultivares como Acaiá, Catuaí, Rubi, Topázio, Mundo Novo e Icatu, entre outras.

Para o registro e proteção de cultivares são necessárias informações sobre a identidade genética de cada cultivar, o que corresponde ao conjunto de características fenotípicas e genotípicas, as quais diferenciam uma cultivar das demais (Brasil, 1997).

No caso de cultivares de espécies de base genética estreita, para se provar que determinada cultivar é única, as informações genotípicas são mais adequadas e precisas do que apenas informações fenotípicas como os marcadores morfológicos.

Os descritores morfológicos utilizados na caracterização de cultivares de café estabelecidos no Registro Nacional de Cultivares (RNC) são: planta – formato, altura e diâmetro da copa; ramos – comprimento dos internódios, quantidade e posição do ramo plagiotrópico em relação aos ramos ortotrópicos, flexibilidade do ramo ortotrópico; folha – comprimento, forma, cor nas fases

jovem e adulta, presença de domácia, ondulação das bordas e sua intensidade, profundidade da nervura secundária e pubescência; inflorescência – quantidade por axila foliar, quantidade de flor por inflorescência, fertilidade do pólen, compatibilidade de cruzamento; fruto – tamanho, cor, presença de sépala, grau de aderência no ramo, teor de cafeína e suculência do fruto maduro; semente – comprimento, largura, espessura, tonalidade e aderência da película de cobertura, peso de 100 sementes; e, na fase adulta, são considerados ainda o ciclo até o aparecimento de 50% das flores e o ciclo até a primeira produção.

Apesar destes descritores serem úteis, eles não correspondem ao critério de estabilidade, uma vez que são afetados pelo ambiente, além de ser necessário um maior espaço físico e tempo para as avaliações. No caso de espécies perenes, como o café, essas últimas limitações são ainda mais relevantes, pois muitos descritores morfológicos são avaliados na planta adulta. Dessa forma, é importante a obtenção de marcadores mais estáveis para fins de caracterização e posterior registro e proteção de cultivares.

2.4 Marcadores microssatélite

Grande proporção do genoma dos organismos eucariotos é composta de seqüências repetitivas de DNA constituídas por um a quatro nucleotídeos repetidos em tandem (Tautz e Renz, 1984; Lewin, 1990). Cerca de 30% do DNA de *Drosophila* é repetitivo, enquanto que o percentual de repetição atinge 70% em tabaco e 50% em arroz (Lewin, 1990).

As seqüências SSR diferem no número e composição de nucleotídeos, podendo ser perfeitas (sem interrupções), imperfeitas (com interrupções) ou compostas (dois tipos de seqüências SSR adjacentes). Seqüências SSR constituídas pelo di-nucleotídeo CA são as mais comuns em mamíferos,

enquanto que, no genoma de plantas, seqüências do tipo AT são as mais comuns (Powell et al., 1996; Hamada et al., 1989). Além disso, no genoma de plantas as seqüências SSR são largamente distribuídas numa freqüência de uma a cada 50 mil pares de bases (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Em plantas, os marcadores SSR têm sido uma ferramenta muito útil e com diversas aplicações em estudos de caracterização de cultivares e análises de diversidade genética em espécies como milho, citros, palmito, coníferas, copaíba, rosa, oliveira, alface e tomate, entre outras (Smith et al., 1998; Kijas et al., 1995; Scotti et al., 2002; Esselink et al., 2003; Cipriani et al., 2002; Rafalski et al., 1996; Powell et al., 1996; He et al., 2003; Gaiotto, 2001; Padilha, 2002 e Ciampi, 1999). Além disso, os marcadores SSR também têm sido aplicados no mapeamento de genomas de arroz, milho e soja (Davierwala et al., 2001; Rongwen et al., 1995, Smith et al., 1998).

Os marcadores SSR possuem uma série de características as quais são responsáveis pelas suas diversas aplicações. Entre elas pode-se citar sua natureza codominante, o que torna possível a separação de indivíduos heterozigotos e homozigotos, e o multialelismo. Tais características tornam os marcadores SSR altamente polimórficos, possuindo o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) dentre todas as classes de marcadores moleculares. Além disso, os marcadores SSR são obtidos de forma simples por meio de amplificação via PCR e são altamente reproduzíveis e passíveis de automatização em sistemas multiplex, o que permite rapidez na avaliação de um grande número de genótipos e locos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Apesar de todas as vantagens apresentadas por esta classe de marcadores, a necessidade do conhecimento prévio do genoma da espécie para a qual se deseja desenvolver marcadores SSR é um fator limitante. O processo de obtenção de “primers” de SSR envolve a construção de bibliotecas genômicas

enriquecidas, transformação, clonagem, grande trabalho de seqüenciamento e desenho e teste dos “primers” para a identificação dos locos mais informativos.

Os “primers” de SSR, denominados locos na terminologia de marcadores moleculares, são desenhados a partir de seqüências de DNA flanqueadoras da região microsatélite. No momento da escolha das seqüências para o desenho dos “primers”, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a localização da região microsatélite, a qual não deve estar próxima das extremidades 5’ ou 3’, e o número de repetições dos elementos microsatélite, devendo os di-nucleotídeos estar repetidos no mínimo 10 vezes e tri-nucleotídeos seis vezes. Desenhados os “primers”, estes são testados e avaliados quanto ao polimorfismo e quanto a qualidade do padrão de bandas gerado. O tipo de microsatélite, ou seja, se constituído por elementos di, tri ou tetra-nucleotídeos, influencia a qualidade do padrão de bandas. Regiões SSR di-nucleotídeos geram bandas fantasmas ou “stutter bands”, o que compromete a visualização correta dos alelos (Testolin et al., 2000). Arens et al. (1995) sugerem uma avaliação da qualidade do padrão de bandas por meio de notas, sendo nota 1: bandas não ambíguas; nota 2: bandas fantasmas presentes, mas o padrão ainda é não ambíguo; nota 3: várias bandas de intensidade igual, o que dificulta a avaliação; nota 4: o aparecimento de bandas de tamanho não esperado; nota 5: o não aparecimento ou o aparecimento de bandas de fraca intensidade. Geralmente, regiões microsatélite de di-nucleotídeos não geram padrões de bandas de boa qualidade, contudo, são as mais abundantes em genomas de plantas, sendo muito maiores as chances de se encontrar polimorfismo (Morgante e Olivieri, 1993). Locos microsatélite di-nucleotídeos têm sido os mais polimórficos em diversas espécies como pessegueiro (Testolin et al., 2000), soja (Rongwen et al., 1995), milho (Smith et al., 1998) e café (Vascotto et al., 1999; Combes et al., 2000 e Anthony et al., 2002a e b).

O desenvolvimento de marcadores microssatélite é um processo trabalhoso e dispendioso, uma vez que requer pessoal especializado e equipamento sofisticado. Além disso, uma grande quantidade de material seqüenciado é desperdiçada, ou seja, muitos clones não contêm microssatélite e, dos que contêm, muitas seqüências não são úteis para o desenho de “primers”, pois não obedecem aos critérios de localização e número de repetições do elemento microssatélite. Ferreira e Grattapaglia (1998) sugerem um fator de seleção de um a cada seis, ou seja, de seis clones seqüenciados, apenas um possuirá seqüência útil para o desenho de “primers”. Weissenbach et al. (1992), citados ainda por Ferreira e Grattapaglia (1998), relatam que, no desenvolvimento de microssatélites para o mapeamento humano, de um total de 12.014 clones seqüenciados, somente 2.995 foram selecionados para o desenho - de “primers”. Após a obtenção dos “primers”, o número daqueles que serão polimórficos é reduzido, principalmente quando se trata de espécies de estreita base genética. Vascotto et al. (1999), que foram os primeiros a desenvolver marcadores microssatélite para café, relataram que apenas 0,2% dos clones obtidos geraram “primers” polimórficos.

Nos últimos anos, no entanto, o desenvolvimento de marcadores microssatélite tornou-se mais acessível devido às novas estratégias moleculares de enriquecimento de bibliotecas genômicas e à automatização e conseqüente barateamento da etapa de seqüenciamento (Powell et al., 1996). Sendo assim, marcadores microssatélite foram desenvolvidos para as mais diferentes espécies de plantas, como eucalipto (Brondani et al., 1998), copaíba (Ciampi, 1999), soja (Cregan et al., 1999), cevada (Ramsay et al., 2000), tomate (Vosman et al., 1992), alface (Van de Wiel et al., 1999), cana-de-açúcar (Cordeiro et al., 2000) e rosa (Esselink et al., 2003), entre outras.

Além do desenvolvimento de marcadores microssatélite estar mais acessível e menos dispendioso, a grande quantidade de informações genéticas

que podem ser obtidas por esse marcador eleva sua importância principalmente para espécies próximas geneticamente. Esselink et al. (2003) separaram 76 genótipos de rosa, utilizando 24 locos microssatélite, enquanto que em soja Rongwen et al. (1995) obtiveram a separação de 94 em 96 genótipos com apenas sete locos SSR.

Um outro fator que incentiva o desenvolvimento de marcadores microssatélite é a utilização desses marcadores para diferenciar espécies de um mesmo gênero. Combes et al. (1999) e Anthony et al. (2002b) relatam a obtenção de produtos amplificados em diferentes espécies do gênero *Coffea* como *C. canephora*, *C. liberica*, *C. congensis* e *C. eugenioides*, entre outras, com a utilização de “primers” de microssatélite desenvolvidos especificamente para *C. arabica*. Combes et al. (2000) também utilizaram os mesmos “primers” para amplificar DNA de plantas do gênero *Psilanthus*, o qual também pertence à família Rubiaceae, como o gênero *Coffea*.

Atualmente, existem 204 sequências microssatélite específicas de *C. arabica* disponíveis em banco de dados genéticos como o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Considerando que nem todas sejam úteis para o desenho de “primers”, é necessário a obtenção de novos marcadores microssatélite, os quais poderão ser de grande utilidade na caracterização de cultivares brasileiras de *C. arabica*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e extração do DNA

Foram utilizadas 19 cultivares de *C. arabica* de importância econômica no Brasil, sendo as sementes obtidas do banco de germoplasma da Universidade

Federal de Lavras, Universidade Federal de Viçosa, Instituto Agronômico de Campinas e Instituto Agronômico do Paraná. No caso da cultivar Catuaí Vermelho IAC 44, as folhas para construção das bibliotecas genômicas foram coletadas no campo experimental da Universidade Federal de Lavras. Seis híbridos indianos de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. liberica* foram incluídos no trabalho, sendo o DNA extraído de folhas liofilizadas. Esses materiais foram obtidos junto ao departamento de melhoramento do instituto holandês de pesquisas Plant Research International (PRI). A extração do DNA de todos os genótipos foi realizada utilizando-se um kit para extração de DNA da marca Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit), seguindo as instruções do fabricante. Os genótipos utilizados no trabalho e suas respectivas genealogias estão listados no Quadro 1.

QUADRO 1. Genealogia das 25 cultivares de café (*C. arabica* L.) analisadas. PRI, Wageningen-Holanda. Fonte: Mendes e Guimarães (1998).

| NÚMERO | NOME | OBTENTOR | GENEALOGIA |
|--------|---------------------------|----------|--|
| 1 | Acaia Cerrado | - | Seleção de Mundo Novo |
| 2 | Mundo Novo | - | Sumatra X Bourbon Vermelho |
| 3 | Obatã IAC 1669-20 | - | Seleção de Sarchimor ^a |
| 4 | Oeiras | - | Seleção de Caturra Vermelho X Híbrido do Timor |
| 5 | Ouro Verde | UFV | Seleção de Catuaí Amarelo e Mundo Novo |
| 6 | Rubi MG 1192 | UFLA | RC Catuaí Vermelho X Mundo Novo |
| 7 | Topázio | UFLA | RC Catuaí Amarelo X Mundo Novo |
| 8 | Bourbon Amarelo | IAC | Bourbon Vermelho X Amarelo de Botucatu |
| 9 | Bourbon Vermelho | IAC | Típica |
| 10 | Catuaí Amarelo | IAC | Seleção de Mundo Novo X Caturra Amarelo |
| 11 | Catuaí Vermelho IAC 44 | IAC | Seleção de Mundo Novo X Caturra Amarelo |
| 12 | Catuaí Amarelo 2SL | UFLA | Icatu Amarelo X Catuaí Vermelho |
| 13 | Catuaí Vermelho | UFLA | Icatu Vermelho X Catuaí Amarelo |
| 14 | Caturra Amarelo | IAC | Mutante de Bourbon Vermelho |
| 15 | Caturra Vermelho | IAC | Mutante de Bourbon Vermelho |
| 16 | IAPAR 59 | IAPAR | Seleção de Sarchimor ^a |
| 17 | Tupi IAC 1669-33 | UFLA | Seleção de Sarchimor ^a |
| 18 | Icatu Amarelo 3282 | UFLA | Bourbon Amarelo X Icatu Vermelho |
| 19 | Icatu Vermelho | UFLA | Bourbon Vermelho X <i>C. canephora</i> |
| 20 | H147/1 | PRI | <i>C. arabica</i> X <i>C. liberica</i> |
| 21 | 34/3-353-A5 | PRI | <i>C. arabica</i> X <i>C. liberica</i> |
| 22 | 832/1 | PRI | <i>C. arabica</i> X <i>C. canephora</i> |
| 23 | 1343/269 | PRI | <i>C. arabica</i> X <i>C. canephora</i> |
| 24 | 110/5 | PRI | <i>C. arabica</i> X <i>C. arábica</i> |
| 25 | H539/8 | PRI | <i>C. arabica</i> X <i>C. canephora</i> |

Fonte: Mendes e Guimarães (1998).

^a: Sarchimor = Villa Sarchi X Híbrido do Timor (*C. arabica* X *C. canephora*)

3.2 Busca de seqüências microssatélite publicadas para *C. arabica*

O banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foi utilizado na busca de seqüências SSR já publicadas para *C. arabica*.

Somente seqüências com a região SSR não localizada nas extremidades 5' ou 3' e com di-nucleotídeos repetidos no mínimo dez vezes e tri-nucleotídeos repetidos seis vezes, foram consideradas úteis para o desenho de “primers”.

Pares de “primers” “forward” e “reverse” foram desenhados nas regiões flanqueadoras da região SSR, sendo utilizado para tanto o programa DNASTar. No desenho dos “primers”, os seguintes parâmetros foram considerados: comprimento do “primer” como sendo 18 a 25 pares de bases (pb), temperatura de anelamento igual ou superior a 50°C, produtos da amplificação menores que 350 pb e a possível ocorrência de dímeros. Os “primers” desenvolvidos foram sintetizados pela empresa Eurogentec (Maastricht, Holanda).

3.3 Desenvolvimento de marcadores SSR

Os marcadores SSR foram desenvolvidos seguindo-se a metodologia de enriquecimento de bibliotecas genômicas proposta por Van de Wiel et al. (1999) com algumas modificações.

Para a construção das bibliotecas genômicas, inicialmente o DNA de folhas liofilizadas da cultivar arábica Catuaí Vermelho IAC-44 foi extraído utilizando-se o kit Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen). Após, o DNA foi digerido com as enzimas de restrição AluI, RsaI, MboI, TagI e MseI, os fragmentos foram separados em gel de agarose 1% e aqueles de 300 a 1000pb foram extraídos do gel e purificados utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen). Aos fragmentos extraídos do gel foram ligados adaptadores

no sítio de restrição das enzimas e, em seguida procedeu-se a purificação com o kit QIAquick PCR Cleanup Kit (Qiagen). Os produtos purificados foram separados em gel de agarose 1% e os fragmentos de 300 a 1000pb foram novamente extraídos do gel por meio do kit de extração anteriormente mencionado. Então, os fragmentos obtidos foram amplificados em termociclador MJ Research PTC-200 utilizando-se na reação 10mM de Tris HCl pH 9, 25mM de MgCl₂, 5mM de dNTP's, 10pmol de "primer" complementar aos adaptadores, 5 unidades (U) de Taq DNA polimerase GoldStar, 30 a 50ng de DNA e água MiliQ estéril para completar o volume da reação de 50µL. As condições de amplificação foram um ciclo de 2 minutos a 94°C, 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, trinta segundos a 55°C e dois minutos a 72°C, além de um último ciclo de dez minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados foram hibridizados com membranas individuais contendo os seguintes oligonucleotídeos sintéticos: TCT, TGT, GAG, GTG, TGA, AGT, CGT, GCT CT e GT. Procedeu-se, dessa forma, ao chamado enriquecimento da biblioteca genômica para as "motifs" TCT, TGT, GAG, GTG, TGA, AGT, CGT, GCT, CT e GT.

Para o isolamento de SSR, os fragmentos enriquecidos de DNA foram lavados com duas soluções de lavagem, as quais diferiram no nível de estringência: 0,5xSSC 1% de SDS, sendo essa uma solução de baixa estringência utilizada com a finalidade de remover fragmentos que continham longas regiões SSR, e solução 0,2xSSC 1% de SDS a qual corresponde à solução de alta estringência utilizada para remover fragmentos contendo regiões SSR curtas. A partir desse ponto, obtiveram-se duas bibliotecas genômicas enriquecidas, uma contendo os fragmentos obtidos com a solução de lavagem 0,5xSSC 1% de SDS, e uma segunda contendo os fragmentos obtidos pela lavagem com a solução 0,2xSSC 1% de SDS. Os fragmentos obtidos com as lavagens foram amplificados, sendo utilizadas as mesmas condições

anteriormente descritas, aumentando-se somente os ciclos de amplificação de 20 para 30. Em seguida, os fragmentos foram purificados por meio do kit de purificação de produtos de PCR anteriormente citado, ligados ao vetor plasmidial pGEM-T (Promega) e clonados em células competentes de *E.coli* (Stratagene). As células bacterianas transformadas com o DNA de *C. arabica* cresceram em placas contendo meio de cultura LB acrescido de carbemecilina, X-Gal e IPTG, incubadas, por uma noite, a 37°C. As colônias positivas (brancas) foram transferidas para placas contendo meio de cultura líquido e incubadas a 37°C, por uma noite. Os clones positivos foram transferidos para membranas de nylon (Hybond N+membranes, Amershan Biosciences), e estas colocadas em placas contendo meio de cultura LB por uma noite a 37°C. Para promover a fixação das colônias nas membranas, essas foram deixadas por cinco minutos em solução de tampão denaturante, cinco minutos em solução de tampão neutralizador, cinco minutos em solução 2xSSC e, finalmente, expostas à luz ultravioleta por 5 segundos, num processo conhecido como “cross link”. As membranas, então, foram hibridizadas com os oligonucleotídeos sintéticos TCT, TGT, GAG, GTG, TGA, AGT, CGT, GCT, CT e GT marcados com radioatividade, em solução de hibridização 5xSSC, 0,1% de sarcosil, 0,02% de SDS e 1% de reagente bloqueador, para a detecção das colônias recombinantes.

A visualização dos clones positivos nas membranas obtidas na primeira biblioteca genômica foi realizada por meio de um scanner e, nos clones obtidos na segunda biblioteca genômica, por meio de filmes de raio-X. Os clones positivos foram transferidos para placa contendo meio de cultura líquido com ampicilina e incubadas a 37°C por uma noite. Em seguida, o DNA plasmidial de cada clone foi purificado utilizando-se o sistema Miniprep (Qiagen), e digerido com a enzima de restrição EcoRI para que se pudesse determinar o tamanho aproximado do inserto. O seqüenciamento dos clones positivos foi realizado em seqüenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems), utilizando-se o

método “Big Dye Terminator”. As seqüências foram analisadas pelo programa Genotyper e aquelas contendo regiões SSR que atendiam aos critérios de localização e número de repetições foram utilizadas para o desenho de “primers”. O programa DNASTAR foi utilizado para desenhar os pares de “primers” “forward” e “reverse” complementares às regiões flanqueadoras do SSR. Quando duas regiões SSR foram encontradas num mesmo clone, havendo espaço suficiente para o desenho das seqüências “forward” e “reverse”, dois pares de “primers” foram desenhados. Os primers foram sintetizados pela Eurogentec (Maastricht, Holanda).

3.4 Amplificação dos locos SSR e eletroforese

Os pares de “primers” obtidos nas duas bibliotecas genômicas, os desenhados a partir das seqüências SSR publicadas para *C. arabica* no banco de dados NCBI e os publicados por Combes et al. (2000) foram amplificados via PCR. A reação foi constituída de 10mM de Tris HCl pH 9, 25mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 2pmol de cada “primer”, 5 unidades (U) de Taq DNA polimerase GoldStar, 16ng de DNA genômico de cada um dos genótipos em estudo e água MiliQ estéril para completar o volume da reação de 20µL. A mesma reação de PCR foi utilizada para amplificar os microssatélites no DNA de cloroplasto (cpDNA). As reações de PCR foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-200, programado para um ciclo de três minutos a 94°C, 30 ciclos de trinta segundos a 94°C, trinta segundos na temperatura de anelamento dos “primers” que variou de 50°C a 56°C, 45 segundos a 72°C e um último ciclo de dez minutos a 72°C. Para o genoma de cloroplastos, as condições de amplificação foram 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, um minuto a 50°C e um minuto a 72°C, e um último ciclo de dez minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídeo. Os locos que amplificaram tiveram seus produtos separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, utilizando-se, para tanto, o sistema Sequi-Gen Sequencing Cell (BioRad), constituído pela cuba, uma placa de vidro e outra de acrílico, a qual recebeu o tampão de corrida TBE. Ambas as placas foram cuidadosamente lavadas com água deionizada e etanol 95%. A placa de vidro foi tratada com solução constituída por etanol 95%, 0,5% de ácido acético e 0,5% de Bind Silane, sendo o volume final da solução 1mL. A solução foi espalhada sobre a placa de vidro com o auxílio de papel toalha e após cinco minutos foi feita a limpeza da superfície da mesma com etanol e papel toalha por três vezes. A placa de acrílico foi tratada com um a dois mililitros de SigmaCote aplicado com o auxílio de papel toalha, e o excesso removido, após dez minutos, também com papel toalha. A montagem da placa e o preparo do gel foram realizados no dia anterior a cada corrida eletroforética.

O preparo das amostras para aplicação no gel consistiu na adição de tampão desnaturante de uréia na proporção 1:1 e desnaturação à 80°C por cinco minutos. Em seguida, 1,5 a 2µL de cada amostra foram aplicados no gel, sendo as condições de corrida de 100W por uma a três horas.

Após a corrida, o gel aderido à placa de vidro foi corado com prata, seguindo-se o protocolo proposto pela Promega e sugerido por Esselink et al. (2002). Para tanto, o gel foi fixado em solução de ácido acético glacial 10% por 20 minutos, sob agitação. Em seguida, o gel foi lavado três vezes em água ultra pura, sob agitação, e transferido para a solução de coloração 1% de nitrato de prata, 1,5% de formaldeído 37% colocado no momento da revelação, sendo deixado por 30 minutos também sob agitação. A revelação foi realizada em câmara fria (10°C), sendo o gel lavado em água ultra pura gelada por cerca de 15 segundos e imediatamente colocado em solução reveladora constituída de 3% de

carbonato de sódio, 0,15% de formaldeído 37% e 0,02% de tiosulfato de sódio, sendo estes dois últimos colocados no momento da revelação. A solução reveladora foi preparada um dia antes, colocada em frasco escuro e na geladeira. O gel permaneceu na solução reveladora, sob agitação, até que as bandas pudessem ser visualizadas, o que levou cerca de cinco a oito minutos. Então, o gel foi colocado novamente na solução fixadora por três minutos para finalizar a reação reveladora. Em seguida, o gel foi lavado duas vezes em água ultra pura, por cinco minutos sob agitação e colocado para secar.

Os géis foram avaliados quanto ao polimorfismo dos fragmentos amplificados e quanto à qualidade do padrão de bandas, como proposto por Arens et al. (1995), sendo nota 1: bandas não ambíguas; nota 2: bandas fantasmas presentes, mas o padrão ainda é não ambíguo; nota 3: várias bandas de intensidade igual, o que dificulta a avaliação; nota 4: o aparecimento de bandas de tamanho não esperado; nota 5: o não aparecimento ou o aparecimento de bandas de fraca intensidade.

3.5 Avaliação de fragmentos de tamanho não esperado

Fragmentos de tamanho não esperado mas constituindo padrões de boa qualidade foram analisadas com o objetivo de se verificar se eram alelos de um mesmo loco ou alelos de um outro loco. Para tanto, adicionaram-se três microlitros de água MiliQ estéril sobre os referidos fragmentos ainda no gel de poliacrilamida corado com prata. Os fragmentos foram extraídas do gel e transferidos para microtubos. Adicionaram-se 23 μ L de TE⁻⁴, os microtubos foram fervidos por cinco minutos, resfriados em gelo e dois microlitros de cada solução foram utilizados para PCR. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,7%, os fragmentos de interesse foram extraídos, purificados

por meio do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), reamplificados e os produtos seqüenciados de acordo com o método “Big Dye Terminator”.

3.6 Análise dos dados

A avaliação dos géis constou da observação da presença e ausência de bandas, designadas respectivamente por 1 e 0. Foi construída uma matriz de 0 e 1 e a estimativa da similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, representado pela seguinte expressão:

$$\text{Coeficiente de Jaccard: } S_{gij} = \frac{a}{a + b + c}, \text{ sendo:}$$

a = presença da banda em ambos os genótipos i e j,

b = presença da banda no indivíduo i e ausência no indivíduo j,

c = ausência da banda no indivíduo i e presença no indivíduo j.

Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (Unweighted pair-Group Method), utilizando-se o programa NTSYS versão 2.1 (Rohlf, 1992).

A consistência do dendrograma obtido foi avaliada pelo método de “bootstrap”, utilizando-se no mínimo 10.000 bootstraps. Os cálculos de consistência foram realizados pelo programa BOOD versão 3.1 (Coelho, 2001).

A correlação de Pearson foi calculada utilizando-se o programa GENES (Cruz, 2001), com o objetivo de se verificar quanto a matriz de similaridade genética e o dendrograma obtido se ajustam. Para tanto, a matriz de similaridade genética foi transformada em uma matriz de distâncias genéticas, sendo cada

valor subtraído de 1, e então comparada com a matriz das distâncias genéticas medidas no dendrograma.

Para a obtenção da linha de corte no dendrograma, o erro (sgs) associado a cada similaridade genética foi calculado pela fórmula (Hagiwara et al., 2001):

$$S_{gs} = [g_{s_{ij}} * (1-g_{s_{ij}}) / (n-1)] * 0,5, \text{ sendo:}$$

- sgs = erro
- $g_{s_{ij}}$ = similaridade genética
- n = número total de bandas polimórficas obtidas

Após, o valor da linha de corte (gsn) foi calculado aplicando-se o erro médio na seguinte fórmula:

$$gsn = 1 - (t_{x\%} * \text{erro médio}), \text{ sendo:}$$

- gsn = valor da linha de corte
- $t_{x\%}$ = valor de t com n-2 graus de liberdade

Para os locos polimórficos foram calculados o número total e número médio de alelos por loco, como também a frequência de cada alelo, pela seguinte expressão (Hartl e Clark, 1997):

$$P_{ij} = \frac{n_{ij}}{n_j}, \text{ sendo:}$$

- p_{ij} = frequência do alelo i na população j,
- n_{ij} = número de ocorrência do alelo i na população j,
- n_j = número total de alelos amostrados na população j.

Com o objetivo de quantificar o poder discriminatório dos marcadores SSR, o número de fenótipos alélicos foi contado e o número efetivo de alelos (n_e) calculado pela seguinte expressão (Hartl e Clark, 1997):

$$ne = \frac{1}{D}, \text{ sendo:}$$

ne = número efetivo de alelos,

$$D = \sum \left(\frac{E}{F} \right)^2, \text{ sendo:}$$

E = número total de genótipos com cada alelo do loco x.

F = número total de alelos do loco x em todos os genótipos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Busca de seqüências SSR publicadas para *C. arabica*

Foram encontradas 204 seqüências SSR publicadas para *C. arabica* no banco de dados NCBI. Dessas, 31 publicadas por Cristancho et al. (2002) e 26 publicadas por Rovelli et al. (2001) atenderam aos critérios de localização e número de repetições da região SSR, sendo utilizadas para o desenho de “primers”.

Seis “primers” de SSR específicos de *C. arabica* publicados por Combes et al. (2000) foram sintetizados e utilizados no presente trabalho, como também 13 “primers” que amplificam microssatélites do DNA de cloroplasto.

4.2 Bibliotecas genômicas enriquecidas

Para a construção das bibliotecas genômicas enriquecidas foram utilizados somente os fragmentos obtidos pela digestão do DNA de folhas da cultivar Catuaí Vermelho IAC-44 pelas enzimas de restrição AluI, RsaI, MboI e

TagI, os quais apresentaram-se no tamanho ideal de 300 a 1000pb. Os fragmentos obtidos pela digestão com a enzima MseI não foram utilizados, pois não corresponderam à faixa de tamanho desejado.

Os resultados do enriquecimento das duas bibliotecas genômicas estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Caracterização de duas bibliotecas genômicas (BG), obtidas em condições de baixa (1^a) e alta (2^a) estringência. (SSR: microssatélite; P: seqüência perfeita; I:seqüência imperfeita; C: seqüência composta; PD: número de “primers” desenhados; PP: número de “primers” polimórficos). PRI, Wageningen, Holanda, 2003.

| BG | Clones recombinantes | Clones + | Clones seqüenciados | SSR | SSR +comum | SSR P:I:C | PD | PP |
|----------------|----------------------|----------|---------------------|-----|------------|-----------|----|----|
| 1 ^a | 3.572 | 135 | 110 | 45 | GT | P = I > C | 18 | 2 |
| 2 ^a | 3.840 | 397 | 192 | 89 | GT | P > I = C | 35 | 5 |

No primeiro processo de enriquecimento, quando se utilizou solução de lavagem de baixa estringência, 3.572 clones recombinantes foram obtidos, 135 desses reagiram positivamente após a hibridização com os respectivos oligonucleotídeos sintéticos marcados com radioatividade, sendo que 45 clones (33%) continham repetições SSR, das quais 46% eram repetições perfeitas e imperfeitas e apenas 8% eram compostas. Dezoito clones possuíam seqüências que atendiam aos critérios de localização e número de repetições da região SSR para o desenho de “primers”.

No segundo processo de enriquecimento, quando se utilizou solução de lavagem de alta estringência, 3.840 clones recombinantes foram obtidos, 397 reagiram positivamente após a hibridização com os respectivos oligonucleotídeos sintéticos marcados com radioatividade, sendo que 22% clones continham repetições SSR, das quais 57% eram repetições perfeitas, 33%

imperfeitas e 10% compostas. Trinta e cinco clones continham regiões SSR de tamanho e localização adequados para o desenho de “primers”.

As repetições SSR compostas que ocorreram nas duas bibliotecas genômicas eram constituídas de seqüências dos tipos CCA/TCA e TGA/GAA.

Em termos de eficiência, na segunda biblioteca genômica enriquecida foi obtido um maior número de clones positivos contendo SSR perfeitos. Mesmo o SSR sendo bastante longo, ainda foi possível o desenho de “primers”. O número de clones que reagiram positivamente na hibridização com os oligonucleotídeos sintéticos marcados com radioatividade também foi maior no segundo enriquecimento. Provavelmente, isso pode ser devido à ocorrência natural de SSR longos no genoma do café.

Apesar de terem sido utilizadas dez “motifs” diferentes (TCT, TGT, GAG, GTG, TGA, AGT, CGT, GCT CT e GT) para o enriquecimento das bibliotecas genômicas, não foram encontradas repetições SSR dos tipos TCT, GAG, AGT, CGT e GCT. A repetição SSR mais comum nas duas bibliotecas genômicas enriquecidas foi GT, seguida de TGA. A elevada ocorrência da repetição GT está de acordo com o que foi observado por Vascotto et al. (1999), num prévio trabalho de desenvolvimento de marcadores SSR para *C. arabica*, e também com as seqüências SSR já publicadas. Ruas et al. (2003), estudando a variabilidade genética entre espécies de *Coffea* por meio do marcador ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), observaram que a repetição SSR (GA)_nT combinada com outros di, tri e tetra nucleotídeos produziram o maior número de fragmentos de DNA, sendo esses, na maioria, polimórficos. Segundo os mesmos autores, a elevada freqüência da repetição GA sugere que esta é bastante comum no genoma do café. Sabe-se que este tipo de SSR é muito comum em plantas (Morgante e Olivieri, 1993).

Em relação à repetição TGA, Esselink et al. (2003), desenvolvendo marcadores SSR para rosa, relataram uma elevada freqüência da referida

repetição. Por outro lado, o número de clones isolados em *Arabidopsis thaliana*, cana-de-açúcar e *Populus nigra* contendo esta repetição foi muito baixo (Depeiges et al., 1995; Cordeiro et al., 2000; Van der Schoot et al., 2000).

Foi observada a ocorrência de clones contendo SSR diferentes daqueles utilizados no enriquecimento das bibliotecas genômicas. Microsatélites do tipo GGA foram encontrados, sendo o SSR mais comum depois de GT e TGA.

A ocorrência de diferentes clones contendo a mesma seqüência é comum na construção de bibliotecas genômicas. Tais clones são denominados redundantes ou duplicatas. Na primeira biblioteca genômica enriquecida foram observados dois clones redundantes, enquanto na segunda, 14 clones redundantes, correspondendo a cerca de 10% dos clones obtidos. Clones redundantes também foram encontrados por Vascotto et al. (1999) em café, por He et al. (2003) e tomate, e por Esselink et al. (2003) em rosa. O aparecimento de clones redundantes em trabalhos de construção de bibliotecas genômicas pode significar uma ampla cobertura do genoma em estudo. Segundo Fernandez e Lashermes (2002), o tamanho do genoma de *C. arabica* está estimado em cerca de 1200Mb, sendo considerado pequeno quando comparado a outras espécies. Dessa forma, pela ocorrência de 10% de clones redundantes, e sendo o genoma de *C. arabica* relativamente pequeno, supõem-se que o genoma da referida espécie tenha sido bem representado pelos “primers” desenvolvidos no presente trabalho.

Um total de 54 novos pares de “primers” de SSR foi obtido com a construção das duas bibliotecas genômicas enriquecidas. Desses, 26 pares flanquearam repetições SSR de di-nucleotídeos, 23 repetições de tri-nucleotídeos e cinco repetições de tetra-nucleotídeos, sendo esses últimos obtidos somente no primeiro enriquecimento. As repetições SSR de tetra-nucleotídeos encontradas foram do tipo ACTC, GAAA e AAGG, mas numa

freqüência muito baixa, tendo somente seis dos clones seqüenciados apresentado regiões SSR desse tipo.

De maneira geral, a metodologia para desenvolvimento de marcadores SSR utilizada no presente trabalho, empregada em outras espécies, como tomate, alface e rosa (Vosman e Arens, 1997; Van de Wiel et al., 1999; Esselink et al., 2003), entre outras, foi eficiente também para *C. arabica*. As estratégias moleculares para o enriquecimento de bibliotecas genômicas já estão bem definidas e entendidas, sendo possível o desenvolvimento de locos SSR para qualquer espécie de forma eficiente e rápida.

4.3 Caracterização dos locos SSR

Do total de 140 locos SSR avaliados nos 25 genótipos de *C. arabica*, 54 locos foram desenvolvidos a partir das duas bibliotecas genômicas, como mencionado anteriormente e 67 locos foram desenhados a partir de seqüências SSR específicas para *C. arabica* publicadas no banco de dados NCBI. Além desses, seis locos publicados por Combes et al. (2000) e 13 locos de cpDNA foram utilizados.

A grande maioria dos locos baseados no DNA nuclear flanqueou regiões SSR do di-nucleotídeo GT, enquanto que os locos de cpDNA flanquearam regiões do nucleotídeo adenina (A).

Um total de 135 locos gerou produtos amplificados, sendo 22 polimórficos (Tabela 2). Desses, sete foram obtidos do enriquecimento das bibliotecas genômicas, o que corresponde a 0,1% dos clones obtidos. Essa baixa freqüência de locos polimórficos está de acordo com o obtido por Vascotto et al. (1999), os quais desenvolveram marcadores SSR específicos para *C. arabica* e relatam que apenas 0,2% do total de clones obtidos geraram locos polimórficos.

TABELA 2. Características dos 22 locos SSR polimórficos em *C. arabica* (TA: temperatura de anelamento; pb: pares de bases). PRI, Wageningen, Holanda, 2003.

| Marcador SSR | Seqüência SSR | TA | pb | Qualidade bandas | Nº.de alelos | Nº. efetivo de alelos | Fenótipos alélicos |
|-----------------------|---|----|-----|------------------|--------------|-----------------------|--------------------|
| M20 ^a | (GA) ₅ (GT) ₈ TT(GT) ₄ TT(GT) ₇ (GA) ₁₁ (TC) ₂ (CT) ₃ GT | 55 | 270 | 1 | 4 | 1,3 | 4 |
| M24 ^a | (CA) ₁₅ (CG) ₄ CA | 55 | 180 | 2 | 4 | 1,9 | 6 |
| 119-5CTG ^b | (GT) ₁₀₋₁ | 52 | 170 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 62-6CTG ^b | (GA) ₆₋₁ (GT) ₉₋₁ | 53 | 250 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 49-6CTG ^b | (GA) ₇ (GGGA) ₅ (GT) ₈₋₁ | 53 | 250 | 2 | 3 | 1,1 | 2 |
| 45-6CTG ^b | (TC) ₂₄₋₅ (TG) ₉₋₁ | 53 | 300 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 39 ^c | (GA) ₁₄ | 53 | 349 | 2 | 3 | 1 | 2 |
| 47 ^c | (GA) ₁₃₋₁ | 53 | 451 | 1 | 3 | 1,9 | 4 |
| 53 ^c | (TC) ₂₄₋₅ | 50 | 321 | 1 | 3 | 1,8 | 2 |
| 59 ^c | (CT) ₂₈ | 50 | 216 | 2 | 7 | 3,9 | 6 |
| 63 ^c | (GA) ₁₂ | 53 | 279 | 1 | 3 | 1,4 | 3 |
| GTG10 ^d | (GT) ₁₀₋₃ | 54 | 293 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| CTT ^d | (CTT) ₈₋₂ (TA) ₁₀₋₂ | 50 | 198 | 1 | 3 | 1 | 2 |
| 6 ^e | (GA) ₂₄ | 56 | 312 | 2 | 7 | 1,8 | 5 |
| 10 ^e | (GA) ₂₄ | 53 | 405 | 1 | 3 | 1,2 | 3 |
| 15 ^e | (TC) ₂₀₋₂ | 55 | 191 | 2 | 4 | 1,5 | 3 |
| 17 ^e | (CT) ₁₀₋₂ | 56 | 302 | 1 | 5 | 3,4 | 6 |
| 20 ^e | (TC) ₁₂₋₄ | 54 | 293 | 2 | 7 | 1,8 | 7 |
| Ccmp3 ^f | (A) _n | 50 | 200 | 1 | 3 | 1 | 2 |
| Ccmp6 ^f | (A) _n | 50 | 200 | 2 | 2 | 1,2 | 2 |
| Ccmp10 ^f | (A) _n | 50 | 100 | 1 | 3 | 1 | 2 |
| NTCP8 ^f | (A) _n | 50 | 300 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| Total alelos | | | | | 77 | | |
| No. Médio alelos/loco | | | | | 3,5 | | |

^a: “primers” publicados por Combes et al. (2000); ^b: primers desenvolvidos a partir de seqüências publicadas por Rovelli et al. (2001); ^c: “primers” desenvolvidos a partir de seqüências publicadas por Cristancho et al. (2002); ^d e ^e: “primers” obtidos do enriquecimento das bibliotecas genômicas; ^f: marcadores de cpDNA

Os mesmos autores atribuíram a reduzida frequência de locos polimórficos ao fato do café possuir uma estreita base genética, sendo mais difícil a obtenção de polimorfismo.

Maior grau de polimorfismo associado aos SSR de di-nucleotídeos foi relatado para muitas espécies, como soja (Rongwen et al., 1996), milho (Smith et al., 1998), pessegueiro (Testolin et al., 2000), e também para o café (Vascotto et al., 1999; Combes et al., 2000; Anthony et al., 2002a e b). Apesar de locos SSR flanqueando repetições de di-nucleotídeos estarem relacionados com o aparecimento de bandas fantasmas, todos os 22 locos polimórficos obtidos no presente trabalho, os quais flanqueavam repetições de di-nucleotídeos, produziram padrões de bandas de boa qualidade, sendo atribuídas notas 1 e 2, como proposto por Arens et al. (1995) (Tabela 2).

Um total de 77 alelos foi detectado pelos 22 locos polimórficos, tendo o número de alelos por loco variado de dois a sete e o número médio de alelos por loco foi de 3,5. Ao avaliarem a diversidade genética por meio de marcadores SSR em café, Vascotto et al. (1999) detectaram de dois a cinco alelos por loco, enquanto que Anthony et al. (2002a) detectaram exatamente de dois a sete alelos por loco.

4.4 Variação alélica

Os perfis alélicos gerados pelos 22 locos SSR polimórficos para as 25 cultivares de café, e também as frequências alélicas (P_{ij}) de cada alelo, estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3. Perfis alélicos das 25 cultivares de café, gerados pelos 22 locos SSR polimórficos, e frequências alélicas (Pij). (1: Acaiá Cerrado; 2: Mundo Novo; 3: Obatã; 4: Oeiras; 5: Ouro Verde; 6: Rubi; 7: Topázio; 8 e 9: Bourbon Amarelo e Vermelho; 10 e 11: Catuaí Amarelo e Vermelho; 12 e 13: Catucaí Amarelo e Vermelho; 14 e 15: Caturra Amarelo e Vermelho; 16: IAPAR 59; 17: Tupi; 18 e 19: Icatu Amarelo e Vermelho; 20 e 21: *C. arabica* X *C. liberica*; 22, 23 e 25: *C. arabica* X *C. canephora*; 24: *C. arabica*, \pm : alelos específicos para cultivares brasileiras) PRI, Wageningen, Holanda, 2003.

| Loco SSR | Alelo | 1, 2 | 3, 15 | 4, 10, 11, 14 | 5, 6, 7 | 8 | 9 | 12, 13 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | Pij |
|----------|-------|------|-------|---------------|---------|---|---|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
| 53 | 1 | | | | | | | | | | + | + | + | + | + | + | + | + | 4 |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | | | | | | 8,5 |
| M20 | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | 8 |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | | + | | | | 0,3 |
| | 3 | | | | | | | | | | | | + | | | | + | + | 1 |
| 59 | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | | + | + | | | + | | 2,9 |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | | + | + | | | + | | 2,9 |
| | 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | | | + | | 3 |
| | 4 | | | | | | + | | | | | | | | | | | | 0,14 |
| | 5 | | | | | | | | | + | | | | | + | + | | | 0,42 |
| | 6 | | | | | | | | | + | | | | | + | + | | | 0,42 |
| | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | + | 0,14 |
| 63 | 1 | | | | | | | | + | + | | | | | + | + | | + | 2,5 |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | | | + | + | + | + | + | | + | + | 11 |

Continua...

| ...Continuação | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|---|---|---|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|------|
| 47 | 1 | | + | | + | | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 6,3 | |
| | 2 | + | | | | + | | | + | + | | | | | | | | | 3 | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | | + | | | 0,3 | |
| M24 | 1 | + | + | | + | | | + | + | + | + | + | + | + | | | | + | 5 | |
| | 2 | | | | | | | + | | | | | + | | | | | + | 1 | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | + | | | | + | 0,5 | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | + | 0,5 | |
| 39 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | + | 1 | | |
| GTG10 | 1 | + | + | | + | | + | + | + | | | | + | + | + | + | + | + | 22 | |
| CTT | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | + | 3 | |
| 10 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | + | 1 | |
| | 2 | + | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 12 | |
| 20 | 1 | + | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 3,3 | |
| | 2 | | | | | | | | | | | + | | | | | | + | 0,28 | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | + | | | | | | 0,14 | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | + | + | | | | 0,28 | |
| | 5 | | | | | | | | | | | | | + | | | | + | 0,28 | |
| | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | 0,14 |
| | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | 0,14 |
| 17 | 1 | + | + | | + | | + | + | + | + | + | + | | | | | + | + | 4,4 | |

Continua...

| ...Continuação | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|---|---|---|--|---|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|
| | 2 | + | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 4,8 |
| | 3 | | | | | | | | | | | + | | | | | | | 0,2 |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | + | | | | + | 0,6 |
| | 5 | + | + | | + | | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | 4,8 |
| 15 | 1 | + | + | | + | | + | + | + | + | | + | + | | | | | + | 10 |
| | 2 | | | | | | | | | | | + | + | | | | + | + | 2,5 |
| 119 | 1 | + | + | | | | | | | | | + | + | + | + | + | + | + | 12 |
| 62-6 | 1 | + | + | | + | | + | + | + | + | | + | + | + | + | | | + | 23 |
| 49-6 | 1 | | | | | | | | | | | | | | + | | | | 0,5 |
| | 2 | + | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + | | | + | + | + | 12 |
| 45-6 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | + | | | 1 |
| 6 | 1 | | | | | | | | + | | | | + | | | | + | + | 1 |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | + | | | | + | 0,4 |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | + | | | | 0,2 |
| | 4 | + | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | 4,8 |
| | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | + | 0,2 |
| cmp3 | 1 | | | | | | | | | | | | | + | + | | | | 2 |
| cmp6 | 1 | | | | | | | | | | | | | + | + | | | | 1 |
| | 2 | + | + | | + | | + | + | + | + | + | + | | | | + | + | + | 11,5 |
| cmp10 | 1 | | | | | | | | | | | | | + | + | | | | 2 |
| NTCP8 | 1 | | | | | | | | | | | | | + | | | | | 1 |

A amplificação de diferentes alelos como também a ausência de amplificação foram úteis para a diferenciação das cultivares, sendo obtidos 17 perfis alélicos diferentes.

Na Tabela 3, observa-se que a variação alélica entre as cultivares brasileiras de *C. arabica* foi muito menor. Os 22 locos SSR polimórficos geraram somente 11 perfis alélicos diferentes entre as 19 cultivares brasileiras, sendo detectados quatro alelos específicos, enquanto que, para cada um dos seis híbridos indianos, foi obtido um perfil alélico diferente e 10 alelos específicos puderam ser detectados.

Os locos 59 e 17 foram os mais discriminativos, ambos apresentando seis fenótipos alélicos e número efetivo de alelos de 3,9 e 3,4, respectivamente (Tabela 2), além de amplificarem alelos específicos das cultivares Bourbon Vermelho e Icatu Vermelho. Os locos 39 e 20 também amplificaram alelos específicos da cultivar Icatu Vermelho. Por meio dos locos 59, 47, M-24, 39, 20, 17, 15 e 6, foi possível a separação das cultivares Icatu Amarelo e Vermelho. Comparando-se os perfis alélicos dessas duas cultivares com os das demais cultivares brasileiras, pôde-se notar uma maior variação alélica, o que provavelmente, se deve à presença de *C. canephora* na genealogia da cultivar Icatu Vermelho, o que provavelmente contribuiu para ampliar a base genética da referida cultivar.

Os diferentes perfis alélicos gerados pelos locos 59 e M-24 permitiram a diferenciação das cultivares Bourbon Amarelo e Vermelho. Anthony et al. (2002b) relataram que o loco M-24 possibilitou a separação de acessos de Bourbon.

Alguns alelos específicos dos híbridos indianos foram amplificados quando se utilizou os locos de cpDNA ccmp3, ccmp10 e NTCP8 (Tabela 3). Isto confirmou que marcadores desenvolvidos a partir do DNA de cloroplasto podem detectar polimorfismo interespecífico, uma vez que *C. canephora* e *C. liberica*

estão presentes nas genealogias de alguns desses híbridos. Resultado semelhante foi obtido por Orozco-Castillo et al. (1996) e Cros et al. (1998), estudando a relação taxonômica dentro do gênero *Coffea* por meio de marcadores de cpDNA.

A remoção dos dados obtidos pelos marcadores de cpDNA não alterou o agrupamento das 25 cultivares de café obtido no presente trabalho, o que mostra que os alelos específicos de *C. canephora* e *C. liberica* provavelmente foram detectados também pelos marcadores desenvolvidos a partir do DNA nuclear.

Ainda na Tabela 3, pode-se observar que a maioria dos alelos (40%) apresentou frequência alélica entre 0,14 e 0,6, indicando a ocorrência de alelos raros entre as 25 cultivares de café estudadas. A abundância de alelos com baixa frequência contribui para aumentar os valores da diversidade dos locos (Elsik et al., 2000 citado por Padilha, 2002). Dessa forma, os locos que apresentaram alelos específicos tanto para as cultivares brasileiras quanto para os híbridos indianos foram aqueles com menor frequência alélica e mais discriminativos, como os locos 59 e 17.

A obtenção de um marcador específico para determinada cultivar de *C. arabica* é relativamente difícil devido à estreita base genética da referida espécie, o que torna a caracterização de cultivares de café um desafio mesmo por marcadores moleculares.

Entre as cultivares brasileiras, o loco 59 foi o mais discriminativo, uma vez que cinco fenótipos alélicos foram gerados entre as cultivares brasileiras, sendo que Bourbon Vermelho, Tupi, Icatu Amarelo e Vermelho foram separadas das demais cultivares. O loco 17, o qual foi desenvolvido no presente trabalho, possibilitou a separação das cultivares Icatu Amarelo e Vermelho, as quais estão entre as mais cultivadas no Brasil. Doze locos permitiram a discriminação de 11 das 19 cultivares brasileiras de *C. arabica*.

4.5 Caracterização das cultivares de café

O valor médio de similaridade genética entre as 25 cultivares de café foi de 0,928, o maior valor (1,000) foi observado entre as cultivares Ouro Verde, Rubi e Topázio, e entre Oeiras, Caturra Amarelo, Catuaí Amarelo e Vermelho. O menor valor observado foi entre um dos híbridos indianos de *C. arabica* e a cultivar Tupi (0,190) (Tabela 4).

Pelo dendrograma obtido, as cultivares foram separadas em dois grupos, um contendo a maioria das cultivares brasileiras e sendo um grupo coeso com um valor de bootstrap (BS) igual a 81,7%, e um segundo grupo contendo os híbridos indianos e algumas cultivares brasileiras, sendo esse menos coeso com um valor de bootstrap (BS) menor que 50% (Figura 1). Essa separação pode ser explicada pela presença de outras espécies como *C. canephora* e *C. liberica*, na genealogia dos híbridos indianos (Quadro 1).

A correlação de Pearson entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi de $r=0,434$. Apesar da baixa correlação, os coeficientes de similaridade e os agrupamentos gerados no dendrograma estão de acordo com a genealogia das cultivares.

TABELA 4. Similaridades genéticas, calculadas pelo coeficiente de Jaccard, entre as 25 cultivares de café (1: Acaiaí Cerrado; 2: Mundo Novo; 3: Obatã; 4: Oeiras; 5: Ouro Verde; 6: Rubi; 7: Topázio; 8 e 9: Bourbon Amarelo e Vermelho; 10 e 11: Catuai Amarelo e Vermelho; 12 e 13: Catucaí Amarelo e Vermelho; 14 e 15: Caturra Amarelo e Vermelho; 16: IAPAR 59; 17: Tupi; 18 e 19: Icatu Amarelo e Vermelho; 20 e 21: *C. arabica* X *C. liberica*; 22, 23 e 25: *C. arabica* X *C. canephora*; 24: *C. arabica*) PRI, Wageningen, Holanda, 2003.

| C | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | | |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|--|--|
| 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0,86 | 0,86 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0,86 | 0,86 | 0,90 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0,95 | 0,95 | 0,81 | 0,90 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 0,95 | 0,95 | 0,81 | 0,90 | 1,00 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 0,95 | 0,95 | 0,81 | 0,90 | 1,00 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 0,77 | 0,77 | 0,81 | 0,90 | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 0,82 | 0,82 | 0,86 | 0,95 | 0,86 | 0,86 | 0,86 | 0,86 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 0,86 | 0,86 | 0,90 | 1,00 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,95 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 0,86 | 0,86 | 0,90 | 1,00 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,95 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 0,86 | 0,86 | 0,82 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,82 | 0,86 | 0,90 | 0,90 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | 0,86 | 0,86 | 0,82 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,82 | 0,86 | 0,90 | 0,90 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 0,86 | 0,86 | 0,90 | 1,00 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,95 | 1,00 | 1,00 | 0,90 | 0,90 | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 0,90 | 0,90 | 0,95 | 0,95 | 0,86 | 0,86 | 0,86 | 0,86 | 0,86 | 0,90 | 0,95 | 0,86 | 0,86 | 0,95 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 0,77 | 0,77 | 0,77 | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 0,73 | 0,73 | 0,81 | 0,81 | 0,82 | 0,82 | 0,81 | 0,77 | 1 | | | | | | | | | | | |
| 17 | 0,44 | 0,44 | 0,52 | 0,52 | 0,46 | 0,46 | 0,46 | 0,46 | 0,5 | 0,52 | 0,52 | 0,48 | 0,48 | 0,52 | 0,5 | 0,60 | 1 | | | | | | | | | | |
| 18 | 0,78 | 0,78 | 0,67 | 0,67 | 0,74 | 0,74 | 0,74 | 0,60 | 0,64 | 0,67 | 0,67 | 0,68 | 0,68 | 0,67 | 0,71 | 0,60 | 0,32 | 1 | | | | | | | | | |
| 19 | 0,46 | 0,46 | 0,48 | 0,48 | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,54 | 0,46 | 0,48 | 0,48 | 0,50 | 0,50 | 0,48 | 0,52 | 0,38 | 0,37 | 0,45 | 1 | | | | | | | | |
| 20 | 0,50 | 0,50 | 0,52 | 0,52 | 0,47 | 0,47 | 0,47 | 0,47 | 0,50 | 0,52 | 0,52 | 0,48 | 0,48 | 0,52 | 0,55 | 0,42 | 0,26 | 0,49 | 0,36 | 1 | | | | | | | |
| 21 | 0,52 | 0,52 | 0,54 | 0,54 | 0,48 | 0,48 | 0,48 | 0,48 | 0,52 | 0,54 | 0,54 | 0,50 | 0,50 | 0,54 | 0,57 | 0,43 | 0,25 | 0,50 | 0,36 | 0,68 | 1 | | | | | | |
| 22 | 0,43 | 0,43 | 0,50 | 0,45 | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,45 | 0,43 | 0,45 | 0,45 | 0,42 | 0,42 | 0,45 | 0,48 | 0,40 | 0,56 | 0,42 | 0,52 | 0,34 | 0,34 | 1 | | | | | |
| 23 | 0,38 | 0,38 | 0,45 | 0,39 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,44 | 0,38 | 0,39 | 0,39 | 0,41 | 0,41 | 0,39 | 0,43 | 0,39 | 0,64 | 0,67 | 0,58 | 0,30 | 0,29 | 0,72 | 1 | | | | |
| 24 | 0,45 | 0,45 | 0,46 | 0,46 | 0,41 | 0,41 | 0,41 | 0,41 | 0,45 | 0,46 | 0,46 | 0,43 | 0,43 | 0,46 | 0,50 | 0,37 | 0,19 | 0,49 | 0,34 | 0,61 | 0,40 | 0,29 | 0,24 | 1 | | | |
| 25 | 0,34 | 0,34 | 0,40 | 0,35 | 0,31 | 0,31 | 0,31 | 0,40 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,37 | 0,37 | 0,35 | 0,38 | 0,31 | 0,39 | 0,33 | 0,50 | 0,34 | 0,31 | 0,56 | 0,62 | 0,32 | 1 | | |

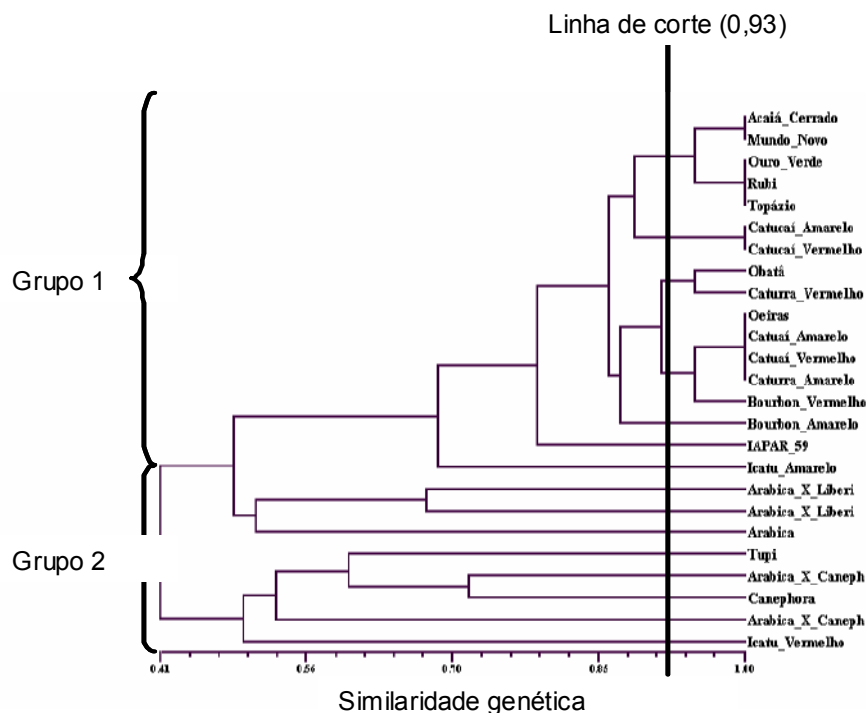


FIGURA 1. Dendrograma de 25 cultivares de café obtido pela análise de agrupamento UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando marcadores SSR. PRI, Wageningen – Holanda, 2003.

Algumas cultivares, no entanto, não puderam ser separadas, como Acaia Cerrado e Mundo Novo, apesar de serem fenotipicamente distintas. Ambas apresentam frutos vermelhos quando maduros, mas a cultivar Acaia Cerrado apresenta copa cilíndrica e de diâmetro menor quando comparada com a cultivar Mundo Novo. Essa elevada similaridade genética a nível molecular pode ser explicada pelo fato da cultivar Acaia Cerrado ter se originado de uma seleção dentro de Mundo Novo, havendo assim, muitos alelos em comum. Resultados semelhantes foram obtidos por Diniz (2000), os quais avaliaram o polimorfismo genético entre 40 cultivares de *C. arabica* utilizando marcadores RAPD

associados a enzimas de restrição. Nesse trabalho, os autores relataram uma similaridade genética de 90% entre as cultivares Acaiá Cerrado e Mundo Novo. Curiosamente, Teixeira et al. (1999), caracterizando cultivares de café por meio de marcadores RAPD, relataram que essas mesmas cultivares apresentaram uma baixa similaridade genética. Essa diferença de resultados provavelmente pode ser devido à utilização de diferentes marcadores, sendo que marcadores SSR e RAPD geralmente podem apresentar uma correlação negativa (Anthony et al., 2002a).

Às cultivares Ouro Verde, Rubi e Topázio foram atribuídas similaridades genéticas igual a 1 (Tabela 4), o que se deve ao fato dessas três cultivares possuírem progenitores em comum. A cultivar Ouro Verde foi desenvolvida partindo-se da mesma população base que originou as seleções que viriam a ser as cultivares Rubi e Topázio. Essa população base se originou do retrocruzamento entre as cultivares Catuaí e Mundo Novo, quando se procurou obter novas cultivares com o vigor vegetativo característico da cultivar Mundo Novo acrescidas do porte baixo da cultivar Catuaí, o qual lhe é conferido pelo alelo Ct herdado de um de seus parentais, a cultivar Caturra (Mendes e Guimarães, 1998). Apesar da semelhança a nível molecular entre as cultivares Ouro Verde, Rubi e Topázio, as duas primeiras apresentam frutos de cor vermelha quando maduros e a última frutos de cor amarela. Além disso, a cultivar Ouro Verde apresenta as folhas novas com coloração verde, enquanto a cultivar Rubi apresenta folhas novas com coloração bronze.

Alguns mutantes relacionados à cor do fruto também não puderam ser distintos como é o caso das cultivares Catuaí Amarelo e Vermelho e Catuaí Amarelo e Vermelho. Diniz (2000), relata que as cultivares Catuaí Amarelo e Vermelho se mostraram 89% semelhantes, enquanto que Anthony et al. (2002a) não distinguiram genótipos de Catuaí por meio de marcadores AFLP. A não distinção entre mutantes de cor do fruto provavelmente deve-se à difícil

detecção de mutações pelos marcadores moleculares (Weising et al., 1995). Marcadores SSR não foram eficientes em detectar polimorfismo proveniente de mutações em espécies como pessegueiro (Testolin et al., 2000) e *Pelagonium* (Becher et al., 2000). Por outro lado, Esselink et al. (2003) relataram que marcadores SSR foram eficientes na distinção de cultivares de rosa, às quais, na maioria das vezes, são obtidas por processos que induzem mutações. Quando uma mutação ocorre em um dos genes envolvidos, por exemplo, na síntese dos componentes de cor, um mutante é gerado. A cor dos frutos em café é controlada por somente um gene com dois alelos, Xc e xc, havendo dominância incompleta do alelo Xc sobre o xc, sendo os fenótipos fruto vermelho, alaranjado e amarelo representados pelos genótipos XcXc, Xcxc e xcxc, respectivamente (Mendes e Guimarães, 1998). O fato do caráter cor do fruto em café ser controlado por apenas um gene com dois alelos deve contribuir ainda mais para a dificuldade em detectar polimorfismo por meio de marcadores moleculares, mesmo havendo diferenças visuais quanto à cor de fruto. Além dessa característica, existem outras que funcionam como marcadores morfológicos em café úteis para a diferenciação de cultivares como altura da planta, forma, tamanho e cor das folhas, angulamento dos galhos e porte, entre outras. Apesar de existirem diferenças fenotípicas, a diferenciação das cultivares de café em nível molecular é muito limitada, o que é provavelmente devido ao fato de que, muitas vezes, os marcadores moleculares não estão ligados às regiões codificadoras do genoma e também ao fato de que as cultivares atuais de café se originaram de mutações ou de um número muito reduzido de progenitores (Krug e Carvalho, 1962).

De acordo com o dendrograma (Figura 1), as cultivares Obatã, Caturra Amarelo e Vermelho, Oeiras, Catuaí Amarelo e Vermelho e Bourbon Vermelho são cerca de 90% similares geneticamente. Os elevados valores de similaridade genética dessas cultivares também podem ser observados na Tabela 4. As cultivares Caturra Amarelo e Vermelho são mutantes obtidos da cultivar

Bourbon Vermelho. Além disso, a cultivar Caturra é um dos progenitores de Catuaí, tendo Steiger et al. (2002) relatado uma similaridade genética de 95,8 entre acessos dessas duas cultivares quando utilizaram marcadores AFLP. A cultivar Oeiras é uma seleção de Caturra Vermelho. A cultivar Obatã é uma seleção de Sarchimor, a qual corresponde ao cruzamento de Villa Sarchi com o Híbrido do Timor, tendo este último sido obtido de um cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora*. Apesar de sua distinta genealogia, existe parentesco entre a cultivar Obatã e as outras cultivares com as quais ela foi agrupada. De acordo com Anthony et al. (2002a), existe uma elevada similaridade genética entre as cultivares Caturra e Villa Sarchi, estando essa última presente na genealogia da cultivar Obatã, o que pode explicar o agrupamento dessa cultivar juntamente com as cultivares Caturra, Catuaí e Oeiras.

O valor da linha de corte com $t_{10\%}$ foi de 0,93, indicando que todos os agrupamentos à direita da referida linha são geneticamente similares (Figura 1), o que confirma a elevada similaridade genética entre as cultivares Acaí Cerrado, Mundo Novo, Ouro Verde, Rubi, Topázio, Catuaí Amarelo e Vermelho, Obatã, Caturra Amarelo e Vermelho, Oeiras, Catuaí Amarelo e vermelho e Bourbon Vermelho, observada na matriz de similaridade genética (Tabela 4) e no dendrograma (Figura 1).

A cultivar Bourbon Amarelo apresentou uma menor similaridade genética em comparação com as outras cultivares mencionadas. Provavelmente, isso se deveu ao fato de um maior número de plantas da cultivar Bourbon ter sido introduzido no Brasil em meados do século XIX, o que, provavelmente, contribuiu para a existência de uma maior variabilidade genética. Anthony et al. (2002a) obtiveram 14 marcadores AFLP polimórficos entre cultivares derivadas de Bourbon, contra cinco entre cultivares derivadas de Typica. Os autores explicaram tal resultado como sendo devido à disseminação de um maior número de plantas de Bourbon para os locais onde atualmente se cultiva *C.*

arabica. Além disso, a cultivar Bourbon Amarelo não se originou apenas de uma mutação, mas também do cruzamento natural de Bourbon Vermelho com uma outra cultivar denominada Amarelo de Botucatu (Mendes e Guimarães, 1998), o que ajuda a explicar a maior distância genética observada, no dendrograma, entre as cultivares Bourbon Amarelo e Vermelho.

A cultivar IAPAR 59 se originou de uma seleção de Sarchimor, a qual possui *C. canephora* em sua genealogia, como anteriormente mencionado. Tal característica pode explicar a proximidade genética observada entre essa cultivar e os híbridos indianos. Pelas mesmas razões, as cultivares Icatu Amarelo e Vermelho e Tupi, as quais possuem *C. canephora* em suas genealogias, foram agrupadas com os híbridos indianos.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de se conhecer as relações genéticas entre diferentes espécies do gênero *Coffea* (Steiger et al., 2001; Anthony et al., 2000a; Teixeira et al., 1999; Combes et al., 2000; Ruas et al., 2003). Nesses estudos, marcadores RAPD, AFLP, SSR e ISSR foram utilizados e os autores observaram que *C. arabica* apresenta uma maior similaridade genética com *C. canephora* do que com *C. liberica*, o que pode também ser observado no dendrograma (Figura 1), segundo o qual os híbridos indianos de *C. arabica* e *C. canephora* apresentam-se mais semelhantes geneticamente do que os híbridos de *C. arabica* e *C. liberica*.

A elevada similaridade genética entre cultivares de *C. arabica* tem sido relatada por vários autores, como sendo devido ao reduzido número de progenitores que originaram as atuais cultivares e também ao próprio sistema reprodutivo autógamo desta espécie (Lashermes et al., 1999, Combes et al., 2000; Steiger et al., 2002; Anthony et al., 2002a; Anthony et al., 2000b; Ruas et al., 2003; Silveira et al., 2003). A elevada similaridade genética entre as cultivares brasileiras de *C. arabica* também é resultado de como os programas de melhoramento dessa espécie foram conduzidos, sendo a maioria dos

cruzamentos realizados dentro da espécie arábica. Apesar disso, um certo nível de polimorfismo entre cultivares de *C. arabica* ainda pode ser encontrado, como relatado por Steiger et al. (2002). O polimorfismo, ainda que reduzido, tem sido explorado nos programas de melhoramento de café no Brasil, sendo obtidos híbridos de desempenho superior. Como exemplo, pode-se citar a cultivar Mundo Novo, obtida do cruzamento das variedades Typica e Bourbon de *C. arabica* (Carvalho et al., 1962). O cruzamento entre as cultivares IAPAR 59 e Mundo Novo produziu uma heterose de 25%, como citado por Silveira et al. (2003), mesmo havendo uma similaridade genética de 75% entre essas duas cultivares (Diniz, 2000), demonstrando que a complementariedade de genes e não somente a distância genética entre os pais contribui para o vigor híbrido.

Mesmo tendo sido detectado baixo polimorfismo, os marcadores SSR foram eficientes na caracterização das cultivares de *C. arabica*, sendo as cultivares Bourbon Vermelho, tupi, Icatu Amarelo e Vermelho distintas das demais. Além disso, uma vez desenvolvidos os primers, sua aplicação é simples e de custo reduzido, sendo útil não apenas para a caracterização de cultivares mas também para trabalhos de melhoramento assistido e mapeamento de genes de interesse em café.

5 CONCLUSÕES

É possível desenvolver novos marcadores SSR para *C. arabica* utilizando-se a metodologia de enriquecimento de biblioteca genômica.

O loco 17, obtido a partir do enriquecimento de alta stringência, possibilita a distinção das cultivares Icatu Amarelo e Vermelho.

O loco 59 possibilita a distinção das cultivares Bourbon Vermelho, Tupi, Icatu Amarelo e Vermelho das demais cultivares, sendo o loco de maior poder discriminativo entre as cultivares brasileiras de *C. arabica*.

Locos SSR flanqueando repetições de di-nucleotídeo são eficientes na caracterização de cultivares de café, gerando polimorfismo e padrões de bandas que podem ser interpretados sem ambigüidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL – Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2004. 469 p.

ANTHONY, F.; COMBES, M. C.; ASTORGA, C.; BERTRAND, B.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P.; The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 5, p. 894-900, Apr. 2002a.

ANTHONY, F.; QUIROS, O.; ROPART, P.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P. Detection by simple sequence repeat markers of introgression from *Coffea canephora* in *Coffea arabica* cultivars. **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, n. 6, p. 542-544, Dec. 2002b.

ARENS, P.; BREDEMEIJER, G.; SMULDERS, M.; VOSMAN, B. Identification of tomato cultivars using microsatellites. **Acta Horticulture**, Amsterdam, n. 412, p. 49-57, 1995.

BECKER, S. A.; STEINMTZ, K.; WEISING, K.; BOURY, S.; PELTIER, D.; RENO, J. P.; KAHL, G.; WOLFF, K. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 4, p. 643-651, Sept. 2000.

BERTHO, F.; TROUSLOT, P.; L'analyse en électrophorèse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea*: adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 8., 1977, Paris.

BERTHO, J.; CHARRIER, A. Genetic Resources of *Coffea*. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) **Coffee agronomy**. Paris: Elsevier Applied Science Publishers, 1988. p. 1-42.

BRASIL. Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 816-827, 1998.

BUSTAMANTE, J. W. P.; POLANCO, D. L. Caracterización molecular de genotipos de café. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 3., 1999, Londrina, Brasil. **Proceedings...** Londrina, 1999. p. 181-183.

CARDOSO, A. P. S. **Café: cultura e tecnologia primária.** Lisboa: Silvas, 1994. 169 p.

CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie Arábica. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 21, n. 228, p. 174-180, fev. 1946.

CARVALHO, A.; MONACO, L. C. Natural cross pollination in *Coffea arabica*. INTERNATIONAL HORTICULTURE CONGRESS, 16., 1962, Bruxelas, Bélgica. **Proceedings...** Bruxelas, Bélgica, 1962. p. 142-163.

CHARRIER, A.; BERTHAUND, J. Botanical classification of coffee. In: Clifford, M. N.; Wilson, K. C. (Ed.) **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage.** Londres: Croom Helm, 1985. p. 13-47.

CIAMPI, A. Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélite, AFLP e sequenciamento de cpDNA no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no Cerrado.** 1999. 109 p. Tese (Doutorado Ciências Biológicas/Genética) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

CIPRIANI, G.; MARRAZZO, M. T.; MARCONI, R.; CIMATO, A.; TESTOLIN, R. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 2/3, p. 223-228, Feb. 2002.

CLEGG, M. T.; LEARN, G. H.; GLOLENBERG, E. M. Molecular evolution of chloroplast DNA. In: SELANDER, R. K.; CLARK, A. G.; WHITTAM, T. S. (Ed.) **Evolution at the molecular level**, Sunderland: Sinauer Associates, 1991. p. 135-149.

COELHO, A. S. G. **BOOT – Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridade genéticas através do procedimento de bootstrap, versão 3.0.** Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 2001.

CRUZ, C. D. **Programa GENES** - versão Windows. Editora UFV: Viçosa, Minas Gerais, 2001. 642 p.

DAVIERWALA, A. P.; RAMAKRISHNA, W.; CHOWDARI, V.; RANKEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Potential of (GATA)_n microsatellite from rice for inter and intra-specific variability studies. **Evolutionary Biology**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2001.

COMBES, M. C.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; ROVELLI, P.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 1171-1193, Aug. 2000.

CORDEIRO, G. M.; TAYLOR, G. O.; HENRY, R. J. Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.) a highly polyploid species. **Plant Science**, Clare, v. 155, n. 2, p. 161-168, Jan. 2000.

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, AL. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VANTOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1464-1490, Sept./Oct. 1999.

CRISTANCHO, M. A.; GAITAN, AL. L.; GREEN, R.; MCCOUCH, S. R. Isolation, characterization and amplification of simple sequence repeat loci in coffee. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 2004.

CROS, J.; COMBES, M. C.; TROUSLOT, P. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 9, n. 1, p. 109-117, Feb. 1998.

DEPEIGES, A.; GOLBELY, C.; LENOIR, A.; COCHEREL, S.; PICARD, G.; RAYNAL, M.; GRELLET, F.; DELSENY, M. Identification of the most represented repeated motif in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, n. 1, p. 160-168, July 1995.

DINIZ, L. E. C. **Relação genética entre 40 acessos de *Coffea arabica* L. indicada pela técnica de RAPD associada à digestão por enzimas de restrição**. 2000. 172 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ESKES, A. B. Identification, description and collection of coffee types in P. D. R. Yemen, Roma: IPGRI, 1989. 54 p.

ESSELINK, D. G.; SMULDERS, M. J. M.; VOSMAN, B. Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagget microsatellite site markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 277-286, Jan. 2003.

FERNANDEZ, D.; LASHERMES, P. Molecular tools for improving coffee (*Coffea arabica* L.) resistance to parasites. In: JAIN, S. M.; BRAR, D. S.; AHLLOWALIA, B. S. (Ed.). **Molecular techniques in crop improvement**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 327-345.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GAIOTTO, F. A. **Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. utilizando marcadores microssatélite**. 2001. 122 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

HAARER A. E. **Modern coffee production**. Londres: Leonard Hill Books, 1956. 94 p.

HAGIWARA, W. E.; SANTOS, J. B.; CARMO, S. L. M. Use of RAPD to aid selection in common bean backcross breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 355-362, 2001

HAMADA, H.; PETRINO, M. F.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academic Science of the United States of America**, Washington, v. 77, n. 4, p. 395-401, Feb. 1989.

HARTL, L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinaur Associates, 1997. 196 p.

HE, C.; POYSA, V.; YU, K. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 363-373, Jan. 2003.

- KIJAS, J. M. H.; FOWLER, J. C. S.; THOMAS, M. R. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. **Genome**, v. 38, n. 2, p. 349-355, Apr. 1995.
- KOEBNER, R. M. D. Predigestion of DNA template improves the level of polymorphism of random amplified polymorphic DNAs in wheat. **Biomolecular Engineering**, n. 12, p. 63-67, 1995.
- KRUG, C. A.; CARVALHO, A. The genetics of coffee. **Advances in Genetics**, New York, v. 4, p. 127-158, 1951.
- LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the Coffea arabica L. genome. **Molecular General Genetics**, New York, v. 261, n. 2, p. 259-266, Mar. 1999.
- LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBES, M. C.; CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of Coffea arabica. **Euphytica**, Wageningen, v. 87, n. 1, p. 59-64, 1996.
- LEWIN, B. **Genes IV**. Oxford: Oxford University Press, 1990. 465 p.
- MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Genética e melhoramento do cafeeiro**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 99 p.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as marker in plant genetics. **Plant Journal**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.
- OROZCO-CALTILO, C.; CHALMERS, K. J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, n. 8, p. 934-940, Mar. 1994.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K. J.; POWELL, W.; WAUGH, R. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, n. 5, p. 337-341, Jan. 1996.
- PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLIK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 8, p. 1248-1255, Dec. 1998.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J. TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for gemplasm analysis. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n. 3, p. 225-238, 1996.

RAFALSKI, D. J. AL.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York, 1996. p. 75-135.

RAMSAY, L.; MACAULAY, M.; DEGLI IVANISSEVICH, S.; MACLEAN, K.; CARDLE, L.; FULLER, J.; EDWARDS, K. J.; TUVESSON, S.; MORGANTE, M.; MASSARI, A.; MAESTRI, E.; MEMIROLI, N.; SJAKSTE, T.; GANAL, M.; POWELL W.; WAUGH, R. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. **Genetics**, Baltimore, v. 156, n. 4, p. 1997-2005, Dec. 2000.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2. 11. New York, 1992. 470 p.

RONGWEN, J.; AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; LAVI, U.; CREGAN, P. B. The use of microsatellite DNA markers for soybean denotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 1, p. 43-48, Jan. 1995.

ROVELLI, P.; METTULIO, R.; ANTHONY, F.; ANZUETO, F.; LASHERMES, P.; GRAZIOSI, G. Microsatellite in *Coffea arabica*. In: SERA, T.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S. (Ed.). **Coffee biotechnology and quality**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 123-133.

RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; PAMPIM, L.; CARVALHO, V. P.; RUAS E. A.; SERA, T. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 319-327, Sept. 2003.

RUSSEL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 442-450, Aug. 1997.

SCOTTI, I.; PAGLIA, G. P.; MAGNI, F.; MORGANTE, M. Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 6/7, p. 1035-1041, May 2002.

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; SERA, T.; CARVALHO, V. P.; COELHO, A. S. G. Assessment of genetic variability within and among coffee progênies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 329-336, Sept. 2003.

SMITH, J. S. C.; REGISTER, J. C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. **Seed Science and Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 285-293, 1 June 1998.

STEIGER, D. L.; NAGAI, C.; MOORE, P. H.; MORDEN, C. W.; OSGOD, F. V.; MING, R. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 2/3, p. 209-215, Aug. 2002.

SYLVAIN, P. G. Some observations on *Coffea arabica* L. in Ethiopia. **Turrialba**, San Jose, v. 5, n. 1, p. 37-53, ene./mar. 1955.

TAUTZ, E.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, p. 4127-4138, 1984.

TEIXEIRA, T. A.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, C. C. H. Caracterização de acessos de *Coffea* por marcadores RAPD. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 3., 1999, Londrina, Brasil. **Proceedings...** Londrina, 1999. p. 177 -180.

TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M. T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivar. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 512-520, June 2000.

VAN DE WIEL, C.; ARENS, P.; VOSMAN, B. Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 2, p. 139-149, Apr. 1999.

VAN DER SCHOOT, J.; POSPIKOVA, M.; VOSMAN, B.; SMULDERS, M. J. M. Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.) **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 1/2, p. 317-322, July 2000.

VASCOTTO, F.; DEGLI IVANISSEVICH, S.; ROVELLI, P.; ANTHONY, R.; ANZUETO, F.; LASHERMES, P.; GRAZIOSI, G. Microsatellite in *Coffea arabica*: construction and selection of two genomic libraries. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 3., 1999, Londrina, Brasil. **Proceedings...** Londrina, 1999. p. 125-128.

VOSMAN, B.; ARENS, P. Molecular characterization of GATA/GACA microsatellite repeats in tomato. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 1, p. 25-33, Feb. 1997.

VOSMAN, B.; ARENS, P.; RUS-KORTEKAAS, W.; SMULDERS, M. J. M. Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 2/3, p. 239-277, Nov. 1992.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 140 p.

WELLMAN, F. L. **Coffee: botany, cultivation and utilization**. Londres: Leonard Hill Books, 1961. 163 p.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Microsatélites são considerados como um dos marcadores mais poderosos para a caracterização de cultivares das mais diferentes espécies. Entretanto, muitas vezes cultivares fenotipicamente diferentes não são distintas no nível molecular provavelmente porque determinados locos microsatélite não estão ligados às regiões codificadoras, não detectando diferenças. Tal fato não inviabiliza o emprego desses marcadores para fins de caracterização, mas vem indicar novas linhas de pesquisa com a espécie *C. arabica*, como a busca de marcadores ligados a genes de interesse e também a utilização de marcadores capazes de detectar diferenças de um único par de bases como os marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

ANEXOS

| ANEXO A | Página |
|--|--------|
| TABELA 1A Seqüências dos locos SSR polimórficos..... | 137 |

TABELA 1A. Seqüências dos locos SSR polimórficos. PRI, Wageningen, Holanda, 2003.

| LOCO | SEQUÊNCIA |
|----------|--|
| M-20 | F: CTTGTTTGAGTCTGTCGCTG R: TTCCCTCCCAATGTCTGTA |
| M-24 | F: GGCTCGAGATATCTGTTTAG R: TTTAATGGGCATAGGGTCC |
| 119-5CTG | F: ATTGCTTCTGTCATGCTTATTTG R: TCCCTTAGACTGATTTTGTGAA |
| 62-6CTG | F: GTTCCATCCACCCTGTCAC R: CTGGCTAGCTTCTTTCTGGTTT |
| 49-6CTG | F: GGCTGGTTTTCTTTTCTG R: ATTTGCTTATTATCCCACATTG |
| 45-6CTG | F: TACTTAAAGGCCCTGAATACAT R: GAGACACCCACCCATCC |
| 39 | F: AGCCGATATCTGACTGTTCTTTTC R: CTGGCCCTTCCTTGGTTTTT |
| 47 | F: AGGCCAGACTTGTTTGATTTTG R: GCCCCTTCTCGCTTTAGTTG |
| 53 | F: TACTGGGGAAGAATTTATCATC R: TTAGGCCATCCAAGAGTATC |
| 59 | F: TATGTCTCTAACTTTCCTATTTT R: AGAGACTACATTTACACAGAAGA |
| 63 | F: TGCTCCTACTAAATACCCAAACA R: ATATGCCCAAGAAAATTAGATGAAA |
| GT G10 | F: GTCATTTATTTTTCCGGTCATCCAT R: AGCCCTCGTTCTGCCACCAAAAAGT |
| CTT | F: CGGGAGACGGTGATTTT R: TATGGGTATTGTTTTGTTTTTA |
| 6 | F: CCAGCAATCCTCCCTCCCACCAC R: TACCGTATGCAGAGACAACAATG |
| 10 | F: ATGGCAAAGCAAATGTGGGAAGAG R: CACCTGAAGAAGATGACAACTAAT |
| 15 | F: ATCCCTCCACGGCAACCCAAAATA R: ATCCGCAGCCCTCACCATCCA |
| 17 | F: GATGTGGAGGAGGCTGCTGCTGAA R: TAGGGCGCCATCTGGTAGGGTTGT |
| 20 | F: AGCAGCTGCAGCCACAACA R: GAGTAAGAGCCCCAGAGCGTAACCT |