

Checagem da Pureza Genética de Amostras de Café Bourbon por Meio de Marcador Microssatélite



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Café
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
6

Checagem da Pureza Genética de Amostras de
Café Bourbon por Meio de Marcador Microsatélite

Lilian Padilha
Juliana Camargo Martinati
Oliveiro Guerreiro Filho
Ligia Alves Pereira
Mirian Perez Maluf

Embrapa Café
Brasília, DF
2022

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Café
Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W3 Norte (final), Ed. Sede
CEP: 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4378 / 4010
Fax: +55 (61) 3448-1797
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Embrapa Café

Presidente
Lucas Tadeu Ferreira

Vice-Presidente
Jamilsen de Freitas Santos

Secretária-Executiva
Adriana Maria Silva Macedo

Membros
Anísio José Diniz, Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Helena Maria Ramos Alves, Lucilene Maria de Andrade, Mauricio Sergio Zacarias, Milene Alves de Figueiredo Carvalho, Omar Cruz Rocha, Rogério Novais Teixeira, Roseane Pereira Villela.

Revisão de texto
Jane Baptistone de Araújo

Normalização bibliográfica
Rejane Maria de Oliveira Cechinel Darós

Tratamento das ilustrações
Thiago Farah Cavaton

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Thiago Farah Cavaton

Ilustração da capa
Gerson Silva Giomo

1ª edição
Publicação digital (2022): PDF

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa, Superintendência de Comunicação

Checagem da pureza genética de amostras de café Bourbon por meio de marcador microsatélite / Lilian Padilha ... [et al.]. – Brasília, DF :

Embrapa Café, 2022.

PDF (24 p.). – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Café, ISSN 2237-9738 ; 6)

1. *Coffea arabica*. 2. Qualidade genética. 3. Cafés especiais. 4. Pureza varietal. 5. Fisiologia. 6. Anatomia 7. Produtividade. I. Martinati, Juliana Camargo. II. Guerreiro Filho, Oliveira. III. Pereira, Ligia Alves. IV. Maluf, Mirian Perez. V. Título. VI. Série

CDD (21.ed.) 633.73

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	15
Conclusões.....	22
Agradecimentos.....	22
Referências	22

Checagem da Pureza Genética de Amostras de Café Bourbon por Meio de Marcador Microssatélite

Lilian Padilha¹

Juliana Camargo Martinati²

Oliveiro Guerreiro Filho³

Ligia Alves Pereira⁴

Mirian Perez Maluf⁵

Resumo – O grupo Bourbon se destaca dentre as cultivares de café arábica pelas suas características sensoriais superiores e maior valorização no mercado. Além da origem, da sustentabilidade e dos aspectos físicos e sensoriais, a rastreabilidade dos cafés diferenciados é fundamental na valorização do produto final. Este trabalho avaliou a eficiência de um marcador de DNA do tipo microssatélite ou SSR, denominado LEG2, com o objetivo de diferenciar cultivares do grupo Bourbon das principais cultivares plantadas no Brasil. Após a identificação do polimorfismo, foram avaliados a repetibilidade da técnica, o perfil de amplificação em sementes e folhas e a análise de amostras de lavouras comerciais. Esse marcador diferencia o grupo Bourbon das demais cultivares IAC, à exceção de cultivares mais antigas e pouco plantadas no País, como Typica e Amarelo de Botucatu. As cultivares Tupi IAC 1669, do IAC, e Sabiá Tardio, da Fundação Procafé, também apresentam o mesmo alelo dos cafés do grupo Bourbon para o loco LEG2. Pela simplicidade e boa resolução da técnica, o SSR-LEG2 pode ser aplicado no controle de qualidade genética nas fases de pré e pós-melhoramento do cafeeiro, e também para checar a pureza genética de amostras comerciais de café Bourbon.

Termos para indexação: *Coffea arabica*, qualidade genética, cafés especiais.

¹ Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Café

² Biomédica, doutora em Biologia na Agricultura, Bolsa de Produtividade em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da Embrapa Café-Consórcio Pesquisa Café

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências, pesquisador científico do Centro de Café Alcides Carvalho, Instituto Agronômico (IAC)

⁴ Bióloga, Bolsa de Capacitação de Profissional Técnico Graduado da Embrapa Café-Consórcio Pesquisa Café

⁵ Bióloga, Ph.D em Crop Sciences, pesquisadora da Embrapa Café

Genetic Purity Control of Bourbon Coffee Samples Using a Microsatellite Marker

Abstract – The Bourbon group stands out among arabica coffee cultivars for its beverage quality and greater market value. Besides the origin, sustainability and physical and sensory characteristics, the traceability of cultivars is fundamental in the final product valuation. This work evaluated the efficiency of a microsatellite or SSR DNA marker, called LEG2, to differentiate Bourbon group cultivars from IAC main cultivars planted in Brazil. After identifying the polymorphism, the repeatability of the technique, the amplification profile in seeds and leaves and the analysis of samples from commercial coffee crops were evaluated. This marker differentiates the Bourbon group from the IAC cultivars, except Typica and Amarelo de Botucatu, which are older cultivars with no significant cultivation area in Brazil. The cultivars Tupi IAC 1669, from IAC, and the Sabiá Tardio from Fundação Procafé, also present the same allele of Bourbon coffees for the LEG2 locus. Due to the ease and good resolution of the technique, SSR-LEG2 can be used both to monitor the genetic quality in the pre- and post-breeding coffee, and to check the genetic purity of Bourbon coffee commercial samples.

Index terms: *Coffea arabica*, genetic quality, specialty coffees, varietal purity.

Introdução

O gênero *Coffea* engloba até 124 espécies (Davis et al., 2011), mas apenas duas delas apresentam importância econômica, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. A espécie *C. arabica* pertence à família Rubiaceae (Charrier; Berthaud, 1985), é originária da região sudoeste da Etiópia, autógama e alotetraploide. É preferida pelas características dos seus grãos, que produzem uma bebida de sabor suave e com menor teor de cafeína do que a *C. canephora*, que é uma espécie diploide e, preferencialmente, destinada à produção do café solúvel (Mendes; Guimarães, 1998). O Brasil é o maior produtor e o segundo maior consumidor de *C. arabica* no mundo. Essa espécie responde por, aproximadamente, 60% do café comercializado no mundo (Organização Internacional do Café – OIC)⁶.

Segundo o Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (2020), de janeiro a outubro de 2020, o País gerou uma receita cambial de US\$ 4,4 bilhões com a exportação de 35 milhões de sacas de café. Entre os principais destinos desses cafés, destacam-se os Estados Unidos (18,4%), a Alemanha (16,8%), e a Bélgica (8,2%). O café arábica participou com 78,4% dos grãos exportados, ou seja, 27,5 milhões de sacas. Já os cafés diferenciados, classificados por apresentarem qualidade superior e/ou algum tipo de certificado de práticas sustentáveis, participaram com 6 milhões de sacas exportadas. Esse volume de cafés diferenciados foi o segundo maior embarcado para o período nos últimos 5 anos e gerou uma receita de US\$ 980,4 milhões, representando 22,1% do valor total das exportações até outubro de 2020.

A valorização da qualidade da bebida do café associada à redução do impacto da sua produção sobre o meio ambiente e à melhoria na vida dos envolvidos no processo de obtenção dos grãos têm fortalecido o tripé da sustentabilidade dos cafés diferenciados. Os consumidores de cafés especiais têm um perfil mais exigente e demandam maior transparência das informações relacionadas ao produto, as quais vão muito além do tipo de torra e da espécie ofertada. Elas incluem a origem do material genético, o sistema de produção e processamento, aspectos físicos e sensoriais, rastreabilidade da produção, entre outras. As cultivares Bourbon, desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo (IAC) em Campinas, SP, são as mais valorizadas quando se considera a qualidade de bebida do café.

⁶ Disponível em: www.ico.org.

As cultivares de *C. arabica* são caracterizadas por apresentarem estreita base genética, principalmente por serem plantas autógamas perenes, derivadas de poucos acessos e de pequenas quantidades de sementes (Carvalho et al., 1993). A história da disseminação de *C. arabica* no mundo envolveu vários eventos que contribuíram para sucessivas reduções da sua diversidade genética dentro das duas populações de cafés silvestres transferidas da Etiópia para o Iêmen. E, a partir daí, pôde ser observada a continuidade desse estreitamento da diversidade até a obtenção das variedades botânicas *Typica* e *Bourbon*, a partir das quais, foram desenvolvidas a maioria das cultivares de *C. arabica* (Anthony et al., 2002). No caso dos primeiros cafezais plantados no Brasil, em 1727, no Pará, foram introduzidas sementes e mudas de *C. arabica* 'Arábica', também conhecidas como 'Nacional', 'Crioulo' e 'Typica'. Esses materiais tiveram origem a partir de um único cafeeiro em Amsterdã, na Holanda. Eles eram uniformes, e a pequena variabilidade genética observada era devida à constituição genética da planta original ou às raras mutações que surgiram com o decorrer do tempo (Carvalho, 2007).

Fazuoli et al. (2007) relataram que sementes de café da variedade *Bourbon*, mais produtivas que a cultivar *Typica*, chegaram ao Brasil em 1859, vindas da Ilha Reunião, antiga Ilha Bourbon. Em 1932, o IAC iniciou os trabalhos de melhoramento dessa variedade de porte médio a alto no Brasil, englobando a seleção de plantas matrizes em diversas fazendas do estado de São Paulo. Os autores ainda comentaram que o 'Bourbon Amarelo' de frutos amarelos pode ter sido originado da mutação de 'Bourbon Vermelho' ou pelo cruzamento natural entre 'Bourbon Vermelho' e 'Amarelo de Botucatu'. Segundo Setotaw et al. (2013), que avaliaram o coeficiente de parentesco de 121 cultivares de *C. arabica* liberadas no Brasil entre 1939 e 2009, o 'Bourbon Vermelho' contribuiu com 52,76% da base genética dessas cultivares, seguido de 'Sumatra' (19,05%) e 'Híbrido de Timor' (11,59%). No Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, atualmente, além do 'Bourbon Vermelho IAC 662', estão registradas sete cultivares de Bourbon Amarelo⁷.

⁷ Disponível em: <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/>.

Na busca por cultivares com maiores pontuações para o perfil sensorial da bebida, os programas de melhoramento investem em genótipos do grupo Bourbon para o desenvolvimento de cultivares de cafés especiais. Muitas vezes, esses genótipos são encontrados em propriedades agrícolas particulares. Até o momento, a discriminação dos materiais é feita a partir das características fenotípicas e agronômicas. Por sua vez, mesmo com a experiência do melhorista, alguns genótipos ainda podem ser confundidos em campo. Marcadores de DNA podem ser utilizados no controle de qualidade genética ainda no pré-melhoramento, com o objetivo de checar a identidade do material genético. Eles também podem ser aplicados no pós-melhoramento para acompanhar a pureza genética em amostras de sementes. Entre as principais vantagens desses marcadores podem ser citadas a ausência de influência ambiental e sua detecção a partir de qualquer tecido ou órgão da planta.

Os marcadores moleculares do tipo microsatélites ou *simple sequence repeat* (SSR) são sequências repetitivas de DNA, constituídas por um a seis nucleotídeos e distribuídas ao longo do genoma. Eles possuem várias características desejáveis, tais como herança codominante, multialelismo, elevado conteúdo informativo de polimorfismo e herança mendeliana (Tautz; Renz, 1984; Morgante et al., 2002). Métodos baseados em DNA, incluindo as SSRs, são estudados pela International Union for the Protection of New Varieties of Plants (Upov) e pela International Seed Test Association (Ista) para integrarem a lista de descritores de variedades⁸. Para o café arábica, os marcadores do tipo SSR foram aplicados em diversas áreas, como em estudos de mapeamento genético e associação com características de interesse, estudos de diversidade genética e/ou diferenciação de cultivares.

A necessidade de checar a pureza genética de amostras do grupo Bourbon é uma demanda identificada em várias oportunidades. Dessa maneira, buscou-se um método simples e sensível, baseado em marcadores do tipo SSR, para diferenciar o grupo Bourbon de outras cultivares de café arábica plantadas no País.

⁸ Disponível em: https://www.upov.int/meetings/en/topic.jsp?group_id=261.

Material e Métodos

Material vegetal

O estudo englobou a variedade Typica e 49 cultivares, das quais 41 eram do IAC e 8 da Fundação Procafé. Elas foram utilizadas em diferentes etapas para avaliação do perfil de amplificação do microsatélite LEG2, como descrito a seguir: a) identificação do polimorfismo e da repetibilidade do marcador SSR; b) amplificação do SSR em folhas (L) de cultivares IAC e seleções de Bourbon Amarelo mantidas no Banco de Germoplasma (BAG) do IAC; c) amplificação do SSR-LEG2 em folhas (L) de cultivares da Fundação Procafé e em sementes (S) de cultivares plantadas na Fazenda Recreio (Tabela 1).

As análises das cultivares da Fazenda Recreio foram realizadas em amostras cegas de cada cultivar, com misturas iguais de sementes para duas cultivares (S3 + S9) e (S4 + S6) e para quatro cultivares (S4 + S6 + S8 + S10). Dessa maneira, objetivou-se detectar a sensibilidade da amplificação do SSR-LEG2 para revelar a mistura e abranger uma avaliação sem conhecimento prévio da amostra.

Uma vez confirmado o poder de discriminação do marcador, ele foi utilizado para avaliar a pureza de amostras de folhas obtidas de plantas identificadas como cultivares antigas do grupo Bourbon, em áreas experimentais de Franca e Brodowski no estado de SP.

Tabela 1. Cultivares de *Coffea arabica* avaliadas para o marcador de microsatélite LEG2.

Cultivar	Código das cultivares	Instituição	Origem ⁽¹⁾	Etapa ⁽²⁾	Alelo ⁽³⁾
Amarelo de Botucatu	-	IAC	Typica	(a, b)	1
Acaíá	Não informado (Fazenda Recreio)	IAC	Seleção de Mundo Novo	(c)	2
Bourbon Vermelho	IAC 662	IAC	Bourbon Vermelho	(a, b, c)	1
Bourbon Amarelo (cultivar registrada)	IAC J10	IAC	Bourbon Vermelho x Amarelo Botucatu	(a, b)	1

Cultivar	Código das cultivares	Instituição	Origem ⁽¹⁾	Etapa ⁽²⁾	Alelo ⁽³⁾
Bourbon Amarelo (cultivares registradas)	IAC [J2, J9, J19, J20, J22, J24]	IAC	Bourbon Vermelho x Amarelo Botucatu	(b)	1
Bourbon Amarelo	IAC [J3, J4, J5, J6, J9, J11, J12, J13, J14, J15, J16, J17, J18, J21, J23, J25]	IAC	Bourbon Vermelho x Amarelo Botucatu	(b)	1
Catuaí Amarelo	IAC 62 (Fazenda Recreio)	IAC	Caturra Amarelo x Mundo Novo	(b)	2
Catuaí Vermelho	IAC 44	IAC	Caturra Amarelo x Mundo Novo	(b)	2
Catuaí Vermelho	IAC 144 (Fazenda Recreio)	IAC	Caturra Amarelo x Mundo Novo	(a)	2
Caturra Amarelo	IAC 476	IAC	Mutação de Bourbon Vermelho	(b)	2
IAC 125 RN	-	IAC	Villa Sarchi x Híbrido de Timor	(b)	2
IAC Catuaí SH3	-	IAC	BA10 x Catuaí Vermelho	(b)	2
IAC Obatã 4739	-	IAC	Obatã IAC1669 x Catuaí Amarelo	(b)	2
IAC Ouro Verde	-	IAC	Catuaí Amarelo x Mundo Novo	(b)	2
Ibairi	IAC 4761	IAC	Mokka x Bourbon Vermelho	(a)	2

Cultivar	Código das cultivares	Instituição	Origem ⁽¹⁾	Etapa ⁽²⁾	Alelo ⁽³⁾
Icatu Precoce	IAC 3282 (Fazenda Recreio)	IAC	Icatu Vermelho x Bourbon Amarelo	(c)	2
Icatu Vermelho	IAC 4046	IAC	Coffea canephora x Bourbon Vermelho	(a)	2
Laurina	IAC 870	IAC	Mutação de Bourbon Vermelho	(a)	2
Mundo Novo	IAC 379-19	IAC	Sumatra x Bourbon Vermelho	(b)	2
Typica	-	-	Typica	(a, b)	1
Tupi	IAC 1669-33	IAC	Villa Sarchi x Híbrido de Timor	(b)	1
Acauã	-	Procafé	Mundo Novo x Sarchimor	(c)	12
Arara	-	Procafé	Sarchimor 1669-20 x (Icatu IAC 2944 ou Catuaí Amarelo)	(c)	2
Catuaí Amarelo	2SL (Fazenda Recreio)	Procafé	Icatu Vermelho x Catuaí	(c)	2
Catuaí Vermelho	36/6	Procafé	Icatu Vermelho x Catuaí	(c)	12
Catuaí Vermelho	785-15	Procafé	Icatu Vermelho x Catuaí	(c)	2
Clones	3 e 12	Procafé	<i>Coffea arabica</i> x <i>Coffea racemosa</i>	(c)	2

Cultivar	Código das cultivares	Instituição	Origem ⁽¹⁾	Etapa ⁽²⁾	Alelo ⁽³⁾
IBC-Palma	1 e 2	Procafé	Catuaí Vermelho x Catimor UFV353	(c)	2
Sabiá Tardio	-	Procafé	Acaia x Catimor	(c)	1

⁽¹⁾ Fonte: Fazuoli et al. (2007). ⁽²⁾ Etapas: (a) verificação do polimorfismo e repetibilidade do SSR-LEG2; (b) amplificação SSR-LEG2 em genótipos IAC; (c) amplificação do SSR-LEG2 em genótipos da Fundação Procafé e da Fazenda Recreio. ⁽³⁾ Representação do polimorfismo do SSR-LEG2: 1 = SSR com 154 bases (CA)₁₃; 2 = SSR 146 bases (CA)₉; 12 = heterozigoto para o loco.

Marcador SSR-LEG2

No Projeto Genoma Café Brasileiro (PGCB), as sequências expressas ou *expressed sequence tags* (ESTs) de *C. arabica*, *C. canephora* e *Coffea racemosa* foram agrupadas em 17.982 contigs e em 32.155 singletons, o que resultou na identificação de cerca de 33 mil unigenes diferentes (Vieira et al., 2006). A análise do contig 846 foi realizada no banco de dados do café arábica depositado no Phytozome⁹. Trinta e cinco EST-SSR di- e trinucleotídeos obtidos da base de dados do PGCB de sequências expressas ou *expressed sequence tag* (EST) foram avaliados para o polimorfismo entre o grupo Bourbon e as cultivares de café arábica do IAC. Entre esses marcadores, que já haviam sido publicados por Pereira et al. (2011), apenas o SSR-LEG2 amplificou fragmento com o polimorfismo desejado. Esse microsatélite é do tipo dinucleotídico (CA)_n, com frequência de repetição de 15,5 e com dois alelos. O SSR-LEG2 foi identificado no contig 846 disponibilizado no PGCB, na posição 502 da sequência que possui um total de 1.062 bases.

Após a identificação do polimorfismo, esse marcador foi amplificado nas cultivares Bourbon IAC J10 e Mundo Novo IAC 379-19. A banda polimórfica foi extraída do gel e purificada com o kit Promega Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, seguindo a recomendação do fabricante. Na sequência, o fragmento foi submetido ao sequenciamento Sanger para a confirmação do SSR.

⁹ Disponível em: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>.

Extração do DNA e amplificação do SSR-LEG2

Amostras de folhas foram coletadas em campos de avaliações do programa de melhoramento do IAC e da Fundação Procafé. As amostras de folhas oriundas de locais mais distantes eram colhidas no dia anterior e mantidas à sombra até a chegada no laboratório (Pereira et al., 2009), período estimado em torno de 24 horas da coleta até o congelamento em N₂L. Após a chegada no laboratório, as amostras foram mantidas a -80°C até o momento de extração do DNA.

Utilizou-se um pool de cinco indivíduos para a extração do DNA. A extração do material genômico de folhas e sementes foi realizada conforme o método Doyle e Doyle (1987), utilizando o tampão de extração CTAB. O DNA foi tratado com a enzima RNase e quantificado em espectrofotômetro de microvolumes. A integridade da molécula de DNA foi avaliada pela relação da absorbância medida nos comprimentos de ondas de 260 nm, 230 nm e 280 nm. A qualidade e a concentração do DNA também foram confirmadas pela eletroforese em gel de agarose 1% corado com BrEt, comparando a intensidade da banda com um DNA lambda de concentração conhecida. A solução de trabalho do DNA foi diluída para a concentração de 100 ng μL^{-1} .

A PCR foi realizada em volume final de 25 μL , contendo o tampão PCR 1X (Tris-HCl 200 $\mu\text{mol mL}^{-1}$; pH 8,4; KCl 500 $\mu\text{mol mL}^{-1}$); 2 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ de MgCl₂; 400 nmol mL⁻¹ de dNTPs; 0,3 nmol mL⁻¹ de cada primer; 0,5 U de Taq; e 200 ng de DNA. No termociclador, a PCR foi realizada com a desnaturação do DNA a 94°C por 5 min. seguida de 5 ciclos touchdown (94°C por 1 min, 60°C até 55°C por 1 min, 72°C por 1 min); 25 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min; e extensão a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram migrados por eletroforese em gel de agarose 4% corado com EtBr, e as bandas foram visualizadas em transluminador UV. As reações foram realizadas em duplicatas, e em todas as linhas do gel sempre foram acrescentados dois genótipos referência para o polimorfismo observado no loco SSR-LEG2 (ex.: um Bourbon e um Catuaí). A avaliação do gel foi visual, atribuindo-se o número 1 para o alelo (CA)₁₃, 2 para o (CA)₉, e 12 para os indivíduos que são heterozigotos e possuem os dois alelos (Tabela 1).

Resultados e Discussão

Desde 2017, a sequência do genoma de *C. arabica* obtida para o acesso UCG-17 Geisha está depositada no banco de dados do Phytozome v13¹⁰, e é aberta à comunidade científica para análise de similaridade entre sequências biológicas. O contig 846, obtido do PGCB, foi analisado no Phytozome v13, e a similaridade com o Scaffold_1810: 1480672-1482685 apresentou um score de 1.793 e E = 0.0 (Figura 1). Na anotação, verificou-se que, no contig 846, está inserida parte de duas regiões conservadas da proteína glutarredoxina (GRX). Na Figura 1, também podem ser observadas as sequências dos primers *forward/reverse* do loco SSR-LEG2 (CA)₁₆.

As GRXs são oxidoredutases onipresentes, de baixo peso molecular (10 kDa–15 kDa), que pertencem à família da thioredoxina. Elas possuem funções ligadas à resposta aos estresses oxidativos e à montagem do grupo Fe-S, que é necessário em vários processos da fotossíntese e assimilação de N e S (Holmgren; Aslund, 1995; Rouhier et al., 2004, 2008; Lillig et al., 2008). A superexpressão do gene da GRX já foi observada em plântulas de café submetidas ao estresse salino (Haile; Kang, 2018). Em plantas de tomate, esse gene esteve associado à resposta aos estresses oxidativos, de seca e salino (Guo et al., 2010) e à resposta ao estresse por calor no pólen (Jegadeesan et al., 2018). Em *Arabidopsis* (Jung et al., 2018) e em arroz (El-Kereamy et al., 2015), foi observado que as GRXs mediarão a sinalização e a resposta da planta submetida a condições de baixa disponibilidade de nitrato. Kumar et al. (2020) puderam verificar em *Arabidopsis* que a superexpressão do gene da GRX potencializou o sistema de defesa contra o estresse oxidativo provocado por metais pesados, como o arsênio, o cádmium e o cromo.

O polimorfismo observado para o SSR-LEG2 foi validado pelo sequenciamento Sanger. No exemplo da Figura 2, estão as sequências obtidas para as cultivares Bourbon Amarelo IAC J10 e Mundo Novo IAC 379-19. Na primeira, o SSR dinucleotídico (CA) é repetido 13 vezes, enquanto, na segunda, ele se repete nove vezes. Essa diferença é suficiente para ser visualizada na eletroforese do gel de agarose a 4%. Abaixo da figura, seguem as sequências da banda polimórfica para o SSR-LEG2.

¹⁰ Disponível em: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>.

Scaffold_1810 Scaffold_1810:1480672..1482685 (+ strand) class=match length=2014 (1212 bases) - SCORE: 1793,8 E:0,00

GAGGTCAATTGGCGTGGATTTTGCATTGCTAGTTTTCTCGGGGCTCTGTCAATCAA
 GAGAAGAAGAAGAAAGATATGGGCTCTCCCAAAGGCTAAGGAGATC{GTGTGCGGC
 AATCCTGTTGTGCGTTTTAGGTCCTCCCCTCACTCTCCTATCTCCTCTATTTGCTTAC
 ATAATCTTTGTTTTGCAATCTAGCTAGAGTTATATTTTTGGCCTTAGAATTAATTT
 GGAATGGTGGGGATGGGGGATCCGAGTTAATAACATTGAAAATTTGGCAGCAAG
 TCGTACTGTCCGTTCTGCGTCAACGTGAAGAAGCTGCTGGGTCAAGTTGGTGCCAA
 CTCAAGGCCGTCGAGCTGGATGTCGAAAGTCTGTTCTCCTCTCCCTTTTTTTTTAT
 TATTATTACATCCCTCTCCTTTTCTATTTTTCCCCCTTTGTTACGCCGTTTTTTTC
 TGTTTACCGAATAATTTTCTAAATCTCGCGGACAAATTAACAGGATTGTCATGAAT
 TGATCTGTGCTTTTATACCAAAGAAG[GGACAAAGACGCCTAATCCA]TTTTCTGGG
 TGGAAGACTTATTAATGCCCCCCCCCAACAAA**CACACACACACACACACACA**
CACACACACATATAATATATATATATAATATATATATATATATATATATATATTT
 TGTTAAACTTCTGCATGCGTATGTCAATGTCAAGTTTATTCCTGCATC[GTGCTTTAT
 CATGCAACGG]AATATTTGTAGATTTTTCTTCTAATGTAATGGCCATTTCTAGACTG
 TGGACGGTTTATGGATGGCGGATGCTGATTTGATTGGAATCAATTTCACTGACTTT
 TCTGATTAGTGGCCTAAATTTCTAGTTAGTAGGGAGCCATTTTTCGGCCCTTCTGTC
 CGTACTCATTGTTGCTGCAACAATTCAAGATGTCGTAGGGTTTCTTTACTAAGTCAA
 TAGGTGACAAATGTATGGTTAATTGGAGATGTTCTTCTTTGCTAGTGTGATCATTG
 TTGGTAATGCTTTCATACTCCAATAGATTCCAATTAAGTTGAACATGATACTAGT
 TTTATCAAGTTGAACAGAATCCGTGATCTGCCATATATGAGCAGATGCCTTCTGAA
 AATCTTTTA}ATGTCCTTGAACCTTTTCTCTATATCTATACTAATAATTTGTAATG
 TACGTTGACGTTTGTGAAGGTGATGGAAGTGAGATTGAGGCACTTTGCTGATG
 TGACTGGACAAAAGACTGTGCCCCAATGTCTTTATCGGGGCAAGCACATTGGTGGT
 TGTGATGGTACATTAGTACCTTATTTCCAAGATGTAATTTCCAATTAAGTTACTAG
 GATCCATGATCTTATTTACCTCTCTGCATTTGTTTTGTATCTGCAGCAACAACCTGCA
 TTGAACCAGAACGGCAAGCTTTGCTTCTTTGCTAACTGAAGCCGGAGCTGTTGCTAG
 TGTGCTGCTTAGAAGACCTTCAAGCATACTGTTGGATGAATTAATGCATGTTTCTGAA
 GCCATTATATAAATAAAGCAATGTTTGTAGTGTTCGTTTTCTTTCTGTTTGGAGA
 ATAAATTATGAATAGAAGCTTCGCTGGATTCTGTACTATATTATTATTGTGGAAGT
 CAACAAAATAAACTAGTCTGACCATCTTTTGTGCTGAAGAAGTCTCAGTCTGGCTCA
 AATTCTCCAAAGTCAGAACTCGTCTCCATCACTCGCAGTTAATCAAAAATTATCAAAT
 TCGCCAAGGACCAAAATTTAGCTTGAAGTGTGACTTAAACAAAATTCACAA
 GAATACCAATTGTAAGGTTTGTAGTGGTGAACATGGTCAGCAGATGCATCTTTAT
 GAGCTCTGGACCTTTTTCTAATAAGCTCTATTGCATAAGCTCTACCAGGCACCTGTG
 TTGCGCAGGGAAGCCGTCAGATATCCAATTCTCTTCTTCAAGCTCAGGAATGGTAG
 CATTACTGCTATGACCGTGAGAGTCGT

Figura 1. Sequência do Scaffold_1810: 1480672..1482685 (+ strand) class=match length=2014 (1212-bases) depositada no Phytozome¹¹. Estão contidos no Scaffold_1810: sequência dos domínios da Glutarredoxina (sublinhado); sequência do contig 846 delimitada por { }; sequência dos primers *forward* e *reverse* para amplificação do SSR-LEG2 delimitada por []; microssatélite (CA)_n em negrito e sombreado.

¹¹ Disponível em: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>.

Polimorfismo Bourbon Amarelo IAC-J10 (BB) x IAC-Mundo Novo IAC 379-19 (MN)	
BB R1	AATTGCACACACACACACACACACACACACATATATATGTATATAGTGTTAAACTTCT
BB R2	AATTGCACACACACACACACACACACACACATATATATGTATATAGTGTTAAACTTCT
BB R3	AATTGCACACACACACACACACACACACACATATATATGTATATAGTGTTAAACTTCT
BB R4	AATTGCACACACACACACACACACACACACATATATATGTATATAGTGTTAAACTTCT
MN R1	AATTGCACACACACACACACA-----TATATATGTATATAGTGTTAAACTTCT
MN R2	AATTGCACACACACACACACA-----TATATATGTATATAGTGTTAAACTTCT
MN R3	AATTGCACACACACACACACA-----TATATATGTATATAGTGTTAAACTTCT
MN R4	AATTGCACACACACACACACA-----TATATATGTATATAGTGTTAAACTTCT

→ Sequência de 'Bourbon Amarelo IAC J10' com SSR-LEG2 = (CA)₁₃ (primers sublinhados; SSR em azul):

GATAAAGACGCCTAATCCATTTTCTGGGCGGAAGACTTATTAATTGCACACACACACACACACACACATATATATGTATATAGTGTTAAACTTCTGCATGCGTATGTCAAATTCAGTTTATTCCTGCATCTGTGCGTTTATCATCGAACGG (154 bases)

→ Sequência de 'Mundo Novo IAC 379-19' com SSR-LEG2 = (CA)₉ (primers

sublinhados; SSR em vermelho):

GATAAAGACGCCTAATCCATTTTCTGGGCGGAAGACTTATTAATTGCACACACACACACACATATATATGTATATAGTGTTAAACTTCTGCATGCGTATGTCAAATTCAGTTTATTCCTGCATCTGTGCGTTTATCATGCAACGG (146 bases)

Figura 2. Fragmento polimórfico do SSR-LEG2 sequenciado pelo método de Sanger para amostras de 'Bourbon Amarelo IAC J10' e 'Mundo Novo IAC 379-19' e sequências da banda polimórfica para o SSR-LEG2.

Os padrões de amplificação do microsatélite LEG2 nas cultivares Bourbon Vermelho IAC 662, Bourbon Amarelo IAC J10, Typica (Nacional), Ibairi IAC 4761, Amarelo de Botucatu, Laurina IAC 870 e Icatu Vermelho IAC 4046 podem ser vistos em duplicata na Figura 3. Nesse gel podem ser visualizadas duas bandas: uma é maior, com aproximadamente 200 pb, podendo ser considerada como um controle da amplificação do SSR-LEG2, por ser monomórfica e estar presente em todos os indivíduos; a outra banda é menor, polimórfica, com tamanhos que podem variar de 146 pb a 154 pb, diferenciando-se as cultivares Bourbon Vermelho, Bourbon Amarelo, Typica e Amarelo de Botucatu das cultivares Catuaí Vermelho IAC 144, Ibairi IAC 4761, Laurina IAC 870 e Icatu Vermelho IAC 4046. Por sua vez, as variedades mais antigas, como Typica e Amarelo de Botucatu, apresentam o mesmo padrão do SSR-LEG2 observado para os cafés do grupo Bourbon. Isso é esperado, já que as variedades Typica e Bourbon possuem a mesma origem genética em populações de cafés silvestres transferidas da Etiópia para o Yemen (Anthony et al., 2002); enquanto a cultivar Amarelo de Botucatu, que foi identificada em 1871, é uma mutação da cultivar Typica no Brasil (Mendes et al., 2007). Typica e Amarelo de Botucatu são cultivares pouco representativas

tanto do parque cafeeiro brasileiro quanto dos materiais elites dos programas de melhoramento. Elas terão pouco impacto no alcance do objetivo deste trabalho que é a obtenção de um método simples e rápido para checagem de pureza genética de amostras de sementes ou folhas das cultivares do grupo Bourbons.

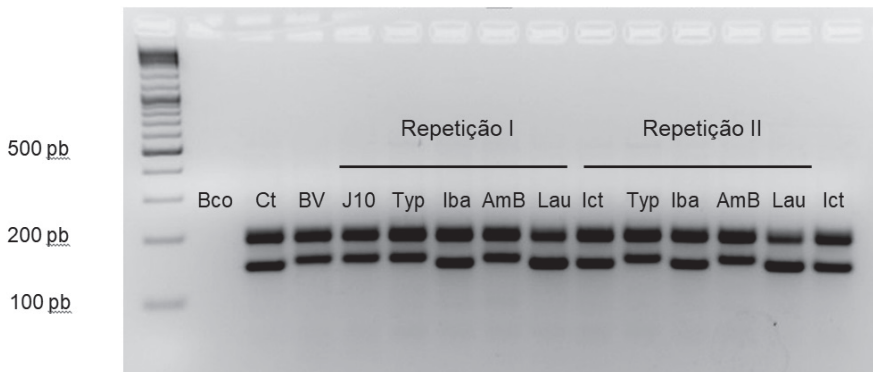


Figura 3. Amplificação do microssatélite SSR-LEG2, em duplicata, em folhas das seguintes cultivares: Catuaí Vermelho IAC 144 (Ct); Bourbon Vermelho IAC 662 (BV); Bourbon Amarelo IAC J10 (J10); Typica (Nacional) (Typ); Ibairi IAC 4761 (Iba); Amarelo de Botucatu (AmB); Laurina IAC 870 (Lau); Icatu Vermelho IAC 4046 (Ict).

As cultivares do IAC representam 90% do café plantado no Brasil e 70% no mundo (Giomo et al., 2017). A cultivar Bourbon Vermelho contribuiu com 52,76% da base genética de 121 cultivares brasileiras de *C. arabica*, e uma das razões para a baixa variabilidade genética é a origem genética similar dessas cultivares (Setotaw et al., 2013). Essa estreita base genética do café arábica dificulta a identificação de polimorfismos em marcadores moleculares. Apesar disso, o polimorfismo para o microssatélite LEG2 foi verificado entre todas as cultivares do grupo Bourbon e as cultivares mais plantadas no País, aqui representadas por ‘Catuaí Vermelho IAC 44’, ‘Catuaí Amarelo IAC 62’ e ‘Mundo Novo IAC 379-19’ (Figura 4). Até então, não era possível a diferenciação de cafés do grupo Bourbon em relação aos dos grupos Catuaí e Mundo Novo com a resolução determinada pela eletroforese em gel de agarose. Essa técnica é extremamente simples e pode ser utilizada em qualquer laboratório de biologia molecular com infraestrutura mínima de

um termociclador, uma cuba para a eletroforese e uma fonte de luz UV. O SSR-LEG2 foi então amplificado em outras cultivares (Caturra Amarelo IAC 476, IAC Ouro Verde, IAC Obatã 4739, e IAC 125 RN), permitindo verificar a reprodutibilidade da técnica e o polimorfismo entre essas cultivares e aquelas do tipo Bourbon (Figura 4). A exceção foi observada para 'Tupi IAC1669-33', que apresentou o mesmo padrão para o SSR-LEG2 amplificado nas cultivares do grupo Bourbon. Essa cultivar é derivada do híbrido 'Villa Sarchi' x Híbrido de Timor, sendo Villa Sarchi uma cultivar de porte baixo, mutante do Bourbon. A cultivar IAC Catuaí SH3 mostrou heterozigose para a banda polimórfica, pois o DNA não foi obtido de uma linha pura, e sim de material ainda em segregação no campo. Novas avaliações demonstraram a fixação da banda polimórfica de 'IAC Catuaí SH3' em relação aos do grupo Bourbon.

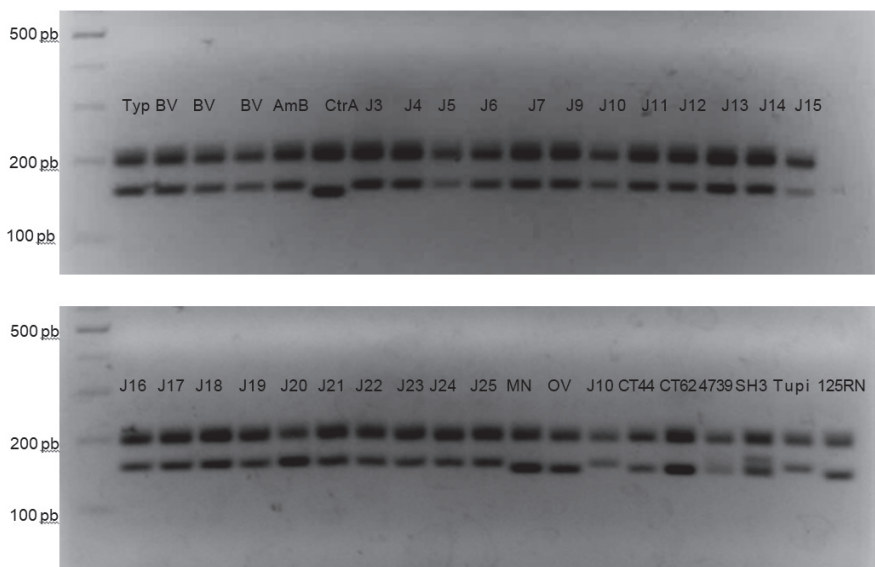


Figura 4. Microsatélite LEG2 amplificado no DNA de amostras de folhas e submetido à eletroforese em gel de agarose 4%. Cultivares de café arábica do Instituto Agronômico, Campinas, SP: Typica (Nacional) (Typ); Bourbon Vermelho IAC 662 (BV); Amarelo de Botucatu (AmB); Caturra Amarelo IAC 476 (CtrA); Bourbon Amarelo IAC J – “seguir nº no gel” (J); Mundo Novo IAC 379-19 (MN); IAC Ouro Verde (OV); Catuaí Vermelho IAC 44 (CT44); Catuaí Amarelo IAC 62 (CT62); IAC Obatã 4739 (4739); IAC Catuaí SH3 (SH3); Tupi IAC1669-33 (Tupi); IAC 125 RN (125RN).

A amplificação do SSR-LEG2 também foi realizada em amostras cujo DNA foi obtido de folhas e sementes (Figura 5). Onze amostras de sementes, com umidade em torno de 12%, foram colhidas na Fazenda Recreio, em São Sebastião da Gramma, SP, e enviadas ao laboratório em pacotes selados, numeradas, mas sem a identificação da cultivar ou das misturas de cultivares. Essa identificação foi revelada somente após a análise da amplificação e a eletroforese do microssatélite LEG2 em gel de agarose 4%. As amostras de sementes (S) fornecidas e identificadas pelo proprietário da fazenda eram as seguintes: Bourbon Amarelo 2000 (S3); Bourbon Amarelo (S4); Icatu Amarelo Precoce IAC 3282 (S6); Mundo Novo (S8); Catuaí Vermelho IAC 144 (S9); Catuaí Amarelo IAC 62 (S10); Catuaí Amarelo 2SL (S11); Acaia (S12). Foram ainda realizadas misturas de quantidades iguais do DNA na proporção de 50% e 25% para as amostras "Sm" como segue: $Sm3 = (S3 + S9)$; $Sm4 = (S4 + S6)$; $Sm5 = (S4 + S6 + S8 + S10)$. Como esperado, o marcador SSR-LEG2 diferenciou as amostras do grupo Bourbon das demais cultivares cujas amostras foram oriundas de sementes. Foi possível ainda detectar mistura de até 50% das cultivares Bourbon Amarelo 2000 e Catuaí Vermelho IAC 144, bem como de Bourbon Amarelo 2000 e Icatu Amarelo IAC3282 nas amostras fornecidas pelo produtor. Nas amostras de folhas obtidas da Fundação Procafé (amostras "L"), observa-se que tanto 'Catuaí Vermelho 36/6' (L4) quanto 'Acauã' (L10) apresentam um padrão de heterozigose para o alelo do SSR-LEG2. Já a cultivar Sabiá Tardio não é diferenciada do grupo Bourbon pelo SSR-LEG2. As cultivares de café arábica da Fundação Procafé (Catuaí Vermelho 785-15, Catuaí Amarelo 2SL, IBC-Palma 1, Palma 2, Clone 12, Clone 3 e Arara) apresentaram perfil do loco SSR-LEG2 diferente do observado no grupo Bourbon.

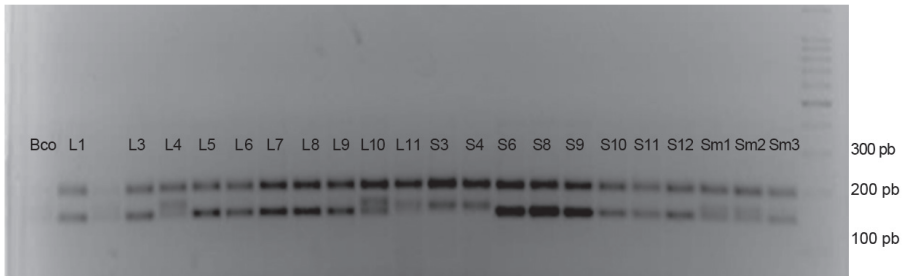


Figura 5. SSR-LEG2 amplificado em DNA obtido de amostras de folhas (L) de cultivares de café arábica da Fundação Procafé e de amostras de sementes (S) da Fazenda Recreio: branco (Bco); L = Catucaí Vermelho 785-15 (L1), Catucaí Amarelo 2SL (L3), Catucaí Vermelho 36/6 (L4), IBC-Palma 1 (L5), IBC-Palma 2 (L6), Clone 12 (L7), Clone 3 (L8), Arara (L9), Acauã (L10), Sabiá tardio (L11), Bourbon Amarelo 2000 (S3), Bourbon Amarelo (S4), Icatu Amarelo Precoce IAC 3282 (S6), Mundo Novo (S8), Catuai Vermelho IAC 144 (S9), Catuai Amarelo IAC 62 (S10), Catucaí Amarelo 2SL (S11), Acaiaí (S12). “Sm” são misturas de quantidades iguais do DNA de Sm1 = (S3 + S9), Sm2 = (S4 + S6), Sm3 = (S4 + S6 + S8 + S10).

Marcadores de DNA podem ser utilizados para atestar a pureza genética e varietal de cultivares. Entre suas principais vantagens citam-se as seguintes: não são influenciados pelo ambiente e permitem a detecção a partir de qualquer tecido ou órgão da planta. A biologia molecular tem avançado rapidamente e busca superar limitações como o baixo polimorfismo observado entre os genótipos de café arábica. Entre as cultivares do IAC, o SSR-LEG2 não pôde diferenciar o grupo Bourbon da variedade Typica e do Amarelo de Botucatu (essas cultivares são mais antigas e pouco plantadas no País), nem da cultivar Tupi IAC 1669. Das cultivares da Fundação Procafé, apenas ‘Sabiá Tardio’ apresentou o mesmo padrão de amplificação do SSR-LEG2 em gel de agarose.

A confirmação de materiais do grupo Bourbon em campo é outra aplicação que pode ser realizada com a utilização do SSR-LEG2. Uma vez que *C. arabica* é uma espécie autógama, os próprios produtores costumam multiplicar seus melhores materiais identificados como do grupo Bourbon, os quais, muitas vezes, podem ser confundidos com outros materiais de porte alto, como Mundo Novo, por exemplo. Esse foi o caso de uma análise de amostras de folhas coletadas nas áreas experimentais de Franca e Brodowski no estado de SP. O alelo SSR-LEG2 ligado ao grupo Bourbon foi encontrado apenas nas amostras oriundas de Franca, não sendo observado nas 43 amostras de Brodowski. Do total das 182 amostras de Franca amplificadas com o marcador SSR-LEG2, o alelo do grupo Bourbon foi observado em apenas 67 amostras.

Conclusões

O marcador SSR-LEG2 pode ser incorporado em análises de pureza genética de amostras de folhas ou sementes de cultivares de *C. arabica*, visando ao controle de qualidade de estoques genéticos de materiais elites de programas de melhoramento, bem como à checagem da pureza de sementes/grãos verdes destinados à comercialização. A técnica aqui apresentada é caracterizada pela simplicidade e rapidez, podendo ser resumida da seguinte forma: Extração do DNA de folhas ou sementes → Amplificação da marca SSR-LEG2 no DNA das amostras e de pelo menos duas referências conhecidas que amplifiquem os dois alelos desse microssatélite (ex.: Bourbon e Catuaí) → Eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídeo (outra opção de coloração pode ser o GelRed) e visualização sob luz UV.

Agradecimentos

À parceria entre Embrapa Café e Instituto Agronômico (IAC) de Campinas viabilizada na estrutura do Consórcio Pesquisa Café. Ao apoio financeiro do Consórcio Pesquisa Café. À Fundação Procafé e ao pesquisador doutor Carlos Henrique S. Carvalho da Embrapa Café pelas amostras de sementes genéticas de seus materiais. Ao Diogo Dias T. de Macedo pelo fornecimento de amostras de sementes colhidas nas lavouras de cafés especiais da Fazenda Recreio, em São Sebastião da Grama, SP.

Referências

- ANTHONY, F.; QUIROS, O.; TOPART, P.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P. Detection by simple sequence repeat markers of introgression from *Coffea canephora* in *Coffea arabica* varieties. **Plant Breeding**, v. 121, n. 6, p. 542-544, Dec. 2002. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.00748.x>.
- CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 14 p. (IAC. Documentos, n. 34).
- CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C. Café. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. A. (ed.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico**. Campinas: Instituto Agronômico, 1993. p. 29-76.
- CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M. N.; WILSON, K. C. (ed.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. Wetsport: AVI Publishing, 1995. p. 1347.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. **Relatório mensal de exportações**: outubro 2020. 20 p. Disponível em: <https://www.cecfafe.com.br/publicacoes/relatorio-de-exportacoes/>. Acesso em: 18 nov. 2020.

DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M. F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357-377, Dec. 2011. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EL-KEREAMY, A.; BI, Y.-M.; MAHMOOD, K.; RANATHUNGE, K.; YAISH, M. W.; NAMBARA, E.; ROTHSTEIN, S. J. Overexpression of the CC-type glutaredoxin, OsGRX6 affects hormone and nitrogen status in rice plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 2015. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00934>.

FAZUOLI, L. C.; CARVALHO, C. H. S.; CARVALHO, G. R.; GUERREIRO-FILHO, O.; PEREIRA, A. A.; ALMEIDA, S. R.; MATIELLO, J. B.; BARTHOLO, G. F.; SERA, T.; MOURA, W. M.; MENDES, A. N. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; NACIF, A. P.; SILVAROLLA, M. B. Cultivares de café arábica (*Coffea arabica* L.). In: CARVALHO, C. H. S. (ed.). **Cultivares de café**. Brasília, DF: Embrapa, 2007. p. 125-198.

GIOMO, G. S.; MISTRO, J. C.; PEREIRA, S. P. Cafés do Brasil: do IAC para o mundo. **O Agrônomo**, v. 69, 22 jun. 2017. Disponível em: <http://oagronomico.iac.sp.gov.br/?p=874>. Acesso em: 21 out. 2021.

GUO, Y.; HUANG, C.; XIE, Y.; SONG, F.; ZHOU, X. A tomato glutaredoxin gene SIGRX1 regulates plant responses to oxidative, drought and salt stresses. **Planta**, v. 232, p. 1499-1509, 2010. DOI <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1271-1>.

HAILE, M.; KANG, W. H. Transcriptome profiling of the coffee (*C. arabica* L.) seedlings under salt stress condition. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 45, p. 45-54, Mar. 2018. DOI <https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.1.045>.

HOLMGREN, A.; ASLUND, F. Glutaredoxin. In: PACKER, L. (ed.). **Methods in enzymology**. Academic Press, 1995. v. 252, p. 283-292. DOI [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52031-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52031-7).

JEGADEESAN, S.; CHATURVEDI, P.; GHATAK, A.; PRESSMAN, E.; MEIR, S.; FAIGENBOIM, A.; RUTLEY, N.; BEERY, A.; HAREL, A.; WECKWERTH, W.; FIRON, N. Proteomics of heat-stress and ethylene-mediated thermotolerance mechanisms in tomato pollen grains. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, Nov. 2018. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01558>.

JUNG, J.-Y.; AHN, J. H.; SCHACHTMAN, D. P. CC-type glutaredoxins mediated plant response and signaling under nitrate starvation in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 281, 2018. DOI <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1512-1>.

KUMAR, A.; DUBEY, A. K.; KUMAR, V.; ANSARI, M. A.; NARAYAN, S.; MEENAKSHI; KUMAR, S.; PANDEY, V.; SHIRKE, P. A.; PANDE, V.; SANYAL, I. Over-expression of chickpea glutaredoxin (CaGrx) provides tolerance to heavy metals by reducing metal accumulation and improved physiological and antioxidant defence system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, 110252, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110252>.

LILLIG, C. H.; BERNDT, C.; HOLMGREN, A. Glutaredoxin systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1304-1317, Nov. 2008. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.06.003>.

MENDES, A. N. G.; CARVALHO, G. R.; BOTELHO, C. E.; FAZUOLI, L. C.; SILVAROLLA, M. B. História das primeiras cultivares de café plantadas no Brasil. In: CARVALHO, C. H. S. (ed.). **Cultivares de café**. Brasília, DF: Embrapa, 2007. p. 57-64.

MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Genética e melhoramento do cafeeiro**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 99 p.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellite are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, n. 2, p. 194-200, 2002. <https://doi.org/10.1038/ng822>.

PEREIRA, G. S.; PADILHA, L.; VON PINHO, E. V. R.; TEIXEIRA, R. de K. S.; CARVALHO, C. H. S. de; MALUF, M. P.; CARVALHO, B. L. de. Microsatellite markers in analysis of resistance to coffee leaf miner in Arabica coffee. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 12, p. 1650-1656, Dec. 2011. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011001200010>.

PEREIRA, G. S.; VON PINHO, É. V. de R.; PADILHA, L.; VILELA, L. de R.; CARVALHO, B. L.; VON PINHO, I. V. Coleta de folhas do cafeeiro e extração de DNA genômico de alta qualidade. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6., 2009, Vitória, ES. **Inovação científica, competitividade e mudanças climáticas**: anais. Vitória: Consórcio Pesquisa Café, 2009. 4 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44122/1/Coleta-de-folhas-do-cafeeiro.pdf>. Acesso em: 21 out. 2021.

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J. P. Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 1266-1277, May 2004. DOI <https://doi.org/10.1007/s00018-004-3410-y>.

ROUHIER, N.; LEMAIRE, S. D.; JACQUOT, J.-P. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 143-166, 2008. DOI <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092811>.

SETOTAW, T. A.; CAIXETA, E. T.; PEREIRA, A. A.; OLIVEIRA, A. C. B. de; CRUZ, C. D.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Coefficient of parentage in *Coffea arabica* L. cultivars grown in Brazil. **Crop Science**, v. 53, n. 4, p. 1237-1247, 2013. DOI <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.09.0541>.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, May 1984. DOI <https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4127>.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A. MORAES, A. H. de A.; METHA, A.; OLIVEIRA, A. C. de; LABATE, C. A.; MARINO, C. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. de B.; MONTE, D. C.; GIGLIOTI, E.; KIMURA, E. T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; ALMEIDA, E. R. P. de; JORGE, E. C.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; SILVA, F. R. da; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H. E.; DORRY, H. F. A.; CARRER, H.; ABREU, I. N.; BATISTA, J. A. N.; TEIXEIRA, J. B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K. G.; LIMA, L. M. de; CAMARGO, L. E. A. de; PEREIRA, L. F. P.; COUTINHO, L. L.; LEMOS, M. V. F.; ROMANO, M. R.; MACHADO, M. A.; COSTA, M. M. do C.; SÁ, M. F. G. de; GOLDMAN, M. H. S.; FERRO, M. I. T.; TINOCO, M. L. P.; OLIVEIRA, M. C.; VAN SLUYS, M-A.; SHIMIZU, M. M.; MALUF, M. P.; EIRA, M. T. S. da; GUERREIRO FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P. D. S. C.; OLIVEIRA, R. L. B. C. de; HAKAKAVA, R.; BALBAO, S. F.; TSAI, S. M.; MAURO, S. M. Z. di; SANTOS, S. N.; SIQUEIRA, W. J.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

Embrapa

Café



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

