



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCOS RAFAEL PEREIRA E SILVA

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E
DENTRO DE CULTIVARES DE CAFÉ (*COFFEA ARABICA* L.)
ACESSADOS POR MARCADORES AFLP**

Londrina
2014

MARCOS RAFAEL PEREIRA E SILVA

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E
DENTRO DE CULTIVARES DE CAFÉ (*COFFEA ARABICA* L.)
ACESSADOS POR MARCADORES AFLP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586a	Silva, Marcos Rafael Pereira e. Avaliação da variabilidade genética entre e dentro de cultivares de café (<i>Coffea arabica</i> L.) acessados por marcadores AFLP/ Marcos Rafael Pereira e Silva. – Londrina, 2014. 62 f.: il. Orientador: Paulo Maurício Ruas. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2014. Inclui bibliografia 1. Café – Melhoramento genético – Teses. 2. Híbridaçã vegetal – Teses. 3. Polimorfismo (Genética) – Teses. I. Ruas, Paulo Maurício. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título. CDU 631.52:633.73
-------	--

MARCOS RAFAEL PEREIRA E SILVA

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE
CULTIVARES DE CAFÉ (*COFFEA ARABICA* L.) ACESSADOS POR
MARCADORES AFLP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador. Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 21 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas, pela orientação, atenção e paciência.

Ao Dr. Tumoru Sera, pelas inúmeras ajudas com relação às informações dos materiais e sobre o melhoramento do café.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR).

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

À chefia do departamento de Agronomia e Biologia Geral, e ao programa de pós-graduação em Agronomia.

Aos meus pais, Antônio Carlos e Vera, e às minhas irmãs, Kelly e Michele, pelo incentivo em todos os momentos passados no mestrado. Sem o apoio de vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Agronomia.

Aos estagiários e colegas de laboratório: Camila Ronchi, Camila Chaves, Gabriela, Sara, Kátia, Eduardo, Nataiane, Bruna Góes, Bruna Dall'Oglio e Ana Paula, pela grande amizade e aprendizado, e que de alguma forma ajudaram muito neste trabalho, em especial à Kátia pela paciência das inúmeras idas e vindas do sequenciador, e à Camila Chaves pela grande ajuda nas análises estatísticas. Sou muito grato à vocês!

À Dr^a. Ana Paula Silva Campos Gaino, pela co-orientação e amizade durante esta caminhada.

Aos ex-colegas de laboratório de quando eu ainda era estagiário: André, Bruno, Bruna, Diana, Carina, Laís, Luana, Leo, Jéssica, Natália, Tiago, em especial à Luana e Leo, pela inúmeras ajudas prestadas na produção do artigo.

À minha namorada, Karina, pelo companherismo, amor e carinho em todos os momentos nesta caminhada. Te amo!

Ao Dr. Eduardo Augusto Ruas e Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves por aceitarem o convite de participarem como membro da banca examinadora desta dissertação.

Aos meus amigos que, durante este período, não tive muito contato: Rodney, Rodrigo e Lincoln.

À Deus.

SILVA, Marcos Rafael Pereira. **Avaliação da variabilidade genética entre e dentro de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) acessados por marcadores AFLP.** 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) foi utilizada para acessar a variabilidade e distância genética de 15 populações de *Coffea arabica* L., obtidas do cruzamento de *C. arabica* x *C. canephora* e *C. arabica* x *C. liberica*, com uma amostragem de 20 plantas por população. Duas combinações de *primers* seletivos de AFLP (*EcoRI*-AAC/*MseI* CTAG e *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAAG) geraram 731 bandas. Entre as populações estudadas, a cultivar IPR 100 apresentou a maior variabilidade genética, determinada pelo número de locos polimórficos (276), porcentagem de locos polimórficos (37,75%) e diversidade gênica de Nei (0,22) seguidas das cultivares IPR 97 (351, 48,01% e 0,20) e IPR 104 (327, 44,73% e 0,20). Pela análise de variância molecular (AMOVA), 16,13% da variabilidade genética encontra-se entre populações, enquanto 83,87% distribui-se dentro das populações. Valores de F_{ST} par a par entre as populações mostraram que a maior distância encontrada foi de 0,330 entre as cultivares IPR 97 e IPR 102 e a menor distância (-0,001) foi entre as cultivares IPR 101 e IPR 105, as quais não se diferenciaram. Verificou-se que cultivares com diferentes números de gerações de seleção não apresentaram grandes diferenças na taxa de variabilidade genética e as cultivares de origens semelhantes mostraram taxas diferentes de variabilidade genética entre e dentro dessas populações. Os dados deste trabalho podem ser utilizados em futuros programas de melhoramento genético de *C. arabica*

Palavras-chave: Distância genética. Híbridos. Marcador molecular. Polimorfismo genético.

SILVA, Marcos Rafael Pereira. **Evaluate of genetic variability among and within coffee cultivars (*Coffea arabica* L.) using AFLP markers.** 2014. 62 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) - University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The AFLP technique (Amplified Fragment Length Polymorphism) was used to access the genetic variability of 15 populations in different generations of selection of *Coffea arabica* L. Several of these populations were obtained by crossing of *C. arabica* with *C. canephora* or *C. arabica* with *C. liberica*. Two selective AFLP primers combinations (*Eco*RI-AAC/*Mse*I CTAG e *Eco*RI-AAC/*Mse*I-CAAG) generated 731 bands. Among the populations studied, the cultivar IPR 100 showed the greatest genetic variability, determined by the number of polymorphic loci (276), percentage of polymorphic loci (37.75%) and Nei's gene diversity (0.22), followed by IPR 97 (351, 48,01% e 0,20) and IPR 104 (327, 44,73% e 0,20). The molecular analysis of variance (AMOVA) revealed that 16.13% of the genetic variability was found among populations, while 83.87% was distributed within populations. Values of pairwise F_{ST} among populations showed that the greatest distance was 0.330 between IPR 97 and IPR 102 and the shortest distance (-0.001) was between IPR 101 and IPR 105. Cultivars with similar genetic background showed different levels of genetic variability. It was also observed that cultivars with different numbers of generations of selection did not show big differences in its genetic variability. Data from this study can be used in future breeding programs of *C. arabica*.

Keywords: Genetic distance. Hybrids. Molecular markers. Genetic polymorphism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das 15 cultivares de <i>Coffea arabica</i> , suas respectivas gerações de seleção e genealogias.	35
Tabela 2 – Número de locos polimórficos, porcentagem de locos polimórficos, diversidade de Nei (1978) das 15 cultivares de <i>Coffea arabica</i>	38
Tabela 3 – Análise da variância molecular (AMOVA) entre e dentro das 15 populações de <i>Coffea arabica</i>	39
Tabela 4 – Distância genética pelo FST par a par entre as 15 populações de <i>Coffea arabica</i>	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Etapas de reação da técnica de marcadores moleculares AFLP.29
- Figura 2** – Dendrograma construído com base na distância genética de Nei (1978) pelo método UPGMA entre os 20 indivíduos de cada cultivar. A. IPR 97; B. IPR 98; C. IPR 99; D. IPR 100; E. IPR 101; F. IPR 102; G. IPR 103; H. IPR 104; I. IPR 105; J. IPR 106; K. IPR 107; L. IPR 108; M. IAPAR 59; N. Catuaí Vermelho IAC-99; O. Obatã IAC 1669-20.41
- Figura 3** – Dendrograma construído com base na distância genética de Nei (1978) pelo método UPGMA para as 15 cultivares de Coffea arabica.45
- Figura 4** – Estrutura genética das cultivares inferidas pela análise Bayesiana. O eixo y indica a porcentagem de membros em cada agrupamento k. As cultivares estão indicadas no eixo x.46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	HISTÓRICO	12
2.2	A ESPÉCIE COFFEA ARABICA L.	13
2.3	ORIGEM DAS CULTIVARES EM ESTUDO	15
2.3.1	IPR 97	15
2.3.2	IPR 98	15
2.3.3	IPR 99	16
2.3.4	IPR 100	16
2.3.5	IPR 101	16
2.3.6	IPR 102	17
2.3.7	IPR 103	17
2.3.8	IPR 104	17
2.3.9	IPR 105	18
2.3.10	IPR 106	18
2.3.11	IPR 107	18
2.3.12	IPR 108	19
2.3.13	IAPAR 59	19
2.3.14	Catuaí Vermelho IAC-99	19
2.3.15	Obatã IAC 1669-20	20
2.4	RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO DO CAFÉ	20
2.5	MARCADORES MOLECULARES	23
2.5.1	Aplicação do Uso de Marcadores Moleculares no Gênero Coffea com Ênfase nos Marcadores AFLP	25
2.5.2	AFLP (Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados).....	27
3	ARTIGO A: AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE CULTIVARES DE CAFÉ (Coffea arabica L.) ACESSADOS POR MARCADORES AFLP	30
3.1	INTRODUÇÃO	31

3.2	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.2.1	Coleta de Material Vegetal	34
3.2.2	Extração e Quantificação do DNA.....	35
3.2.3	Reações de AFLP	36
3.2.4	Preparações das Amostras para eletroforese Capilar em Sistema Automatizado	36
3.2.5	Análise Estatística.....	37
4	RESULTADOS.....	38
5	DISCUSSÃO	47
	CONCLUSÕES	51
	AGRADECIMENTOS	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de café no Brasil, introduzido em 1727 (MENDES; GUIMARÃES, 1998), se espalhou rapidamente pelo país por razão de suas condições climáticas favoráveis, fazendo com que o café logo se tornasse um produto-base da economia brasileira (ABIC, 2011). O país é o maior produtor mundial de café e segundo maior consumidor, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor nacional, e o Paraná responsável por 4,2% de toda produção em 2011 (ICO, 2011).

A espécie *Coffea arabica* L. é considerada a mais importante economicamente do gênero *Coffea*, contudo, possui uma base genética muito estreita (FERWERDA, 1976; VOSSSEN, 1985), diferentemente de *Coffea canephora*, que por ser uma espécie alógama, apresenta uma maior variabilidade genética.

Materiais geneticamente melhorados envolvem muitas vezes, análises complexas de características agrônômicas, o que torna difícil a seleção pelo grande número de genes envolvidos. Com isso, estratégias de melhoramento, tais como uso de marcadores moleculares, podem tornar os programas de melhoramentos mais eficientes (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004). Assim, o uso de marcadores moleculares para acessar o nível de variação genética, bem como sua distribuição entre e dentro de populações assume grande importância por permitir o direcionamento das estratégias de melhoramento, visando maximizar os ganhos genéticos através dos ciclos de seleção (DIAS, 1998).

A variabilidade genética conservada nos bancos de germoplasma tem de ser caracterizada e identificada, e o uso de características morfoagronômicas, para tal, traz dificuldades e desvantagens. Diante disto, a seleção assistida por marcadores moleculares têm sido utilizadas com frequência para um rápido e eficiente acesso à variabilidade genética em bancos de germoplasma e programas de melhoramento de várias espécies vegetais (RAFALSKI; TINGEY, 1993). Dentre elas, há a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), que alia simplicidade de obtenção de grande quantidade de marcadores sem necessidade de um sequenciamento prévio.

Neste contexto, o objetivo do estudo foi verificar, por meio de marcadores moleculares AFLP, a variabilidade genética entre e dentro de diferentes

cultivares de *Coffea arabica* em diferentes gerações de seleção, bem como verificar a distância genética entre as mesmas com o intuito de utilizar estes materiais em futuros programas de melhoramento genético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Originário da Abissínia, hoje Etiópia (em uma região conhecida como Kaffa), o cafeeiro foi uma planta descoberta por um pastor árabe que percebeu um comportamento agitado de suas cabras após consumirem pequenos frutos vermelhos de um arbusto nativo (MATIELLI; RUGGIERO, 2005). Contudo, o consumo do café só foi mencionado pela primeira vez pelo médico árabe chamado Razes, no século X (SMITH, 1985), o qual era administrado como medicamento para o sono e fadiga (TAUNAY, 1939).

O consumo do café foi difundido inicialmente entre a comunidade árabe onde posteriormente se expandiu pelo Ocidente, Ásia, Indonésia, Américas, e África Tropical (MATIELLI; RUGGIERO, 2005). Ao fim do século XV, o café começou a ser comercializado na Europa, fazendo com que essa bebida fosse incluída na vida e costumes ocidentais onde até então, durante muito tempo a Arábia era praticamente a única região produtora e exportadora de café (TAUNAY, 1939).

A cultura cafeeira, no fim do século XVII e início do século XVIII, espalhou-se pelas Américas Central e do Sul através da propagação de uma única planta proveniente da Indonésia, cultivada no Jardim Botânico de Amsterdã (ANTHONY et al., 2001). As primeiras mudas de café no Brasil foram trazidas pelo Sargento-Mor Francisco de Mello Palheta, a pedido do governador do Maranhão e Grão Pará, da Guiana Francesa em 1727 (MATIELLI; RUGGIERO, 2005; MENDES; GUIMARÃES, 1998).

Em termos econômicos, a cultura cafeeira iniciou-se por volta de 1800 no estado do Rio de Janeiro. Através do Vale do Paraíba, a cultura do café introduziu-se no estado de São Paulo onde, em 1830, já havia grandes cultivos. Sendo, naquela época, cultura nômade, que exigia novas áreas mais férteis, foi responsável pelo desmatamento de quase todo o estado de São Paulo, implantando-se particularmente na região norte. Da mesma forma e pelas mesmas razões, alcançou o norte do estado do Paraná, que passou a ser grande região produtora desta cultura (JOLY; LEITÃO FILHO, 1979).

Devido às condições climáticas favoráveis, o cultivo de café no Brasil se espalhou de forma rápida, com produção voltada para o mercado interno. Em

pouco tempo, o café se tornou produto-base da economia brasileira onde, até então, ocupava uma posição relativamente secundária. Durante quase um século, o café foi a grande riqueza do país, onde seu desenvolvimento foi acelerado em virtude de divisas geradas pela economia cafeeira, inserindo o Brasil nas relações internacionais de comércio (ABIC, 2011).

De acordo com a Organização Internacional do Café (ICO, 2011) o Brasil é o maior produtor, seguido de Vietnam e Indonésia, e segundo maior consumidor de café do mundo, sendo o estado de Minas Gerais responsável por 51% da produção nacional e o estado do Paraná por 4,2% da produção de café no ano de 2011 (ABIC, 2011).

No Brasil, a produção total na safra 2010 foi de 48,09 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado, a qual representou um acréscimo de cerca de 22% em relação à safra anterior (CONAB, 2010). Já em relação à primeira estimativa de produção de café para a safra 2014, indica que o Brasil deverá colher entre 46,53 e 50,15 milhões de sacas de 60 quilos do produto beneficiado (CONAB, 2014).

2.2 A ESPÉCIE *COFFEA ARABICA* L.

A espécie *C. arabica* pode ter sido introduzido no lêmén por volta de 575 DC (WELLMAN, 1961) ou até mesmo de três a quatro séculos antes (ESKES, 1989). Conhecida anteriormente como *Jasminum arabicum*, Linnaeus renomeou a espécie produtora de café arábica como *Coffea arabica* (TAUNAY, 1939). Pertencente à família Rubiaceae, com $2n = 44$ cromossomos, é a única espécie alotetraplóide, e se reproduz por autofecundação (THOMAZIELLO et al., 2000), com taxa de reprodução cruzada de aproximadamente 10% (CARVALHO, 1988).

Devido sua reprodução predominantemente autógama, (KRUG; CARVALHO, 1951; FERWERDA 1976; CHARRIER; BERTHAUD, 1985; WRIGLEY, 1995), limitada área para seu desenvolvimento e origem considerada relativamente recente (LASHERMES et al., 1996), a espécie *C. arabica* possui estreita base genética (FERWERDA, 1976; VOSSSEN, 1985), diferentemente da espécie *Coffea canephora*, cuja auto-incompatibilidade e a forma de reprodução sexuada garantem uma maior variabilidade genética do que *C. arabica*. A base genética desta espécie é ainda mais estreita na América, devido à existência apenas de um pequeno

conjunto de variações genéticas no pool gênico da espécie neste continente (ANTHONY et al., 2002; BERTRAND et al., 2000). Através do uso de técnicas de citogenética e genética molecular, Lashermes et al. (1999), citado por Lashermes et al. (2000) sugeriram que o cruzamento entre *Coffea eugenioides*, como parental feminino, e *Coffea canephora*, ou ecótipos relacionados à estas duas espécies, possam ter originado a espécie *C. arabica*.

O café arábico tem como seu centro primário de divergência genética o sudoeste da Etiópia, na África, região montanhosa entre 1000 e 2000 metros de altitude conhecida como Kaffa. Posteriormente, a espécie foi disseminada à outras regiões como Arábia, Yémen e Egito e que algumas plantas também foram encontradas no Sudeste do Sudão e Norte do Quênia (ANTHONY et al., 2001).

Planta perene de porte arbustivo, o cafeeiro arábico produz frutos do tipo baga, constituído normalmente por duas sementes que representam o seu produto econômico. A fertilização ocorre 24 horas após a polinização e a primeira divisão de célula do endosperma se dá de 21-27 dias posterior à fertilização, sendo a primeira divisão do embrião de 60-70 dias após a polinização (THOMAZIELLO et al., 2000).

Por vários séculos, *C. arabica* tem sido cultivada e selecionada, proporcionando o desenvolvimento de variedades distintas. A origem da maioria das cultivares de café arábico, em todo o mundo, se deu por duas bases genéticas do Iêmen, descritas como duas variedades botânicas distintas: *C. arabica* var. *arabica* (normalmente chamado de *C. arabica* var. *typica* Cramer) e *C. arabica* var. *bourbon* (B. Rodr.) Choussy, denominadas Típica e Bourbon, respectivamente (KRUG; MENDES; CARVALHO, 1939; CARVALHO et al., 1969).

Considerada a espécie de maior interesse econômico, *C. arabica* constitui 70% da produção mundial (CEPLAC, 2010). Três variedades brasileiras são cultivadas, atualmente, em todo mundo por suas características de alta produtividade e por exibirem uma excepcional qualidade de bebida: Mundo Novo, Caturra e Catuaí (ANTHONY et al., 2001).

Apesar da base genética de *C. arabica* ser bastante limitada (BERTHAUD; CHARRIER, 1988), as cultivares comercializadas apresentam grande variabilidade botânica proporcionada por mutações, cruzamentos naturais e artificiais (KRUG; MENDES; CARVALHO, 1938).

2.3 ORIGEM DAS CULTIVARES EM ESTUDO

2.3.1 IPR 97

Cultivar derivada do germoplasma Sarchimor, tem como características porte pequeno, arquitetura compacta, ramificação melhor que IAPAR 59 e Tupi, alto vigor vegetativo com maturação semi precoce, e o tamanho dos grãos é semelhante à Mundo Novo. A cor dos brotos é verde e dos frutos é vermelha. Indicada preferencialmente para plantios adensados e superadensados em regiões de maiores altitudes, possui alta resistência à ferrugem. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₆. (SERA, comunicação pessoal).

2.3.2 IPR 98

Originada do cruzamento entre Villa Sarchi CIFC 971/10 e Híbrido de Timor CIFC 832/2, realizado no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, no qual recebeu a denominação de H 361. A geração F₂ (H361-4) foi recebida pelo IAC que denominou LC 1669. Em 1975, o IAPAR recebeu do IAC a geração F₃ (LC 1669 Ep127 c.31), que passou a ser denominada PR75163. Dessa progênie de 24 plantas, foi selecionada a planta 21, dando origem à progênie F₄, PR 75163-21, que deu origem à progênie F₅, PR LF 75163-21-10 (IPR 98) selecionada por ter maior ramificação.

Como características, as plantas provenientes desta cultivar são de pequeno porte, arquitetura compacta, ramificação abundante e alto vigor vegetativo com maturação semi tardia. O tamanho dos grãos é semelhante à Mundo Novo, e a cor dos brotos é verde e os frutos na cor vermelha. Selecionada na região do arenito, onde a fertilidade natural do solo é menor e a temperatura é mais elevada. Indicada preferencialmente para plantios adensados e superadensados em regiões com altitudes acima de 500m, possui alta resistência a ferrugem. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₆ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.3 IPR 99

Derivada do germoplasma Sarchimor, é uma planta de pequeno porte, arquitetura compacta, ramificada e tem alto vigor vegetativo com maturação semi tardia. O tamanho dos grãos é semelhante à Acaiá (cruzamento das variedades Sumatra e Bourbon Vermelho). A cor dos brotos é verde e dos frutos amarela. Esta cultivar destaca-se pela maturação mais uniforme e qualidade de bebida, sendo indicada preferencialmente para plantios adensados e superadensados em regiões de maiores altitudes. Possui moderada resistência à ferrugem. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₆ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.4 IPR 100

Originada de Catindú (Híbrido natural entre *C. arabica* x *C. liberica*, originado da Índia) (Catuaí x *C. arabica* portador de genes de *C. liberica*), tem porte médio e alto vigor vegetativo com maturação tardia e tamanho dos grãos semelhante à Catuaí. A cor do broto é bronze e dos frutos são vermelhos. Adaptada para solos pobres e temperaturas mais elevadas, possui moderada resistência à ferrugem e ao nematóide *M. paranaensis*. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₆ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.5 IPR 101

Originado de Catindú (Híbrido natural entre *C. arabica* x *C. liberica*, originado da Índia) (Catuaí x *C. arabica* portador de genes de *C. liberica*), tem porte médio e alto vigor vegetativo com maturação tardia e tamanho dos grãos maior do que da Acaiá. A cor do broto é verde e bronze e os frutos vermelhos. Indicada preferencialmente para plantios adensados e para mercados especiais que preferem grãos graúdos. Possui moderada resistência à ferrugem. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₇ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.6 IPR 102

Cultivar derivada do germoplasma Catuaí (Mundo Novo x Caturra) x Icatu (híbrido artificial interespecífico entre *C. arabica* e *C. canephora*). Seu porte é semelhante à Catuaí, tem alto vigor vegetativo com maturação mais tardia do que Catuaí e o tamanho dos grãos é semelhante à Catuaí. A cor dos brotos é verde e bronze e dos frutos é vermelha. Possui moderada resistência à ferrugem, sendo indicada preferencialmente para o escalonamento da colheita em regiões de menores altitudes e solos arenosos no estado do Paraná. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₈ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.7 IPR 103

Cultivar derivada do germoplasma Catuaí (Mundo Novo x Caturra) x Icatu (híbrido artificial interespecífico entre *C. arabica* e *C. canephora*), realizado pelo IAC. Em 1977, o material foi introduzido no IAPAR sob a denominação de IAC H 9878-EP 187, que passou a ser denominada IAPAR 77054. Por meio do método genealógico, foi selecionada a progênie IAPAR 77054-40, que deu origem à progênie F5 IAPAR LF 77054-40-10.

Como características, as plantas são de porte médio, menor que Catuaí, tem alto vigor vegetativo, com maturação tardia e tamanho dos grãos semelhante à Catuaí. A cor dos brotos é bronze claro e dos frutos, vermelho. Indicada preferencialmente para o plantio adensado em regiões de menores altitudes e solos arenosos no Paraná. Possui moderada resistência a ferrugem. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₇ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.8 IPR 104

Cultivar derivada do germoplasma Sarchimor, é de pequeno porte e ramificação melhor que do IAPAR 59. A maturação é semelhante à Mundo Novo, contudo o tamanho dos grãos é maior. A cor dos brotos é verde e dos frutos é vermelho. Possui resistência completa à ferrugem e é indicada preferencialmente para plantios adensados e superadensados em regiões com altitudes superiores a

500m. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₆ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.9 IPR 105

Resultou do cruzamento entre Catuaí x (H7314-4). O material H7314-4 foi trazido da Índia, sendo o material com tolerância à seca que resultou do cruzamento espontâneo entre o *C. arabica* e *C. liberica*.

Tem porte médio, alto vigor vegetativo com maturação super tardia e tamanho dos grãos semelhante à Mundo Novo. A cor do broto é bronze com frutos vermelhos. Indicada preferencialmente para plantios adensados em regiões com altitudes menores e/ou regiões quentes para escalonar a colheita e suportar melhor o calor e solos mais pobres. Possui moderada resistência à ferrugem. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₆ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.10 IPR 106

A IPR 106 é derivada do germoplasma Icatu (híbrido artificial interespecífico entre *C. arabica* e *C. canephora*).

Tem porte médio, maior que Catuaí e alto vigor vegetativo com maturação uniforme e tardia. O tamanho dos grãos é maior do que da Acaiá e a cor do broto é verde e bronze com frutos amarelos. Suscetível à ferrugem, possui resistência em grau moderado ao nematóide *M. paranaensis*. Indicada preferencialmente para áreas sujeitas à geada de irradiação nas regiões mais quentes do Paraná com a presença de *M. paranaensis*. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₈ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.11 IPR 107

A cultivar IPR 107 é derivada do cruzamento entre IAPAR 59 x Mundo Novo. Tem porte médio, alto vigor vegetativo com maturação semi precoce e tamanho dos grãos maior que Mundo Novo. A cor do broto é verde e bronze com frutos vermelhos. Indicada preferencialmente para o plantio adensado em regiões

com maiores altitudes no Paraná e possui resistência à ferrugem. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₄ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.12 IPR 108

Originada do cruzamento entre IAPAR 59 x Catuaí (Icatu x Catuaí), tem porte médio, alto vigor vegetativo com maturação tardia e tamanho dos grãos maior que Catuaí. A cor do broto é verde e bronze com frutos amarelos e possui resistência à ferrugem. Indicada preferencialmente para o plantio adensado com menores altitudes e solos arenosos no Paraná para o escalonamento da colheita. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₅ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.13 IAPAR 59

Originado do cruzamento entre Villa Sarchi CIFC 971/10 e Híbrido de Timor CIFC 832/2, realizado no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, onde recebeu a denominação de H 361. A geração F₂ (H361-4) foi recebida pelo IAC que denominou LC 1669. Em 1975, o IAPAR recebeu do IAC a geração F₃ (LC 1669 Ep127 c.506), que passou a ser denominada PR 75163. A progênie 75163-22 se destacou dando origem à cultivar IAPAR 59.

Apresenta arquitetura compacta e menor volume de copa, características desejáveis para adensamento de plantio. Os brotos são de cor bronze, com pequeno percentual de brotos verdes e frutos vermelhos. Precocidade de produção em relação à Catuaí e grãos maiores que Catuaí. Tem boa qualidade de bebida, semelhante à Catuaí. Suscetível à *Cercóspora*, bicho mineiro e *Pseudomonas*, e resistente ao nematóide *M. exigua*, é indicada para regiões mais frias, chuvosas e solo mais argiloso ou com mais matéria orgânica, considerada ideal para plantios adensados e superadensados, ideal 0,5m entre plantas. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₆ (SERA, comunicação pessoal).

2.3.14 Catuaí Vermelho IAC-99

Originou-se como produto de recombinação a partir de um cruzamento artificial entre cafeeiros selecionados, pela produtividade, das cultivares

Caturra Amarelo e Mundo Novo. A hibridação foi realizada em Campinas, em 1949 e o híbrido recebeu o prefixo IAC H 2077. Estas cultivares são suscetíveis à ferrugem e aos nematoides, mas possuem elevado vigor. O sistema radicular é bem desenvolvido. As folhas novas são de cor verde-clara e as adultas, verde-escuro brilhante. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₅ (CARVALHO, 2008).

2.3.15 Obatã IAC 1669-20

É derivada do cruzamento entre Villa Sarchi 971/10 com o Híbrido de Timor 832/2, o qual gerou o híbrido F1 (H 361/4), realizado pelo Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Oeiras, Portugal. Apresenta elevada resistência à ferrugem, é indicada preferencialmente para plantios adensados. O material tornou-se cultivar na geração de seleção F₆ (CARVALHO, 2008).

2.4 RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO DO CAFÉ

Com o início das pesquisas com o cafeeiro, houve algumas preocupações, e uma delas foi em relação ao estabelecimento de um banco de germoplasma contendo as variedades e variações de *C. arabica* e também as espécies já existentes, com o objetivo de preservação e estudo do ponto de vista evolutivo, taxonômico e quanto à possibilidade de seu aproveitamento no melhoramento (CARVALHO; FAZUOLI, 1984). De extrema importância, estas coleções podem revelar relações interespecíficas dentro do gênero *Coffea* e também dar uma idéia global da variabilidade (CARVALHO; FAZUOLI, 1984; CHARRIER, 1978).

Em programas de melhoramento, híbridos naturais e artificiais derivados do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora* têm sido intensivamente empregados. O Híbrido de Timor, o qual tem sido utilizado como uma ponte para transferência de genes de resistência à ferrugem de *C. canephora* para cultivares de *C. arabica*, é um bom exemplo disto (FAZUOLI et al., 1996).

A variabilidade conservada nos bancos de germoplasma deve ser caracterizada e identificada, sendo realizado na maioria das vezes mediante uso de

características morfoagronômicas. Sendo tais características muito influenciadas pelo ambiente e de expressão tardia, apresentam uma série de dificuldades e desvantagens, onde, diante disto, as técnicas moleculares são importantes ferramentas para um rápido e eficiente acesso à variabilidade genética que vem sendo utilizados em bancos de germoplasma e programas de melhoramento de várias espécies vegetais (RAFALSKI; TINGEY, 1993).

Desde 1932, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) desenvolve um extenso programa de melhoramento genético do cafeeiro, onde grande número de cultivares foram selecionadas e recomendadas para plantio nas mais diversas regiões cafeeiras do Brasil (FAZUOLI, 1986; FAZUOLI et al., 2000). Materiais geneticamente superiores obtidos por meio do melhoramento de plantas, envolvem análises sobre características agrônômicas, que na maioria são quantitativas e complexas, o que torna difícil a seleção em razão do grande número de genes envolvidos, suas interações e também pela influência ambiental que interfere na expressão (MARQUES et al., 2001).

O banco de germoplasma do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência técnica e Extensão Rural (Incaper), no estado do Espírito Santo, apresenta 375 acessos, com 10 plantas por acesso, tendo como finalidade a conservação de materiais genéticos melhorados de *C. canephora*. Esta espécie, além de grande importância econômica e social no estado do Espírito Santo, o segundo maior produtor de café do país, constitui-se atualmente em material genético para estudos de resistência a ferrugem e nematoides, e de mecanismos determinantes da tolerância à seca (EIRA et al., 2007).

No Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), o banco de germoplasma foi implantado em 1974 e vêm sendo ampliado desde então, na sede, em Londrina-PR. Com uma extensa coleção, é composta principalmente por germoplasma de *C. arabica*, com mais de mil acessos desta espécie e outras inúmeras espécies do gênero, e também de híbridos inter- e intra-específicos. Além disto, o banco de germoplasma do IAPAR contém uma coleção de 144 acessos de *C. arabica* coletados na Etiópia, centro de origem da espécie (EIRA et al., 2007).

O banco de germoplasma da Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) foi implantado na Fazenda Experimental de Patrocínio, em 2005, sendo conservado inúmeros germoplasmas da espécie arábica, constituído principalmente por linhagens da maioria das cultivares

comerciais. Atualmente, a coleção é composta de 1326 acessos do germoplasma arábico, coletados em várias localidades (EIRA et al., 2007).

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Minas Gerais, conta com um banco de germoplasma criado em 1970/71, com cerca de 450 acessos, constituindo de grande variabilidade genética, incluindo fontes de resistência a *Hemileia vastatrix* e *Meloidogyne exigua*. Novas introduções foram efetuadas ao longo do tempo, onde em 2006, 1036 acessos foram plantados em nova área no banco de germoplasma, na Estação Experimental do Aeroporto/UFV. O banco de germoplasma da UFV tem sido bastante utilizado no Brasil em diversos programas de melhoramento genético do cafeeiro, possibilitando o desenvolvimento de novas cultivares (EIRA et al., 2007).

A Fundação de Apoio Tecnológico à Cafeicultura (Fundação Procafé), entidade privada e sem fins lucrativos, foi criada em 2001, em Varginha-MG. Na Fazenda experimental de Varginha (FEV), é mantida a maior parte do banco de germoplasma, instalado em 1976. A Fundação possui catalogados 1518 acessos, a maioria materiais genéticos de *C. arabica*, além de acessos de cultivares que tiveram participação da história da cultura cafeeira no Brasil (EIRA et al., 2007).

Em 1978, foi criado o banco de germoplasma de café na Estação experimental da Embrapa Rondônia, no município de Ouro Preto do Oeste, Rondônia (SOUZA et al., 2003), coleção composta de 719 acessos de *C. canephora*, 1 acesso de *C. congensis* e 261 acessos de *C. arabica* (EIRA et al., 2007).

Entretanto, os programas de melhoramento podem se tornar mais eficientes através da predição de ganhos por determinada estratégia de seleção, antecipando o sucesso do esquema seletivo adotado, decidindo, com base científica, por técnicas alternativas que possam ser mais eficazes (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004). Ensaio de progênies têm sido realizados frequentemente nos programas de melhoramento do cafeeiro, envolvendo famílias em diferentes níveis de endogamia com variância da variabilidade genética dessas populações entre e dentro das famílias. Sendo assim, quando há informações obtidas de plantas dentro de parcelas, é possível realizar tanto a seleção entre progênies como também dentro das famílias, permitindo desta forma explorar a variabilidade de forma mais eficiente e obter melhores ganhos (CRUZ, 2006).

2.5 MARCADORES MOLECULARES

Nos últimos anos, com os avanços da genética e da biologia molecular, principalmente, o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação de polimerase em cadeia (PCR, *Polimerase Chain Reaction*) e do sequenciamento automático do DNA foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais. Há elevado número de artigos científicos que fazem referência a tais marcadores no estudo de várias espécies e com as mais diversificadas aplicações, evidenciando o impacto dessa tecnologia nos programas de conservação e uso dos recursos genéticos (AYAD et al., 1997).

Por muito tempo, os indicadores mais simples utilizados para verificar a variabilidade genética foram os marcadores morfológicos, entretanto estes apresentam muitas alterações devido à influência ambiental. Para uma determinação mais segura da variabilidade genética, é necessária a utilização de características que não sofram influência ambiental (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Sendo assim, um método que permite a identificação de níveis de variabilidade genética entre cultivares é o estudo de polimorfismo do DNA baseados em marcadores moleculares. (CAIXETA; FERRÃO; ZAMBOLIM, 2013).

O termo marcador indica que sua função é identificar alguma coisa. No presente contexto ele é utilizado para marcar alelos, colocando “pontos de referência” sobre um local ou uma região de um cromossomo para então localizar genes de interesse que são de difícil identificação (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2008). Entende-se como marcador genético qualquer característica, processo bioquímico ou fragmentos de DNA herdável que permita a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (FALEIRO, 2007). Quando esta característica está relacionada ao DNA, fala-se de um marcador molecular. Quando o marcador possui alterações na sequência de nucleotídeos na molécula de DNA, essas alterações são denominadas de polimorfismos.

Para ser considerado um bom marcador molecular, este deve reunir uma série de características para maximizar sua utilidade, entre elas, possuir uma boa distribuição ao longo do genoma e alto grau de polimorfismo, aliado às análises destes marcadores através de técnicas as quais devem ser rápidas, práticas e reproduzíveis em outros laboratórios de forma confiável (MÉNDEZ et al., 2005).

Dentre elas, a técnica mais utilizada para a detecção de regiões de interesse do DNA é a técnica da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), a qual consiste na síntese *in vitro* de regiões específicas do DNA, simulando a replicação. Esta técnica permite a detecção de marcas no DNA, como por exemplo, os polimorfismos.

Atualmente, os inúmeros tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade existente no DNA e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, a natureza do marcador (dominante ou codominante), o custo, a facilidade de uso e a consistência e repetibilidade, características importantes na escolha do marcador a ser utilizado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA (MILACH, 1998). Na hibridização, uma pequena sequência é marcada radioativamente e ligada ao DNA dos indivíduos, utilizando o princípio de pareamento de bases do DNA. Neste caso enquadram-se os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (MEYER, 2002).

Já aqueles identificados por amplificação de DNA, ou seja, que tem como base a PCR, incluem os marcadores RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), Microsatélites ou SSR (*Short Tandem Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), entre outros (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os primeiros marcadores desenvolvidos que detectavam as diferenças entre indivíduos diretamente no DNA foram os RFLP's (BOREM; CAIXETA, 2006). Porém por seu desenvolvimento apresentar um processo caro e laborioso e, além disso, a utilização de sondas radioativas, esta técnica não permite a automatização de suas etapas, o que torna difícil em estudos de população (BOREM; CAIXETA, 2006). No entanto, ainda hoje é encontrado na literatura o uso deste tipo de marcador, como por exemplo, em estudos de diversidade (MISHRA et al., 2012).

Uma das técnicas desenvolvidas que complementam mais precisamente a caracterização de genótipos são a eletroforese de isoenzimas, de proteínas e de DNA (RAPD, RFLP). As proteínas e isoenzimas representam a expressão de forma direta dos genes em um ambiente, já a eletroforese do DNA mede a variabilidade diretamente na cadeia de DNA (BUSTAMANTE; POLANCO-

LOAIZA, 1999). Entretanto, o acesso à variabilidade genética em *C. arabica* através do uso de alguns marcadores moleculares tem mostrado muitas dificuldades, devido à falta de variação genética como observado com as isoenzimas (LOPES, 1993) e RFLP (PAILLARD et al., 1996).

Por outro lado, marcadores identificados por amplificação, especialmente RAPD's, são mais fáceis de manipular e de custo menor, embora sejam de resultados menos consistentes. Marcadores microssatélites e AFLP revelam mais polimorfismo e têm sido as melhores opções para espécies onde este polimorfismo é limitado (MILACH, 1998).

Microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats* - Seqüências simples repetidas) correspondem à seqüências de DNA com poucos pares de bases de comprimento (2-6), repetidas "in tandem", tais como (AT) n e (ATT). A variação no número (n) desses elementos repetidos gera grande quantidade de polimorfismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Após o sequenciamento do genoma humano, os marcadores SNP's ganharam mais notoriedade. Com base na detecção de polimorfismos resultantes da alteração de uma única base no genoma, é possível evidenciar a presença de SNP's em espécies vegetais, inclusive em café (MISHRA et al., 2011). Eles podem ocorrer tanto em regiões expressas quanto não expressas, e ao se considerar que muitos desses SNP's estão localizados no interior de regiões gênicas, haverá então uma redução de tempo e custos na obtenção de genes de interesse agrônômico (BOREM; CAIXETA, 2006).

2.5.1 Aplicação do Uso de Marcadores Moleculares no Gênero *Coffea* com Ênfase nos Marcadores AFLP

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em diversos estudos genéticos, como os de diversidade genética e relações filogenéticas no gênero *Coffea*.

As isoenzimas foram os primeiros marcadores moleculares aplicados no gênero *Coffea* com pouco sucesso, as quais não puderam distinguir entre tipos dentro da espécie *C. arabica* (BERTHOU; TROUSLOT, 1979; BERTHAUD; CHARRIER, 1988). Desde então, as relações taxonômicas dentro do gênero *Coffea* tem sido estudadas utilizando variações do DNA (BERTHOU;

MATHIEU; VEDEL, 1983), marcadores RAPD e organelas específicas de marcadores baseados na PCR (OROZCO-CASTILLO et al., 1996). Orozco-Castillo et al. (1994) distinguiram os grupos de cultivares arábica, Típica e Bourbon, utilizando marcadores RAPD. Estes marcadores têm sido usados para detectar diversidade genética dos acessos dentro do café arábica silvestre, seis cultivares da Etiópia e dois acessos derivados de Típica e Bourbon (LASHERMES et al., 1996; ANTHONY et al., 2001). Além destes, outros diversos marcadores de DNA estão disponíveis para medir a diversidade genética.

Mais recentemente, o potencial de aplicação tanto de marcadores AFLP como microssatélites tem sido amplamente demonstrado em café. Os marcadores AFLP tem sido utilizados com sucesso para detectar fragmentos introgressivos em híbridos interespecíficos derivados do cruzamento espontâneo entre *C. arabica* x *C. canephora* (LASHERMES et al., 2000) e *C. arabica* x *C. liberica* (PRAKASH et al., 2002), analisar a diversidade genética dentro e entre cultivares (STEIGER et al., 2002), detectar introgressões genéticas (PRAKASH et al., 2004) e construir mapas de ligações genéticas (PEARL et al., 2004). Já os marcadores microssatélites foram utilizados para analisar a segregação alélica em híbridos obtidos do cruzamento entre *C. arabica* x *C. canephora* (HERRERA et al., 2002). Além disso, a eficiência dos marcadores AFLP e microssatélites tem sido demonstrada também no estabelecimento da origem das variedades cultivadas do café arábico (ANTHONY et al., 2002).

Estudos comparativos utilizando os marcadores RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites tem mostrado que o AFLP é a técnica mais eficiente para estimar a diversidade genética (POWELL et al., 1996; RUSSELL et al., 1997; PEJIC et al., 1998), dispondo de muitas vantagens em relação aos outros marcadores de DNA. O mais importante disto é que com o uso dos marcadores AFLP, não é necessário ter informação prévia da sequência, produz grande número de marcadores polimórficos informativos por *primer*, requer apenas uma pequena quantidade de DNA, abrange todo o genoma e é altamente reprodutível (PORTIS et al., 2004; SHAN et al., 2004).

Desta forma, estes marcadores moleculares, tais como os RAPD, AFLP e microssatélites constituem-se eficientes ferramentas em estudos genéticos, como nas análises de diversidade genética tanto de café silvestre como de café cultivado (ANTHONY et al., 2001; ANTHONY et al., 2002; MONCADA; MCCOUCH, 2004; SILVESTRINI et al., 2007; CUBRY et al., 2008; MALUF et al., 2005; VIEIRA,

et al., 2010), fazendo com que a detecção e quantificação da variação genética em espécies vegetais seja muito importante para o sucesso das pesquisas de conservação genética e melhoramento de plantas.

2.5.2 AFLP (Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados)

Dentre os marcadores moleculares, o AFLP destaca-se por sua versatilidade na geração de informações, uma vez que, associa o polimorfismo gerado por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR.

O processo metodológico desta técnica é baseado por várias etapas, onde inicialmente há a clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição, seguido da ligação de adaptadores específicos (que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da clivagem pelas enzimas de restrição), depois de uma seleção dos fragmentos amplificados, que se divide em pré-seletivo (com *primers* contendo apenas um nucleotídeo arbitrário adicional), e seletivo (com *primers* contendo outros dois nucleotídeos arbitrários adicionais, totalizando três), e a última etapa consiste na análise do subconjunto de fragmentos amplificados por eletroforese em gel ou capilar (CAIXETA; FERRÃO; ZAMBOLIM, 2013).

A principal limitação dos marcadores AFLP consiste no baixo conteúdo de informação genética gerado por loco, isso porque, assim como os marcadores RAPD, são de natureza dominante, ou seja, não permitem a distinção entre homocigotos e heterocigotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ZHIVOTOVSKY, 1999; COSTA et al., 2000). Dentre as vantagens do AFLP destacam-se o grande número de marcadores gerados, o alto poder de detecção da variabilidade genética, a possibilidade de combinações entre *primers* e enzimas de restrição, ampla cobertura do genoma, além de serem altamente reprodutíveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com a técnica de AFLP, primeiramente descrita por Vos et al. (1995), é possível explorar a simplicidade na geração de grande número de marcadores que envolvem todo o genoma, sem haver a necessidade de um sequenciamento prévio. A técnica de AFLP consiste essencialmente em quatro etapas (Vos et al., 1995):

Etapa 1 – Clivagem de DNA genômico:

Esta etapa é realizada pela adição de duas enzimas de restrição, uma de corte raro que reconhece e corta seis pares de bases (ex. *EcoRI*) e uma de corte frequente que reconhece apenas quatro pares de bases (ex. *MseI*). Com estas reações podem então ser gerados três tipos de fragmentos; fragmentos grandes, resultantes do corte com a enzima de corte raro; fragmentos pequenos, originados pelo corte com a enzima de corte frequente; e fragmentos de tamanho intermediário.

Etapa 2 – Ligação de adaptadores:

Consiste na ligação de adaptadores específicos que possuem extremidades complementares às extremidades resultantes da clivagem pelas enzimas de restrição. Estes adaptadores possuem de 20 a trinta pares de bases, cujas sequências são diferentes para cada adaptador. Com este passo, um grande número de fragmentos poderia ser amplificados via PCR. No entanto, o número de fragmentos nesta etapa seria demasiadamente excessivo, tornando impossível a resolução de fragmentos individuais, mesmo em gel de alta resolução. Assim, após a ligação dos adaptadores é feita uma diluição de 10 a 20 vezes de acordo com o material estudado.

Etapa 3 – Pré-seletivo:

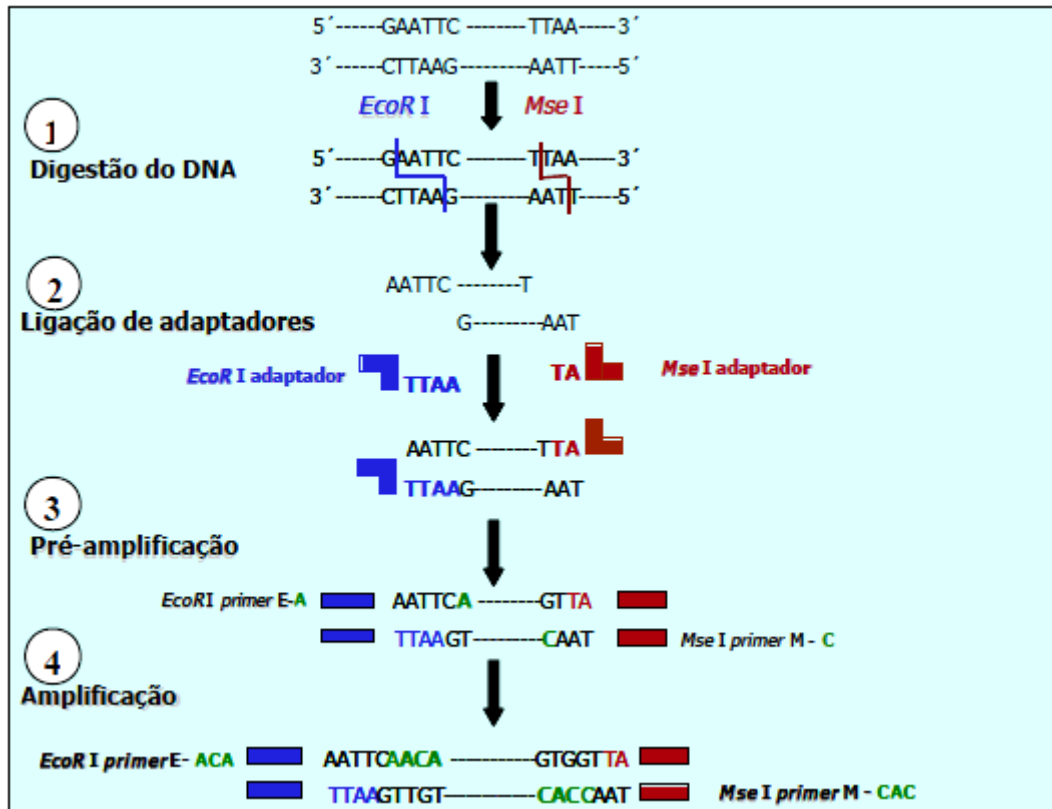
Esta etapa consiste de uma seleção inicial de fragmentos através da utilização de primers de 20 a 25 pares de bases onde é adicionada um nucleotídeo, em relação a sequência dos adaptadores. Nesta fase, apenas fragmentos ligados aos adaptadores que contenham esta base adicional serão amplificados, limitando assim o número de fragmentos. O produto resultante da reação pré-seletiva é diluído de 5 a 10 vezes, também dependendo do material estudado.

Etapa 4 – Seletivo:

Nesta etapa é feita uma nova seleção de fragmentos a serem amplificados via PCR, através da utilização de primers que contenham dois ou mais

nucleotídeos seletivos, restringindo ainda mais o número de fragmentos amplificados, e assim, tornando possível a resolução e visualização de marcadores individuais. A Figura 1 ilustra as etapas necessárias a obtenção de marcadores de AFLP.

Figura 1 – Etapas de reação da técnica de marcadores moleculares AFLP.



Fonte: DAMASCENO, 2010.

3 ARTIGO A: AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE CULTIVARES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) ACESSADOS POR MARCADORES AFLP

RESUMO: A técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) foi utilizada para acessar a variabilidade e distância genética de 15 populações de *Coffea arabica* L., obtidas do cruzamento de *C. arabica* x *C. canephora* e *C. arabica* x *C. liberica*, com uma amostragem de 20 plantas por população. Duas combinações de *primers* seletivos de AFLP (*EcoRI*-AAC/*MseI* CTAG e *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAAG) geraram 731 bandas. Entre as populações estudadas, a cultivar IPR 100 apresentou a maior variabilidade genética, determinada pelo número de locos polimórficos (276), porcentagem de locos polimórficos (37,75%) e diversidade gênica de Nei (0,22) seguidas das cultivares IPR 97 (351, 48,01% e 0,20) e IPR 104 (327, 44,73% e 0,20). Pela análise de variância molecular (AMOVA), 16,13% da variabilidade genética encontra-se entre populações, enquanto 83,87% distribui-se dentro das populações. Valores de F_{ST} par a par entre as populações mostraram que a maior distância encontrada foi de 0,330 entre as cultivares IPR 97 e IPR 102 e a menor distância (-0,001) foi entre as cultivares IPR 101 e IPR 105, as quais não se diferenciaram. Verificou-se que cultivares com diferentes números de gerações de seleção não apresentaram grandes diferenças na taxa de variabilidade genética e as cultivares de origens semelhantes mostraram taxas diferentes de variabilidade genética entre e dentro dessas populações. Os dados deste trabalho podem ser utilizados em futuros programas de melhoramento genético de *C. arabica*.

Palavras-chave: Distância genética. Híbridos. Marcador molecular. Polimorfismo genético.

ABSTRACT: The AFLP technique (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) was used to access the genetic variability of 15 populations in different generations of selection of *Coffea arabica* L. Several of these populations were obtained by crossing of *C. arabica* with *C. canephora* or *C. arabica* with *C. liberica*. Two selective AFLP primers combinations (*EcoRI*-AAC/*MseI* CTAG e *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAAG) generated 731 bands. Among the populations studied, the cultivar IPR 100 showed the greatest genetic variability, determined by the number of polymorphic loci (276), percentage of polymorphic loci (37.75%) and Nei's gene diversity (0.22), followed by IPR 97 (351, 48,01% e 0,20) and IPR 104 (327, 44,73% e 0,20). The molecular analysis of variance (AMOVA) revealed that 16.13% of the genetic variability was found among populations, while 83.87% was distributed within populations. Values of pairwise F_{ST} among populations showed that the greatest distance was 0.330 between IPR 97 and IPR 102 and the shortest distance (-0.001) was between IPR 101 and IPR 105. Cultivars with similar genetic background showed different levels of genetic variability. It was also observed that cultivars with different numbers of generations of selection did not show big differences in its genetic variability. Data from this study can be used in future breeding programs of *C. arabica*.

Keywords: Genetic distance. Hybrids. Molecular markers. Genetic polymorphism.

3.1 INTRODUÇÃO

O centro de diversidade do café arábico (*C. arabica* L.) é a Etiópia. O uso do café foi feito primeiramente por um pastor árabe que percebeu um comportamento agitado de suas cabras após consumirem pequenos frutos vermelhos de um arbusto nativo (MATIELLI; RUGGIERO, 2005), porém o consumo do café só foi mencionado pela primeira vez por um médico árabe chamado Razes, no século X (SMITH, 1985), o qual era utilizado como medicamento para o sono e fadiga (TAUNAY, 1939).

Inicialmente o consumo do café foi difundido pela comunidade árabe, e no fim do século XV começou a ser comercializado na Europa. No fim do século XVII e início do século XVIII, a cultura cafeeira espalhou-se pelas Américas Central e do Sul através da propagação de uma única planta proveniente da Indonésia, cultivada no Jardim Botânico de Amsterdã (ANTHONY et al., 2001), onde a partir daí, as primeiras mudas de café foram trazidas da Guiana Francesa ao Brasil pelo Sargento-Mor Francisco de Mello Palheta em 1727 (MATIELLI; RUGGIERO, 2005; MENDES; GUIMARÃES, 1998).

A introdução do café no Brasil foi um marco importante na economia do país, onde devido às condições climáticas favoráveis, o cultivo de café se espalhou rapidamente com a produção voltada para o mercado interno, tornando-se produto-base da economia brasileira (ABIC, 2011). De acordo com a Organização Internacional do Café (ICO, 2011) o Brasil é o maior produtor e segundo maior consumidor de café do mundo, sendo o estado de Minas Gerais responsável por 51% da produção nacional e o estado do Paraná por 4,2% da produção de café no ano de 2011 (ABIC, 2011). A primeira estimativa de produção de café para a safra 2014 indica que o Brasil deverá colher entre 46,53 e 50,15 milhões de sacas de 60 quilos do produto beneficiado (CONAB, 2014).

Com o início das pesquisas com o cafeeiro, houve algumas preocupações, e uma delas foi em relação ao estabelecimento de um banco de germoplasma contendo as variedades e variações de *C. arabica* e também as espécies do gênero *Coffea*, com o objetivo de preservação e estudo do ponto de vista evolutivo, taxonômico e quanto à possibilidade de seu aproveitamento no melhoramento genético do café (CARVALHO; FAZUOLI, 1984). Estas coleções podem revelar relações interespecíficas dentro do gênero *Coffea* e também dar uma

idéia global da variabilidade genética (CARVALHO; FAZUOLI, 1984; CHARRIER, 1978).

Desde 1932, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) desenvolve um extenso programa de melhoramento genético do cafeeiro, onde grande número de cultivares foram selecionadas e recomendadas para plantio nas mais diversas regiões cafeeiras do Brasil (FAZUOLI, 1986; FAZUOLI et al., 2000).

O banco de germoplasma do Instituto Capixaba de Pesquisa, assistência técnica e extensão rural (Incaper), no estado do Espírito Santo, apresenta 375 acessos, com 10 plantas por acesso, tendo como finalidade a conservação de materiais genéticos melhorados de *C. canephora*. Esta espécie, além de grande importância econômica e social no estado do Espírito Santo, o segundo maior produtor de café do país, constitui-se atualmente em material genético para estudos de resistência a ferrugem e nematoides, e de mecanismos determinantes da tolerância à seca (EIRA et al., 2007).

No Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), o banco de germoplasma foi implantado em 1974 e vêm sendo ampliado desde então, na sede, em Londrina-PR. Com uma extensa coleção, é composta principalmente por germoplasma de *C. arabica*, com mais de mil acessos desta espécie e outras inúmeras espécies do gênero, e também de híbridos inter- e intra-específicos. Além disto, o banco de germoplasma do IAPAR contém uma coleção de 144 acessos de *C. arabica* coletados na Etiópia, centro de origem da espécie (EIRA et al., 2007).

O banco de germoplasma da Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) foi implantado na Fazenda Experimental de Patrocínio, em 2005, sendo conservado inúmeros germoplasmas da espécie arábica, constituído principalmente por linhagens da maioria das cultivares comerciais. Atualmente, a coleção é composta de 1326 acessos do germoplasma arábico, coletados em várias localidades (EIRA et al., 2007).

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Minas Gerais, conta com um banco de germoplasma criado em 1970/71, com cerca de 450 acessos, constituindo de grande variabilidade genética, incluindo fontes de resistência a *Hemileia Vastatrix* e *Meloidogyne exigua*. Novas introduções foram efetuadas ao longo do tempo, onde em 2006, 1036 acessos foram plantados em nova área no banco de germoplasma, na Estação experimental do Aeroporto/UFV. O banco de germoplasma da UFV tem sido bastante utilizado no Brasil em diversos programas

de melhoramento genético do cafeeiro, possibilitando o desenvolvimento de novas cultivares (EIRA et al., 2007).

A Fundação de Apoio Tecnológico à Cafeicultura (Fundação Procafé), entidade privada e sem fins lucrativos, foi criada em 2001, em Varginha-MG. Na Fazenda experimental de Varginha (FEV), é mantida a maior parte do banco de germoplasma, instalado em 1976. A Fundação possui catalogados 1518 acessos, a maioria matérias genéticos de *C. arabica*, além de acessos de cultivares que tiveram participação da história da cultura cafeeira no Brasil (EIRA et al., 2007).

Em 1978, foi criado o banco de germoplasma de café na Estação experimental da Embrapa Rondônia, no município de Ouro Preto do Oeste, Rondônia (SOUZA et al., 2003), coleção composta de 719 acessos de *C. canephora*, 1 acesso de *C. congensis* e 261 acessos de *C. arabica* (EIRA et al., 2007).

Os Híbridos naturais e artificiais derivados do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora* tem sido intensivamente empregados nos programas de melhoramento do café, onde o Híbrido de Timor, utilizado como ponte para transferência de genes de resistência à ferrugem de *C. canephora* para *C. arabica*, é um exemplo disto (FAZUOLI et al., 1996), fazendo com que haja um incremento na variabilidade genética do café arábico.

Os materiais geneticamente superiores obtidos através do melhoramento, envolvem análises sobre características agronômicas, que na maioria são quantitativas e complexas, o que torna difícil a seleção em razão do grande número de genes envolvidos, suas interações e também pela influência ambiental que interfere na expressão gênica (MARQUES et al., 2001). Entretanto, os programas de melhoramento podem se tornar mais eficientes através da predição de ganhos por determinada estratégia de seleção, antecipando o sucesso do esquema seletivo adotado, e decidindo, com base científica, por técnicas alternativas que possam ser mais eficazes (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

Diante disto, os marcadores moleculares vêm sendo considerados importantes ferramentas para um rápido e eficiente acesso à variabilidade genética que vem sendo utilizadas em bancos de germoplasma e programas de melhoramento de várias espécies vegetais (RAFALSKI; TINGEY, 1993).

Entre estas técnicas, a técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al. 1995) tem-se demonstrada ser de grande eficiência no estudo da diversidade genética e análises introgressivas no gênero *Coffea*.

Utilizando a técnica de AFLP, Anthony et al. (2002) e Steiger et al. (2002) identificaram diferentes acessos de *C. arabica*, e Dessalegn; Herselman; Labuschagne (2008) fizeram a distinção entre 28 genótipos originários da Etiópia. Prakash et al. (2002) verificaram que a introgressão de *C. liberica* em *C. arabica* aumentou a variabilidade genética de *C. arabica*. A técnica de AFLP foi também utilizada com sucesso por Noir et al. (2003) e Prakash et al. (2004) para identificar genes resistentes à nematóides e resistentes à ferrugem em materiais resultantes da introgressão de *C. canephora* com *C. arabica*. Pearl et al. (2004) construíram um mapa genético de *C. arabica* com um comprimento total de 1802,8 cM e uma distância média de 10,2 cM entre os marcadores adjacentes de AFLP. Todos estes estudos demonstraram a eficiência da técnica de AFLP na avaliação da variabilidade genética, introgressão e mapeamento em *C. arabica*.

Neste estudo, pretendeu-se verificar, por meio de marcadores moleculares AFLP, a variabilidade genética entre e dentro de diferentes cultivares de *Coffea arabica* em diferentes gerações de seleção, bem como verificar a distância genética entre as mesmas com o objetivo de utilizar estes materiais em futuros programas de melhoramento genético.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de Material Vegetal

Para o desenvolvimento deste estudo, foram coletados tecidos foliares de 20 plantas de 15 cultivares (Tabela 1) de *Coffea arabica* do Ensaio E1001 implantado em Londrina-PR, no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e armazenados imediatamente em gelo.

Tabela 1 – Relação das 15 cultivares de *Coffea arabica*, suas respectivas gerações de seleção e genealogias.

Cultivar	Geração de Seleção	Genealogia
IPR 97	F ₆	Germoplasma Sarchimor
IPR 98	F ₆	Germoplasma Sarchimor
IPR 99	F ₆	Germoplasma Sarchimor
IPR 100	F ₆	Catuaí x <i>Coffea liberica</i>
IPR 101	F ₇	Catuaí x <i>Coffea liberica</i>
IPR 102	F ₈	Catuaí x Icatu
IPR 103	F ₇	Catuaí x Icatu
IPR 104	F ₆	Germoplasma Sarchimor
IPR 105	F ₆	Germoplasma Catuaí
IPR 106	F ₈	Germoplasma Icatu
IPR 107	F ₄	IAPAR 59 x Mundo Novo
IPR 108	F ₅	IAPAR 59 x Catucaí
IAPAR 59	F ₆	Germoplasma Sarchimor
Catuaí Vermelho IAC-99	F ₅	Caturra x Mundo Novo
Obatã IAC 1669-20	F ₆	Germoplasma Sarchimor

3.2.2 Extração e Quantificação do DNA

A extração do DNA de cada indivíduo foi realizada segundo protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) com algumas modificações para a espécie estudada. Foram maceradas folhas jovens em nitrogênio líquido, posteriormente acrescentando 700 µl de tampão de extração CTAB e 20 µl de beta-mercaptoetanol e colocado em banho-maria à 65°C por 30 min, agitando-as a cada 10 min. Tiradas as amostras do banho-maria, esperou-se esfriar as amostras, acrescentou-se 600 µl de clorofórmio-isoamílico (24:1), e agitou-se até a homogeneização por 8 min. Centrifugou-se por 15 min à 15000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Foi adicionado 400 µl de isopropanol gelado, homogeneizado e colocados em -20°C por 15 min (ou *overnight*). Após, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 13000 rpm e retirado o sobrenadante cuidadosamente sem perder o *pellet*. Foi lavado o *pellet* durante 3 à 4 min em 500 µl de etanol (70%) gelado, etapa repetida 2x. Depois foi lavado durante 2 à 4 min em 500 µl de etanol absoluto gelado. Feito isto, foi ressuscitado o pellet em 50 µl de TE e 3 µl de RNase (110 mg/ml) em cada amostra e levado à estufa por 30 min à 37°C. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em geladeira até a realização das quantificações de DNA.

A concentração de DNA de cada amostra foi estimada utilizando o quantificador de DNA *Scandrop*, segundo as instruções do fabricante e posteriormente congeladas em *freezer* à -80°C.

3.2.3 Reações de AFLP

Cerca de 700 ng do DNA genômico foram digeridos com duas enzimas de restrição simultaneamente, 5 U de *MseI* e 5 U de *EcoRI*, em tampão de digestão com um volume total de 20 µl. A reação foi incubada a 37°C por 18 h e, em seguida, os fragmentos gerados foram ligados a adaptadores específicos, conforme descrito por Vos et al. (1995). Para a ligação dos adaptadores, foi acrescentado ao material digerido um mix contendo tampão da T4 DNA ligase (1X, NaCl 0,5 M, BSA 1 mg/ml, DTT 5 mM), adaptadores *MseI* 50 mM, adaptadores *EcoRI* 5 mM, T4 DNA ligase 1U e água ultra pura para completar o volume de 10 µL. A reação foi incubada a 37°C por 3 h, 17°C por 30 min, 70°C por 10 min. A seguir 25 µl da reação de restrição-ligação foi diluída em 225 µl de água ultra pura. A amplificação pré-seletiva foi realizada utilizando o kit GoTaq® *Green Master Mix* (Promega), *primer* pré-seletivo 4,75 Mm, 3,0 µl da diluição da reação de restrição-ligação e água ultra pura para completar o volume de 10 µL. O programa da amplificação pré-seletiva foi realizada em 1 ciclo de 72°C por 2 min, 20 ciclos de 90°C por 1 s, 56°C por 30 s e 72°C por 2 min seguido de 1 ciclo final de 60°C por 30 min. Em seguida, um volume de 5 µl da reação pré-seletiva foi diluído em 45 µl de água ultrapura. Para a amplificação seletiva foram utilizadas duas combinações de *primers* marcados com fluoróforos (*Primers EcoRI-AAC* (NED-amarelo) / *MseI-CTAG*, *EcoRI-AAC* (HEX-verde) / *MseI-CAAG*). As reações de amplificação seletiva foram compostas dos *primers* seletivos *MseI* 5 µM e *EcoRI* 5 µM, GoTaq® *Green Master Mix*, 3 µL da reação da pré-amplificação diluída e água ultra pura para completar o volume de 10 µL. O programa para amplificação foi composto por 1 ciclo de 94°C por 2 min, 65°C por 30 s e 72°C por 2 min; 8 ciclos de 94°C por 1 s, 64°C por 30 s e 72°C por 2 min; 23 ciclos de 94°C por 1 s, 56°C por 30 s e 72°C por 2 min e 1 ciclo final de 60°C por 30 min.

3.2.4 Preparações das Amostras para Eletroforese Capilar em Sistema Automatizado

Para resolução dos produtos de PCR obtidos da reação seletiva, as amostras foram amplificadas com *primers* distintamente marcados com os fluoróforos: verde (HEX) e amarelo (NED). À estas amostras foi adicionado 0,2 µl de

size standard (Liz 600) e 8,8 µl de formamida. Os produtos foram desnaturados a 95°C por 2 minutos e imediatamente levados ao gelo para submeter à eletroforese usando o sistema automatizado 3500xL (*Applied Biosystems*).

3.2.5 Análise Estatística

Os produtos de amplificação foram analisados por meio do programa *GeneMapper*, para construção de uma matriz binária, levando em conta a presença (1) ou ausência (0) de um determinado fragmento. O número de locos polimórficos, a porcentagem de locos polimórficos, a diversidade gênica de Nei (H_S) (1978), a variabilidade genética entre e dentro das populações, Índice de Fixação Alélica (F_{ST}) e o F_{ST} par a par foram calculadas utilizando o programa Arlequin versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005). Os dendrogramas foram calculados através do método UPGMA. Para os dendrogramas de cada cultivar foi utilizado o programa FAMD versão 1.3 (SCHLÜTER; HARRIS, 2006) e para o dendrograma geral foi utilizado o programa TPGA versão 1.3 (MILLER, 1997). Para identificar a formação de grupos (k) das populações, foi utilizado o programa *Structure* versão 2.3.3 (HUBISZ et al., 2009). A análise de número de clusters foi realizada seguindo o modelo misto com período de comprimento de 10000 e 10000 repetições, o número de clusters foi determinado de acordo com Evano; Regnaut; Goudet (2005).

4 RESULTADOS

Duas combinações de *primers* seletivos (NED-*EcoRI*-AAC / *MseI*-CTAG, HEX-*EcoRI*-AAC / *MseI*-CAAG, geraram 731 bandas. A cultivar IPR 97 apresentou o maior número de locos polimórficos (351) correspondendo à 48,01% (Tabela 2), com uma diversidade gênica de Nei de 0,20, seguidas das cultivares IPR 108 com 338 locos polimórficos (46,23%) e diversidade gênica de Nei de 0,08 e IPR 99 com 330 locos polimórficos (45,14%) e 0,07 de diversidade gênica de Nei. Com menor número de polimorfismos, a cultivar IPR 98 apresentou 205 locos polimórficos (28,04%) e diversidade gênica de Nei de 0,17, e a cultivar IAPAR 59 com 205 locos polimórficos (28,04%) e diversidade gênica de Nei de 0,15.

Tabela 2 – Número de locos polimórficos, porcentagem de locos polimórficos, diversidade gênica de Nei (1978) das 15 cultivares de *Coffea arabica*.

Cultivar	Nº de locos polimórficos	Porcentagem de locos polimórficos	Diversidade gênica de Nei
IPR 97	351	48,01	0,20
IPR 98	205	28,04	0,17
IPR 99	330	45,14	0,07
IPR 100	276	37,75	0,22
IPR 101	236	32,28	0,17
IPR 102	293	40,08	0,07
IPR 103	212	29,00	0,17
IPR 104	327	44,73	0,20
IPR 105	288	39,39	0,18
IPR 106	253	34,61	0,17
IPR 107	209	28,59	0,16
IPR 108	338	46,23	0,08
IAPAR 59	205	28,04	0,15
Catuaí Vermelho IAC-99	253	34,61	0,19
Obatã IAC 1669-20	252	34,47	0,17

H_S = Diversidade gênica de Nei.

Pela análise da AMOVA, verificou-se que 16,13% da variabilidade genética encontra-se entre as populações, enquanto 83,87% encontra-se dentro das populações (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise da variância molecular (AMOVA) entre e dentro das 15 populações de *Coffea arabica*.

Fonte de variação	G.L	Soma dos quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem da Variação
Entre as Populações	14	2087,5	5,91	16,13**
Dentro das Populações	285	8767,4	30,76	83,87
Total	299	10854,9	36,68	

(F_{ST})=0,161. ** $P < 0,01$, significativa com 1023 permutações.

Através da análise de distância genética pelo F_{ST} par a par (Tabela 4), observou-se que a maior distância encontrada foi de 0,330 (33%) entre as cultivares IPR 97 e IPR 102, seguida das cultivares IPR 97 e IPR 108, que tiveram uma distância entre elas de 0,313 (31%) e as cultivares IPR 97 e IPR 99 de 0,305 (30%). Com o menor valor encontrado, as cultivares IPR 101 e IPR 105 não se diferenciaram (-0,001), ou seja, não houve distância genética entre elas.

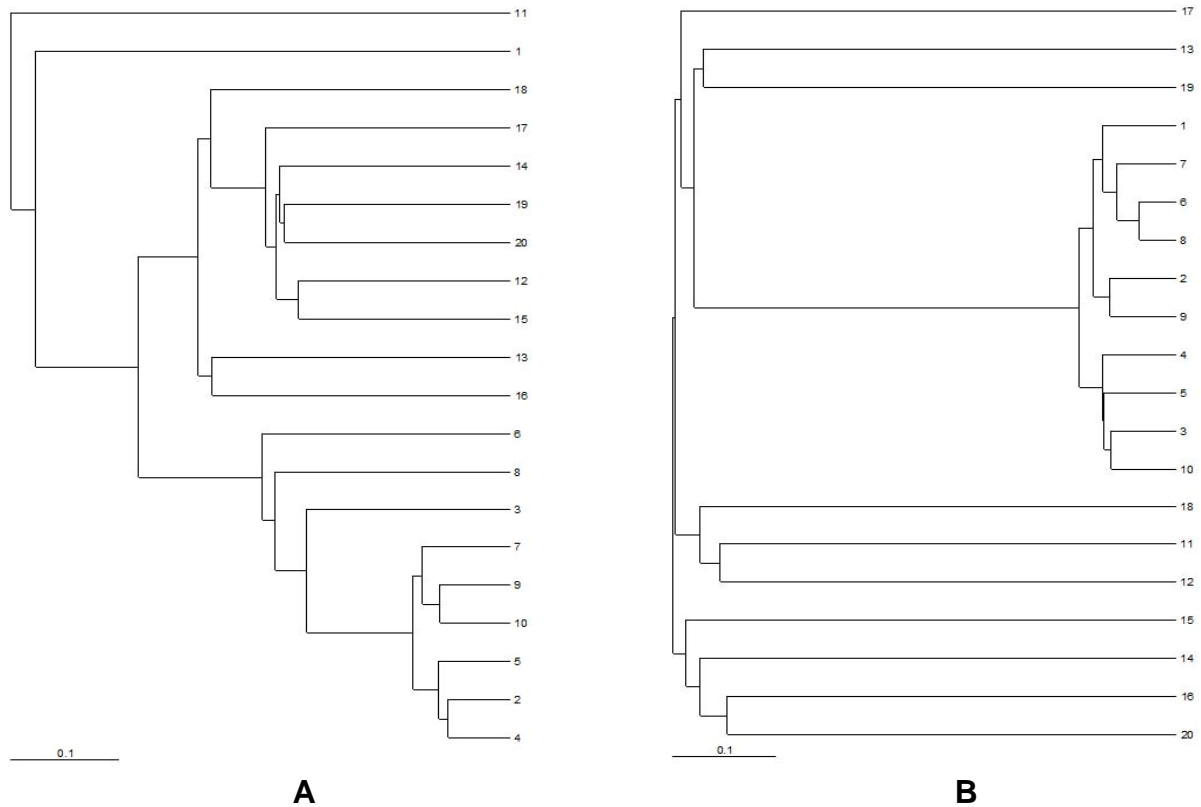
Tabela 4 – Distância genética pelo F_{ST} par a par entre as 15 populações de *Coffea arabica*.

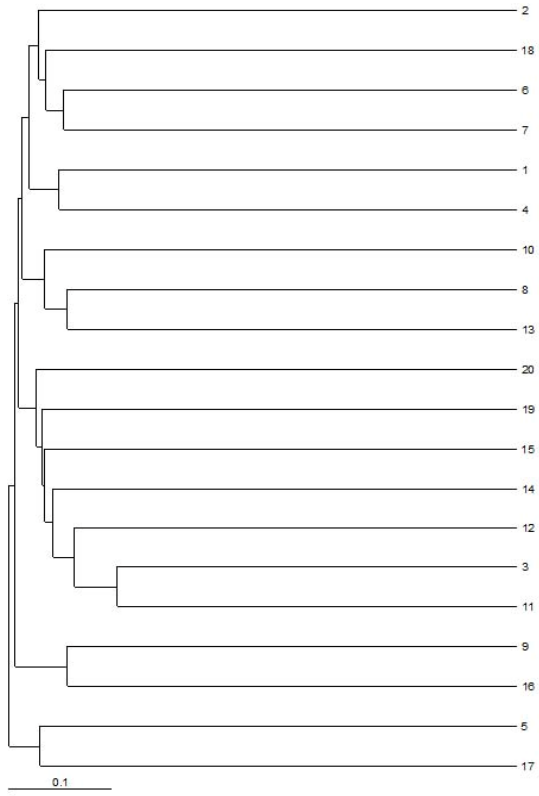
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1-IPR 97	0,000														
2-IPR 98	0,012	0,000													
3-IPR 99	0,305	0,275	0,000												
4-IPR 100	0,077	0,075	0,235	0,000											
5-IPR 101	0,262	0,270	0,228	0,208	0,000										
6-IPR 102	0,330	0,300	0,005	0,258	0,252	0,000									
7-IPR 103	0,247	0,261	0,246	0,202	0,012	0,269	0,000								
8-IPR 104	0,196	0,198	0,142	0,151	0,013	0,157	0,023	0,000							
9-IPR 105	0,230	0,228	0,154	0,176	-0,001	0,168	0,023	-0,012	0,000						
10-IPR 106	0,229	0,235	0,203	0,184	0,009	0,224	0,026	-0,013	-0,005	0,000					
11-IPR 107	0,233	0,243	0,216	0,192	0,006	0,235	0,009	-0,007	-0,003	-0,009	0,000				
12-IPR 108	0,313	0,281	0,080	0,248	0,258	0,056	0,263	0,149	0,151	0,207	0,215	0,000			
13-lapar 59	0,258	0,267	0,248	0,216	0,011	0,272	0,012	0,023	0,022	0,022	0,016	0,252	0,000		
14-Catuai¹	0,045	0,012	0,268	0,040	0,253	0,284	0,244	0,178	0,204	0,214	0,220	0,248	0,249	0,000	
15-Obatã²	0,232	0,239	0,204	0,186	-0,003	0,225	0,006	-0,004	-0,008	-0,006	-0,005	0,202	-0,003	0,217	0,000

¹Obatã IAC 1669-20. ²Catuai Vermelho IAC-99. $P \leq 0,01$ dado por 1023 permutações.

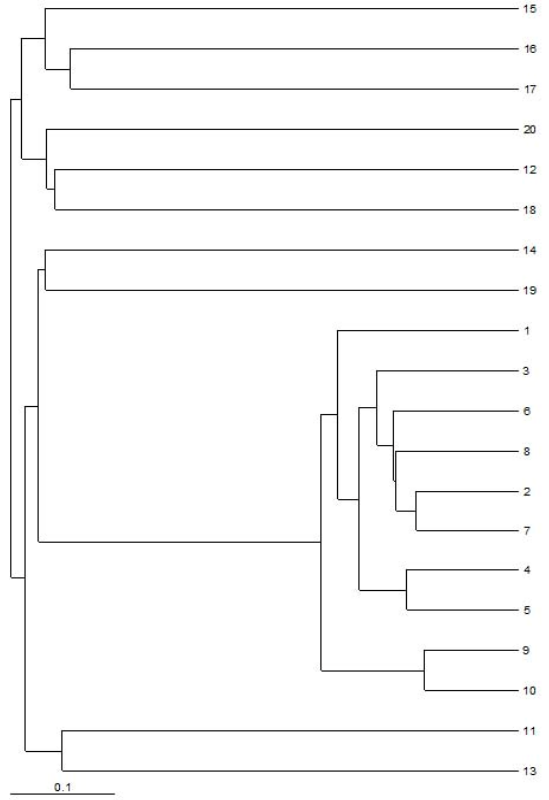
Na Figura 2, observa-se o dendrograma individual de cada cultivar, mostrando a variabilidade genética de cada uma. Na Figura 3, é observado o dendrograma geral envolvendo todas as cultivares estudadas, onde observa-se a presença de três grupos principais: grupo 1 (G1): IPR 97, IPR 98, IPR 100, Catuaí Vermelho IAC-99 e IPR 99, grupo 2 (G2): IPR 105, Obatã IAC 1669-20, IPR 104, IPR 101, IPR 106, IPR 107, IPR 103 e IAPAR 59, e grupo 3 (G3): IPR 102 e IPR 108.

Figura 2 – Dendrograma construído com base na distância genética de Nei (1978) pelo método UPGMA entre os 20 indivíduos de cada cultivar. A. IPR 97; B. IPR 98; C. IPR 99; D. IPR 100; E. IPR 101; F. IPR 102; G. IPR 103; H. IPR 104; I. IPR 105; J. IPR 106; K. IPR 107; L. IPR 108; M. IAPAR 59; N. Catuaí Vermelho IAC-99; O. Obatã IAC 1669-20.

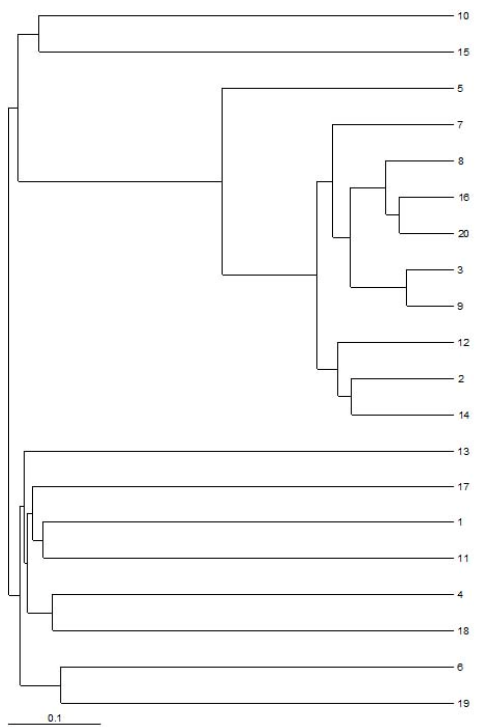




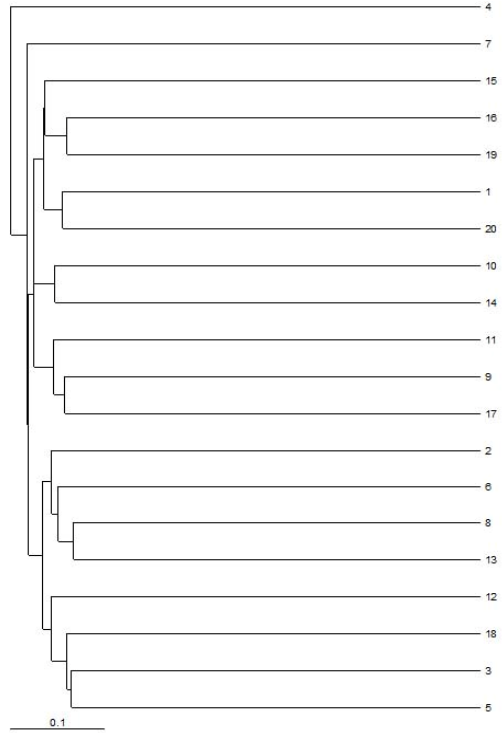
C



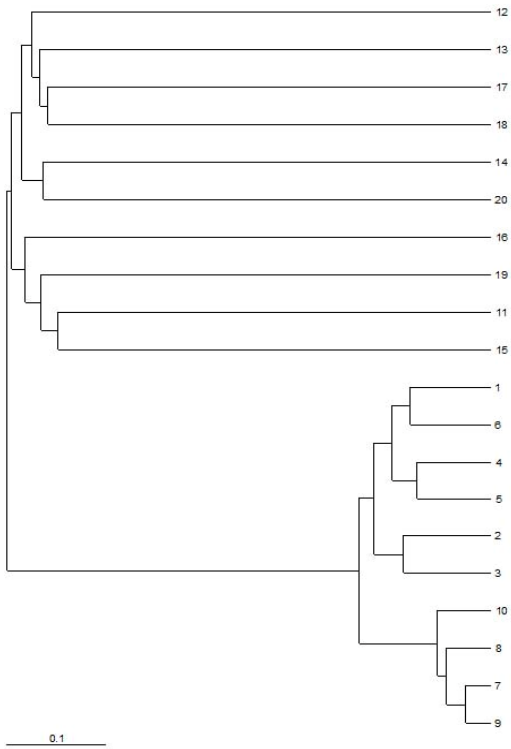
D



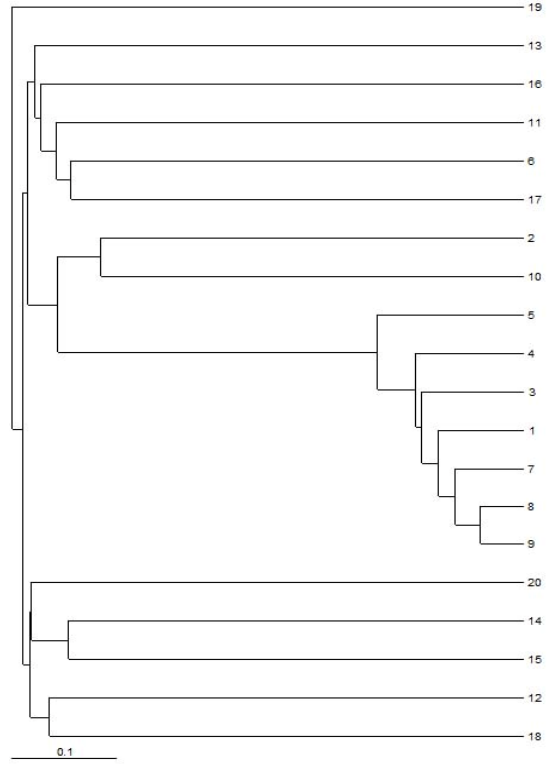
E



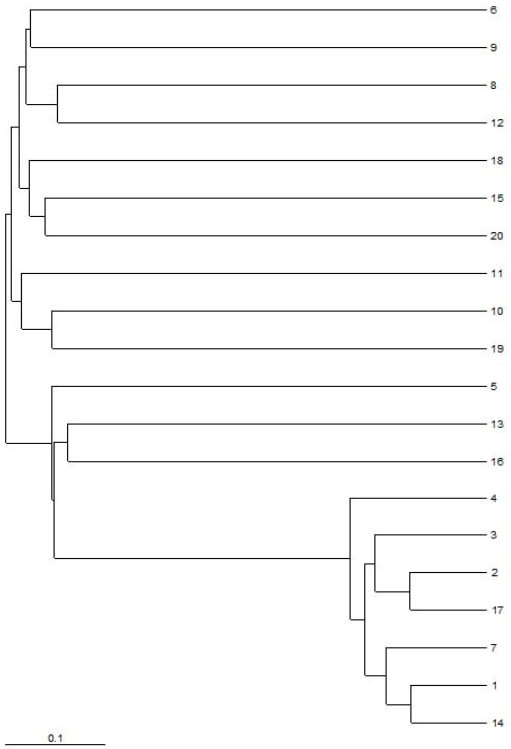
F



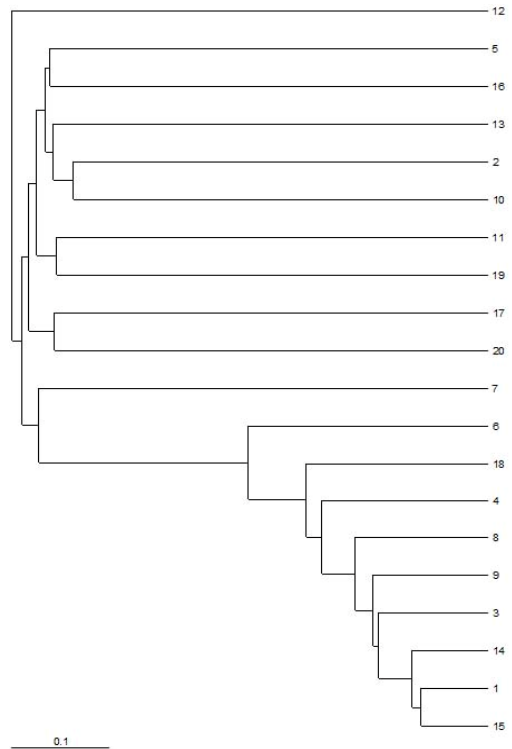
G



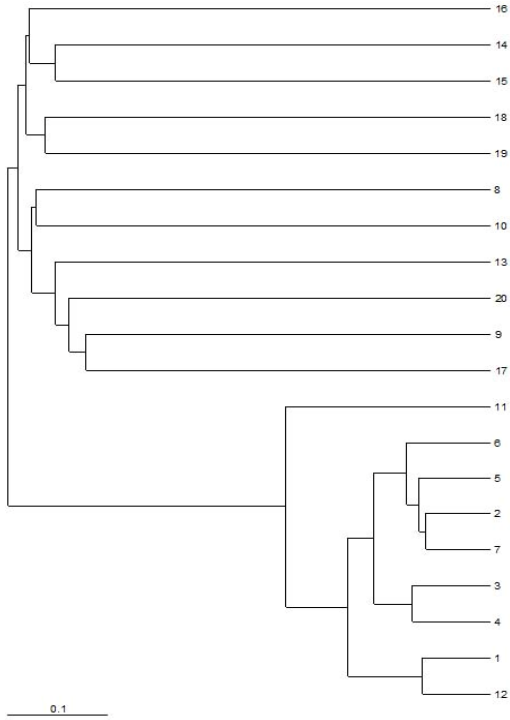
H



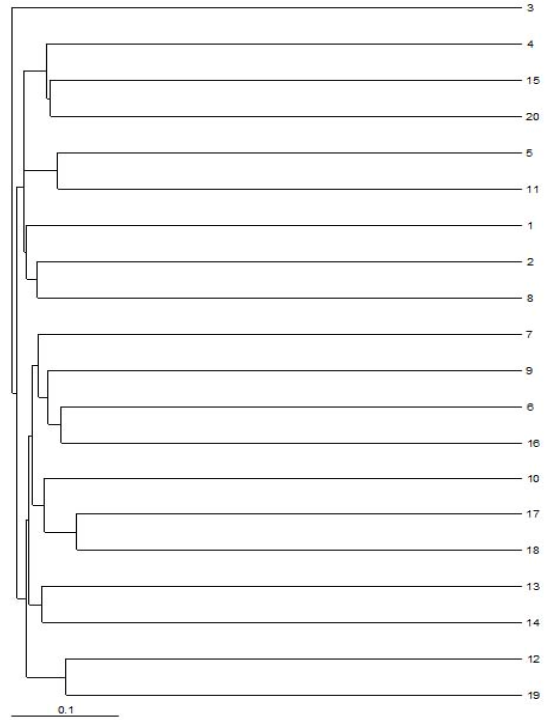
I



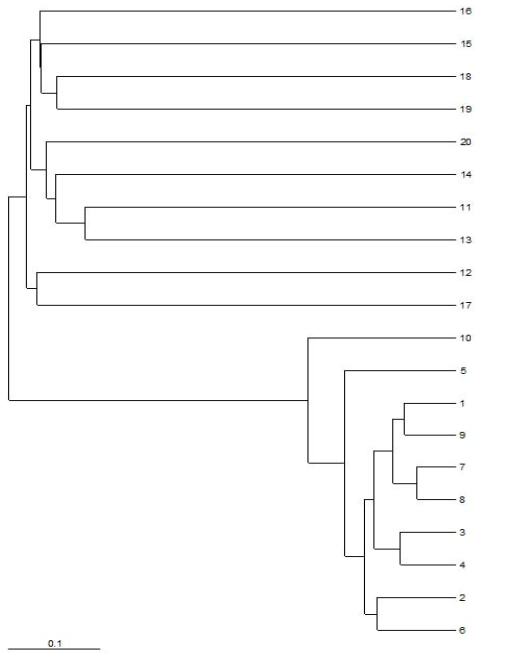
J



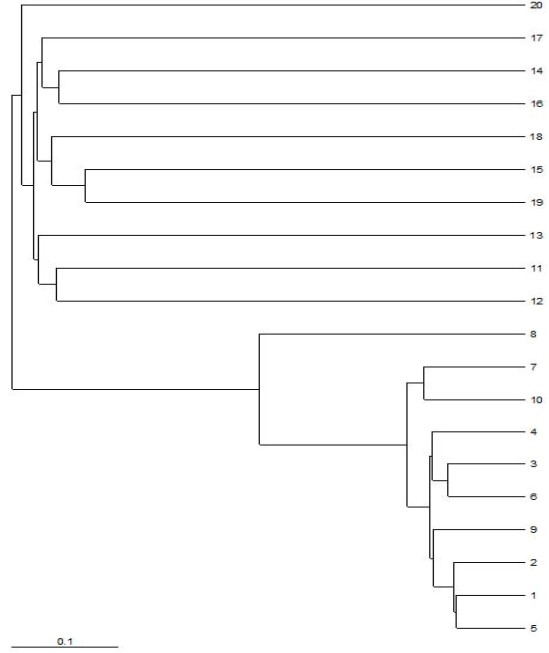
K



L



M



N

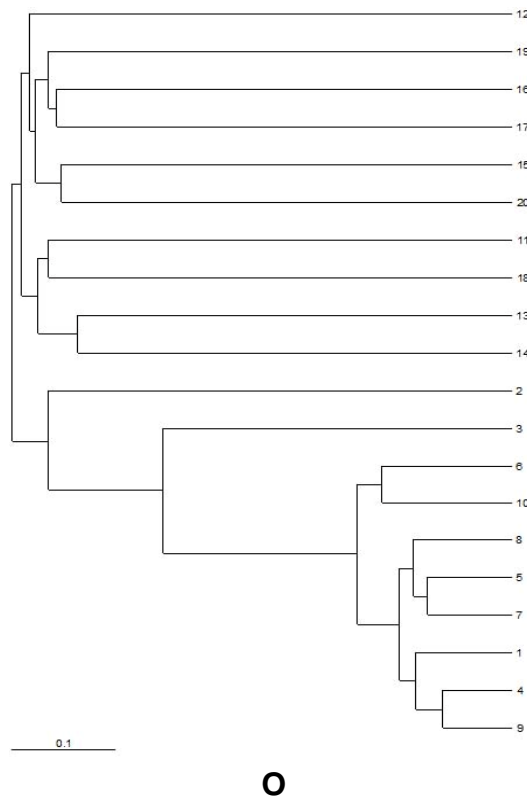
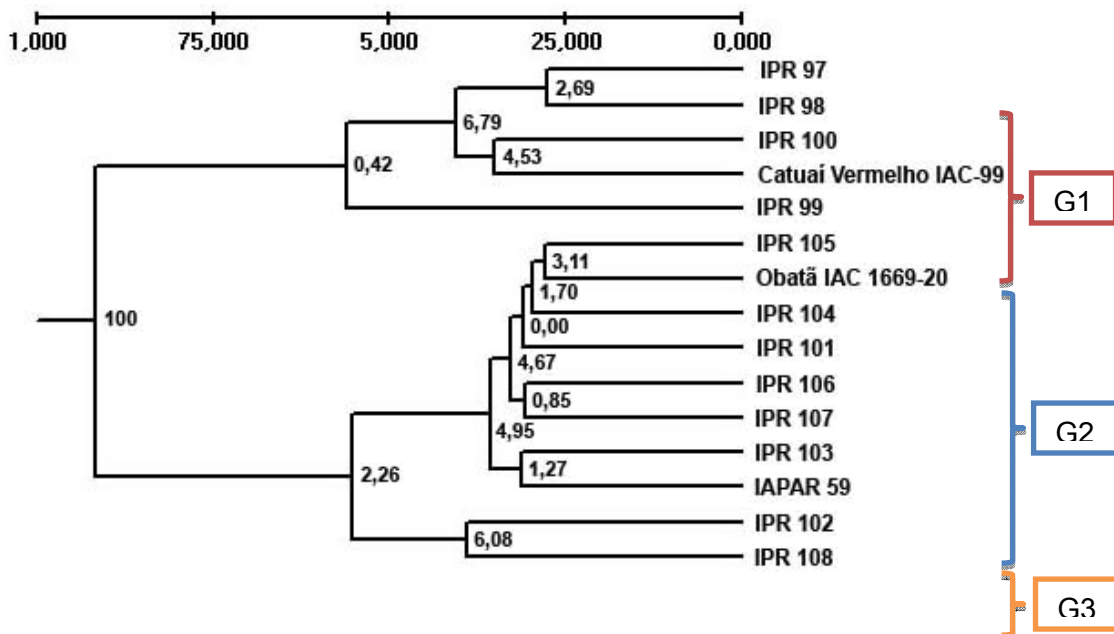


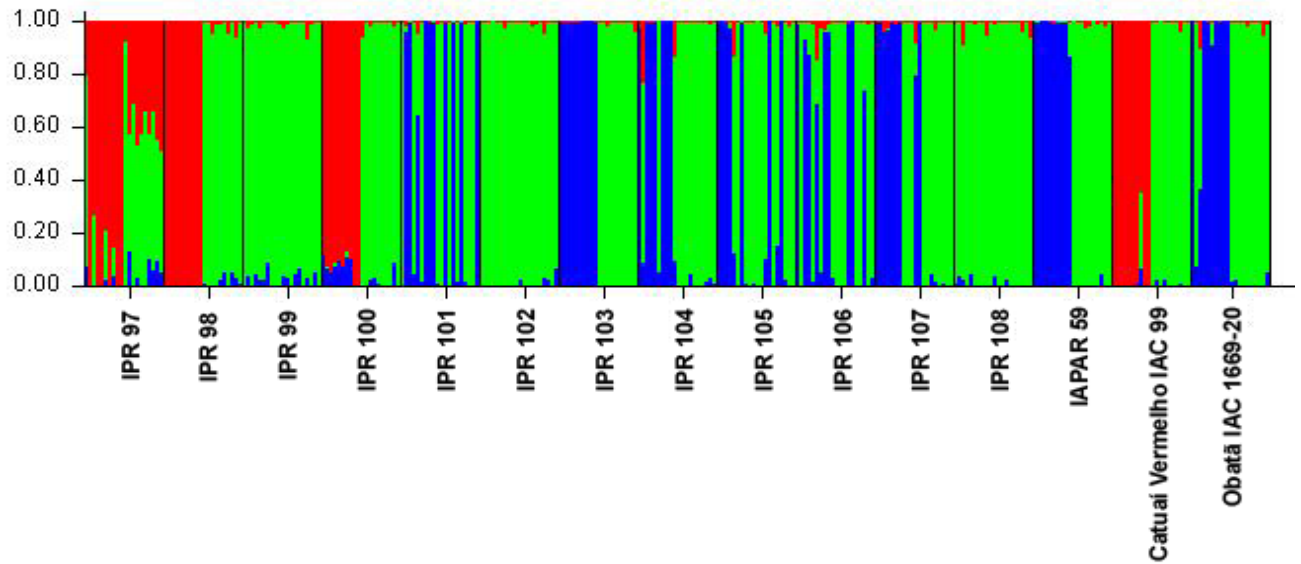
Figura 3 – Dendrograma construído com base na distância genética de Nei (1978) pelo método UPGMA para as 15 cultivares de *Coffea arabica*.



Através da análise Bayesiana, foi estimado o número de possíveis agrupamentos populacionais, onde foi encontrado valor de $k=3$ (Figura 4). Observe-se a formação de um primeiro grupo pelas cultivares IPR 97, IPR 98, IPR 100 e Catuai Vermelho IAC-99, um segundo grupo pelas cultivares IPR 101, IPR 103, IPR

104, IPR 105, IPR 106, IPR 107, IAPAR 59 e Obatã IAC 1669-20, e um terceiro grupo pelas cultivares IPR 99, IPR 102 e IPR 108.

Figura 4 – Estrutura genética das cultivares inferidas pela análise Bayesiana. O eixo y indica a porcentagem de membros em cada agrupamento k. As cultivares estão indicadas no eixo x.



5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, verificou-se que a diversidade gênica de Nei (H_S) variou de 0,07 a 0,22 (Tabela 2). Geleta et al. (2012) usando 12 pares de *primers* de microssatélites em 26 variedades de *C. arabica*, mostraram $H_S = 0,29$. Em variedades da Etiópia, Anthony et al. (2001) encontraram $H_S = 0,07$ e Cubry et al. (2008) mostraram uma diversidade média de 0,30. Como verificado, estes valores de medida da variabilidade genética variam segundo as cultivares estudadas. Setotaw et al. (2010) em acessos de híbrido de Timor com marcadores AFLP, verificaram que a diversidade gênica de Nei é de 0,135. Estes mesmos autores com marcadores RAPD calcularam um valor de 0,153 e de 0,059 com o uso de marcadores SSR. Os diferentes resultados para a diversidade gênica de Nei devem depender da origem das mesmas cultivares, isto é, se são originadas de híbridos interespecíficos tais como Híbrido de Timor ou híbrido natural de *C. arabica* x *C. liberica* ou se originaram de seleção de *C. arabica*.

Analisando a Tabela 2, verificou-se que plantas que tem porcentagem de locos polimórficos semelhantes, tais como IPR 97, IPR 99 e IPR 108 (48,01%, 45,14% e 46,23% respectivamente), apresentam na realidade valores diferentes de diversidade gênica. Estes dados mostram que apesar destas três cultivares terem uma porcentagem de locos polimórficos semelhantes, apresentam valores diferentes de diversidade gênica de Nei, pois este parâmetro genético em duas cultivares é em torno de $\frac{1}{3}$ (IPR 97 e IPR 99). Estas observações são corroboradas pela Figura 2, pois a análise dos diferentes dendrogramas destas cultivares mostra de uma maneira clara que a cultivar IPR 97 apresenta uma variabilidade genética maior que as outras duas cultivares. Este tipo de análise pode ser realizada na comparação entre todas as cultivares analisadas neste trabalho. Outro fato que se deve chamar a atenção é a comparação entre a Tabela 1 e a Tabela 2. A cultivar IPR 107 foi selecionada até a geração F_4 enquanto IPR 106 tornou-se cultivar na geração F_8 . Porém, as diversidades gênicas de Nei (Tabela 2) destas duas cultivares são 0,16 e 0,17, respectivamente. Estes dados mostram que mais gerações de seleção não afetaram de maneira drástica a variabilidade genética dos materiais selecionados. Isto provavelmente deve-se ao fato da cultivar IPR 107 (*C. arabica* x Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*)) ser constituída por um maior conteúdo genético de café arábico, restringindo sua taxa de variabilidade

genética apesar de ainda estar em geração de seleção F_4 , e a cultivar IPR 106 (*C. arabica* x *C. canephora*) ser constituída por um maior conteúdo genética de café canéfora, fazendo com que esta cultivar, apesar de estar em processo de seleção avançado (F_8), ainda disponha de uma taxa de variabilidade genética considerável. Também, devemos resaltar que a intensidade de seleção variou na obtenção destas diferentes cultivares, o que explicaria em parte a diferença de variabilidade genética entre as cultivares obtidas em diferentes gerações de seleção.

Nas cultivares estudadas, quatro grupos podem ser separados: 1- aquelas que vieram do cruzamento de *C. arabica* com Híbrido de Timor (IPR 97, IPR 98, IPR 99, IPR 104, IPR 107, IAPAR 59 e Obatã IAC 1669-20), 2- cultivares provenientes do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora* (IPR 102, IPR 103, IPR 106 e IPR 108). 3- Materiais provenientes do cruzamento entre *C. arabica* e *C. liberica* (IPR 100, IPR 101 e IPR 105) e 4- materiais com somente germoplasma de *C. arabica* (Catuaí Vermelho IAC-99). Todavia, ao observarmos a Tabela 2, verifica-se que o número de locos polimórficos, porcentagem de locos polimórficos e diversidade gênica de Nei apresentam valores discrepantes, mesmo todas estas cultivares sendo originárias do cruzamento de *C. arabica* com Híbrido de Timor. Bertrand; Anthony; Lashermes (2001) baseado em distância genética obtidos de marcadores moleculares mostram que quanto a sua origem, os Híbridos de Timor podem ser classificados em dois grupos: 1- o grupo de acesso derivado de CIFC 1343, e 2- os grupos de acesso derivados do acesso CIFC 832/1 e CIFC 832/2. A diferença entre os dois grupos deve ser devido à fragmentos cromossômicos derivados de *C. canephora* pela hibridação introgressiva, pois genes para resistência encontrados em CIFC 1343 são diferentes daqueles encontrados em CIFC 832/1 e CIFC 832/2. Analisando 21 acessos derivados do Híbrido de Timor, Anthony et al. (2001) verificaram que os fragmentos introgressos foram estimados em representar 8 - 21% do genoma de *C. canephora*. Assumindo um único genótipo, estes autores estimaram que em torno de 51% do genoma de *C. canephora* está representado no Híbrido de Timor. Estes dados confirmam as diferenças nas variabilidades genéticas encontradas neste estudo entre os materiais derivados do Híbrido de Timor (Tabela 2). Esta mesma variação foi observada na variabilidade genética das várias cultivares originadas do cruzamento entre Villa Sarchi e Híbrido de Timor verificado por Silveira et al. (2003), analisando a variabilidade genética das progênies IAPAR 75163/22, IAPAR 77028-11-1, IAPAR 77028-11-2, IAPAR 77028-11-3, IAPAR

77028-11-4, IAPAR 77028-11-5 e IAPAR 77028-11-6. Estes autores verificaram uma variação na porcentagem de locos polimórficos de 31,31% a 40,40%, enquanto neste trabalho a variação da porcentagem de locos polimórficos nas cultivares que originaram-se de Híbrido de Timor tiveram uma variação de 28,04% a 48,01%.

Tendo em vista as quatro cultivares (IPR 102, IPR 103, IPR 106 e IPR 108) derivadas da hibridação entre *C. arabica* e *C. canephora*, também observou-se uma grande diferença entre os índices de variabilidade genética (número de locos polimórficos, porcentagem de locos polimórficos e diversidade gênica de Nei). É interessante observar que as cultivares IPR 102 e IPR 103 que praticamente tiveram origens semelhantes (Catuaí x Icatú) mostraram variabilidades genéticas completamente diferentes, pois a primeira mostra uma porcentagem de locos polimórficos de 40,08 e diversidade gênica de Nei de 0,07 enquanto a segunda mostra valores de 29,00 e 0,17, respectivamente. Provavelmente, isto pode ser explicado pelo fato de que, apesar destas duas cultivares (IPR 102 e IPR 103) terem uma mesma origem (*C. arabica* x *C. canephora*), podem ter sido submetidas à pressão de seleção diferente para o caráter selecionado; o fato de uma suposta pequena população amostral (F_2) da cultivar IPR 102 estreitando a variabilidade genética desta população; e também o fator contaminação, fazendo com que houvessem taxas de variabilidade genética bastante diferentes uma da outra apesar de estarem praticamente em uma mesmo estágio de seleção (IPR 102: F_8 e IPR 103: F_7).

Analisando o terceiro grupo resultante do cruzamento entre *C. arabica* e *C. liberica*, observou-se também diferenças na variabilidade genética. O híbrido resultante do cruzamento entre *C. arabica* e *C. liberica* ocorreu espontaneamente em plantações da Índia (S.26), sendo esta planta utilizada posteriormente como fonte para resistência à ferrugem em várias regiões onde o café é cultivado (ANTHONY et al., 2001; PRAKASH et al., 2002). Anthony et al. (2001) estudando os descendentes da planta S.288 e 17 linhagens resultantes da introgressão entre S.288 x *C. arabica* var. Kent, verificaram uma grande variação no número de bandas de AFLP entre as linhas resultantes da introgressão. Também verificaram que o número de marcas que sofreram introgressões estava restrito a poucos fragmentos cromossômicos. Uma comparação feita por Lashermes et al. (2000) é que o número de bandas polimórficas atribuído à introgressão foram maiores nos materiais originários do Híbrido de Timor do que nos materiais

originários de S.288. Todavia, a análise da Tabela 2 mostra que as diferentes origens entre as cultivares derivadas do Híbrido de Timor e do híbrido S.288, são semelhantes.

A análise da variância molecular (AMOVA) (Tabela 3) mostrou um valor relativamente alto de variabilidade genética dentro de populações (83,87%). Silveira et al. (2003) em seu trabalho analisando seis progênies do IAPAR 77028-11 (germoplasma Sarchimor na geração F_5), IAPAR 59 e Catuaí Vermelho IAC-81, encontraram variabilidade genética dentro de populações de 61,5% e entre populações de 38,5%. Estas diferenças devem-se ao fato de que no presente trabalho foram analisadas várias cultivares originadas do Híbrido de Timor, da hibridação entre *C. arabica* e *C. canephora*, e cultivares provenientes da hibridação entre *C. arabica* e *C. liberica*, fato que aumentou a variabilidade genética dentro de populações.

Neste trabalho, a análise do F_{ST} par a par (Tabela 4) juntamente com a diversidade gênica de Nei (Tabela 2), mostrou cultivares com valores altos de diversidade gênica de Nei e valores altos de F_{ST} . Estas cultivares no futuro podem ser utilizados no sentido de se obter híbridos com melhor performance. Entre os cruzamentos que poderiam fornecer melhores híbridos pode-se citar o cruzamento entre as cultivares IPR 97 ($H_S = 0,20$) x IPR 101 ($H_S = 0,17$). Estas cultivares mostraram valores de F_{ST} de 0,26. Estes dados mostram que estas cultivares, além de apresentarem boa variabilidade genética dentro, apresentam distância genética razoável, condição essencial para obtenção de bons híbridos. Alguns outros exemplos de cruzamentos que podem ser recomendados por apresentarem potenciais de formarem bons híbridos são os cruzamentos entre IPR 97 x IPR 104, IPR 97 x IPR 106, IPR 97 x IPR 107.

CONCLUSÕES

1. O número de gerações de seleção na obtenção de cultivares teve pouca influência sobre o nível da variabilidade genética dentro das cultivares. Isto ocorreu pelo fato da intensidade de seleção ser diferente na obtenção das diferentes cultivares estudadas;
2. Cultivares de origens semelhantes mostraram valores de variabilidade genética dentro e entre diferentes;

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Capes pela bolsa de Mestrado e ao Consórcio Pesquisa Café pelo financiamento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **A história do café – /origem e trajetória**. 2011. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>>. Acesso em: 06 ago. 2013.
- 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 SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 894–900, 2002.
- ANTHONY, F. et al. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, v. 118, p.53-65, 2001.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. **Plant Pathology**, v. 50, p. 637-643, 2001
- CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C. Banco de germoplasma de café do Instituto Agrônômico. In: **CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA**, 30, São Paulo, 1984.
- CHARRIER, A. **La structure génétique des caféiers spontanés de la region Malgache (Mascarocoffea)**. Leur relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea) série Mémoires 87. Paris: ORSTOM Press, 1978. 223p.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café: safra 2014, primeira estimativa**. Brasília: CONAB, 2014. 26 p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.480 p.
- CUBRY, P. et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: Structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome**, v. 51, p. 50–63, 2008.
- DESSALEGN, Y.; HERSELMAN, L.; LABUSCHAGNE, M. T. AFLP analysis among Ethiopian arabica coffee genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 3193-3199, 2008.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh laeftissue. **Photochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- EIRA, M. T. S.; FAZUOLI, L. C.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B.; FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; SERA, T.; PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; CARVALHO, C. H.; PADILHA, L.; SOUZA, F. F. Bancos de Germoplasma de Café no Brasil: Base do Melhoramento para Produtividade e Qualidade. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2007.

EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FAZUOLI, L. C et al. **Cultivares de café selecionadas pelo Instituto Agronômico de Campinas**. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2000. Brasília: EMBRAPA CAFÉ/MINASPLAN, 2000. p.488-493.

FAZUOLI, L. C. et al. Obatã (IAC 1669-20) e Tupi (IAC 1669-33), cultivares de café de porte baixo e resistentes a ferrugem. In: 22º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 1996. **Anais...** Águas de Lindóia, 1996. p.149-150.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Eds.). **Cultura do cafeeiro**. Piracicaba: Patafos, 1986. p.87-113.

GELETA, M. et al. Genetic diversity of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as estimated by simple sequence repeat markers. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

HUBISZ, J.M.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1322-1332, 2009.

ICO. **Organização Internacional do Café**. 2011. Disponível em:<<http://www.ico.org/prices/po.htm>>. Acesso em: 06 ago. 2013.

LASHERMES, P. et al. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 139–146, 2000.

MARQUES, E. M. G. et al. Comportamento de cultivares de café conilon no sul do Estado do Espírito Santo. In: 2º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 2001. **Anais...** Vitória: EMBRAPA, 2001. p.1307-1311.

MATIELLI, A.; RUGGIERO, S.S. **Agronegócio Café: histórico e tendências**. Disponível em:<<http://temas.buscaki.com.br/agronegocios/003.htm>>. Acesso em: 06 maio. 2005.

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

MILLER, M. P. TFPGA 1.03: 1997. **Tools for population genetics analyses** (Programa para computador livre distribuído pelo autor) Disponível em <www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.htm>. Acessado em Dezembro de 2013

NEI, M. Molecular evolutionary genetics. **Columbia University Press**, New York, NY, USA. 1978.

- NOIR, S et al. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, v. 52, p. 97-103, 2003.
- PEARL, H. M. et al. Construction of a genetic map for arabica coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 829-835, 2004.
- PRAKASH, N. S. et al. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 1311-1317, 2004.
- PRAKASH, N. S. et al. AFLP analysis of introgression in coffee cultivars of (*Coffea arabica* L.) derived from a natural interspecific hybrid. **Euphytica**, v. 124, p. 265–271, 2002.
- RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic diagnostics in plant breeding – RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, v. 9, p.275–280, 1993.
- SCHLÜTER, P. M., HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 569-572, 2006
- SETOTAW, T. A. et al. Breeding potential and genetic diversity of “Híbrido do Timor” coffee evaluated by molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, p. 298-304. 2010.
- 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**, v.26, p. 329-336, 2003.
- SOUZA, F. F.; SANTOS, M. M.; VENEZIANO, W. Manejo de recursos genéticos de café em Rondônia. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 3, 2003, Porto Seguro. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2003, p. 238.
- SMITH, R. F. A history of coffee. In: CLIFFORD M. N.; WILLSON, K. C. (Eds.). **Coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage**. Sydney: Croom Helm Ltd.,1985. p. 1–12.
- STEIGER, D. L. et al. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 209–215, 2002.
- TAUNAY, A. E. **História do café no Brasil**. Rio de Janeiro: Departamento Nacional do Café, 1939.
- VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407–4414, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **A história do café – origem e trajetória**. 2011. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>>. Acesso em: 06 ago. 2013.
- 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 SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 894–900, 2002.
- ANTHONY, F. et al. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, v. 118, p.53-65, 2001.
- AYAD, W.G. et al. (Eds.). **Molecular genetic techniques for plant genetic resources**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 137p.
- BERTHOU, F.; MATHIEU, C.; VEDEL, F. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as an indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 65, p.77–84, 1983.
- BERTHOU, F.; TROUSLOT, P. Analysis of enzymatic polymorphism in the genus *Coffea*: adaptation of an electrophoresis method in series: first results. In: **8° Colloque Scientifique International sur le Café**. Abidjan, 1979. p. 373–383.
- BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee: Agronomy**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.1-42.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. **Plant Pathology**, v. 50, p. 637-643, 2001.
- BERTRAND, B. et al. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes. In: **Guatemala and Meloidogyne sp. Nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America**. Euphytica, 2000. p. 79–86.
- BORÉM, A., CAIXETA, E.T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374 p.
- BUSTAMANTE, J.; POLANCO-LOAIZA, D. Caracterización molecular de genotipos de café (*Coffea arabica* L.). **Anales de Botánica**, v. 66, p. 21-28,1999.
- CAIXETA, E. T; FERRÃO, L. F. V; ZAMBOLIM, E. M. Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Eds.). **Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013, p. 31-68.
- CARVALHO, A. Principles and practices of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: CLARKE, R.J; MACRAE, R. (Eds.). **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 129–165.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C. Banco de germoplasma de café do Instituto Agrônômico. In: **CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA**, 30, São Paulo, 1984.

CARVALHO, A. et al. Coffee. In: FERWERDA, F.P; WIT, F. (Eds.). **Outlines of perennial crop breeding in the tropics**. Wageningen: Veenman & Zonen, 1969. p.189–241.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N.; WILLSON K.C. (Eds.). **Coffee: botany biochemistry and production of beans and beverage**. Sydney: Croom Helm Ltd, 1985. p. 13–47.

CHARRIER, A. **La structure génétique des caféiers spontanés de la region Malgache (Mascarocoffea)**. Leur relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea) série Mémoires 87. Paris: ORSTOM Press, 1978. 223p.

CEPLAC - COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. **Café**. 2010. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cafe.htm>>. Acesso em: 06 ago. 2013.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café: safra 2014, primeira estimativa**. Brasília: CONAB, 2014. 26 p.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café: safra 2010, quarta estimativa**. Brasília: CONAB, 2010. 20 p.

COSTA, P. et al. Genetic Map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p.39-48, 2000.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 382 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.480 p.

CUBRY, P. et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: Structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome**, v. 51, p. 50–63, 2008.

DAMASCENO, J. O. **Estrutura Populacional de *Aspidosperma Polyneuron* Muel. Arg. (Apocynaceae) em Fragmento Florestal do baixo rio Tibagi por marcadores AFLP**. 2010. 51 fls. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

DESSALEGN, Y.; HERSELMAN, L.; LABUSCHAGNE, M. T. AFLP analysis among Ethiopian arabica coffee genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 3193-3199, 2008.

DIAS, L. A. S. Variância de frequências alélicas. In: ALFENAS, A. C. (ed.). **Eletroforese de enzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p.381-404.

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

EIRA, M. T. S.; FAZUOLI, L. C.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B.; FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; SERA, T.; PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; CARVALHO, C. H.; PADILHA, L.; SOUZA, F. F. Bancos de Germoplasma de Café no Brasil: Base do Melhoramento para Produtividade e Qualidade. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2007.

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

EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FAZUOLI, L. C et al. **Cultivares de café selecionadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas**. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2000. Brasília: EMBRAPA CAFÉ/MINASPLAN, 2000. p.488-493.

FAZUOLI, L. C. et al. Obatã (IAC 1669-20) e Tupi (IAC 1669-33), cultivares de café de porte baixo e resistentes a ferrugem. In: 22º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 1996. **Anais...** Águas de Lindóia, 1996. p.149-150.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Eds.). **Cultura do cafeeiro**. Piracicaba: Patafos, 1986. p.87-113.

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

FERWERDA, F. P. Coffee. In: SIMPSONS, N. W (Ed.). **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. p.257–260.

GELETA, M. et al. Genetic diversity of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as estimated by simple sequence repeat markers. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

HERRERA J. C. et al. Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): Segregation and recombination of the *C. canephora* genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C. Arabica* x *C. canephora*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 661–668, 2002.

HUBISZ, J.M.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 1322-1332, 2009.

ICO. **Organização Internacional do Café**. 2011. Disponível em: <<http://www.ico.org/prices/po.htm>>. Acesso em: 06 ago. 2013.

JOLY, A. B.; LEITÃO FILHO, H. F. **Botânica Econômica: as principais culturas brasileiras**. São Paulo: HUCITE/EDUSP, 1979. 114 p.

KRUG, C.A.; CARVALHO, A. The genetics of coffee. **Advances in genetics**, v. 4, p.127–158, 1951.

KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.; CARVALHO, A. Taxonomia de *Coffea arabica* L. Descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo. **Bol. Téc. do Instituto Agrônomo de Campinas**, n. 62, 1939. 9-57 p.

LASHERMES, P. et al. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 139–146, 2000.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, v. 26, p. 259-266, 1999.

LASHERMES, P. et al. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, v. 87, p. 59-64, 1996.

LOPES, C. R. Phylogenetic studies of some species of the genus *Coffea*. II - Analysis of isoenzymatic data. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 393-407, 1993.

MALUF, M. P. et al. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR markers systems. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 366–373, 2005.

MARQUES, E. M. G. et al. Comportamento de cultivares de café conilon no sul do Estado do Espírito Santo. In. 2º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 2001. **Anais...** Vitória: EMBRAPA, 2001. p.1307-1311.

MATIELLI, A.; RUGGIERO, S.S. **Agronegócio Café: histórico e tendências**. Disponível em: <<http://temas.buscaki.com.br/agronegocios/003.htm>>. Acesso em: 06 maio. 2005.

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

MÉNDEZ, A. J. et al. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 13, p. 30-42, 2005.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 106

fls. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: _____. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MILLER, M. P. TFPGA 1.03: 1997. **Tools for population genetics analyses** (Programa para computador livre distribuído pelo autor) Disponível em <www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.htm>. Acessado em Dezembro de 2013.

MISHRA, M. K. et al. Genetic Diversity Among Indian Coffee Cultivars Determined via Molecular Markers. **Journal of Crop Improvement**, v. 26, p. 727-750, 2012.

MISHRA, M. K. et al. Genome organization in coffee as revealed by EST PCRFLP, SNPs and SSR analysis. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 14, p. 25-37, 2011.

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

NEI, M. Molecular evolutionary genetics. **Columbia University Press**, New York, NY, USA. 1978.

NOIR, S et al. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, v. 52, p. 97-103, 2003.

OROZCO-CASTILLO, C. et al. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 934–940, 1996.

OROZCO-CASTILLO, C. et al. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 934–940, 1994.

PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PÉTRARD, V. Construction of a molecular linkage maps in coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 41-47, 1996.

PEARL, H. M. et al. Construction of a genetic map for arabica coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 829-835, 2004.

PEJIC, I. et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p.1248–1255, 1998.

PORTIS, E. et al. Amplified fragment length polymorphism for variety identification and genetic diversity assessment in Oleander (*Nerium oleander* L.). **Euphytica**, v. 136, p. 125-137, 2004.

POWELL, W. et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225–238, 1996.

PRAKASH, N. S. et al. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 1311-1317, 2004.

PRAKASH, N. S. et al. AFLP analysis of introgression in coffee cultivars of (*Coffea arabica* L.) derived from a natural interspecific hybrid. **Euphytica**, v. 124, p. 265–271, 2002.

RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic diagnostics in plant breeding – RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, v. 9, p.275–280, 1993.

RAMALHO, M. A. P; SANTOS, J. B; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 4. ed. Lavras: UFLA, 2008. 464 p.

RUSSELL, J. R. et al. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95 p. 714–722, 1997.

SETOTAW, T. A. et al. Breeding potential and genetic diversity of “Híbrido do Timor” coffee evaluated by molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, p. 298-304. 2010.

SHAN, F. et al. Development of DNA fingerprinting keys for discrimination of *Cicer echinospermum* (P.H. Davis) accessions using AFLP markers. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, p. 947-952, 2004.

SCHLÜTER, P. M., HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 569-572, 2006.

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**, v.26, p. 329-336, 2003.

SILVESTRINI, M. et al. Genetic diversity and structure of Ethiopian, Yemen and Brazilian *Coffea arabica* L. accessions using microsatellites markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 1367–1379, 2007.

SMITH, R. F. A history of coffee. In: CLIFFORD M. N.; WILLSON, K. C. (Eds.). **Coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage**. Sydney: Croom Helm Ltd.,1985. p. 1–12.

SOUZA, F. F.; SANTOS, M. M.; VENEZIANO, W. Manejo de recursos genéticos de café em Rondônia. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 3, 2003, Porto Seguro. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2003, p. 238.

STEIGER, D. L. et al. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 209–215, 2002.

TAUNAY, A. E. **História do café no Brasil**. Rio de Janeiro: Departamento Nacional do Café, 1939.

THOMAZIELLO, R. A. et al. **Café arábica: cultura e técnicas de produção**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2000. 82 p. (Boletim técnico 187).

VAN DER VOSSSEN, H. A. M. Coffee selection and breeding. In: CLIFFORD, M. N.; WILLSON, K. C. (Eds). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Helm, 1985. p. 48–96.

VIEIRA, E. S. N. et al. Development of microsatellite markers for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 507–514, 2010.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407–4414, 1995.

WELLMAN, F.L. **Coffee, botany, cultivation and utilization**. London: Leonard Hill Books, 1961. 488 p.

WRIGLEY, G. Coffee-coffea spp. (Rubiaceae). In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N.W. (Eds.). **Evolution of crop plants**. England: Longman Scientific and Technical, 1995. p. 438–443.

ZHIVOTOVSKY, L. A. Estimation population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Molecular Ecology**, v.8, p.907-913, 1999.