

TEREZINHA APARECIDA TEIXEIRA CABRAL

PADRÕES MOLECULARES, DIVERSIDADE GENÉTICA E MAPA  
PARCIAL DE LIGAÇÃO DO CAFEEIRO

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
JULHO - 2001

TEREZINHA APARECIDA TEIXEIRA CABRAL

PADRÕES MOLECULARES, DIVERSIDADE GENÉTICA E MAPA  
PARCIAL DE LIGAÇÃO DO CAFEIRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001

TEREZINHA APARECIDA TEIXEIRA CABRAL

PADRÕES MOLECULARES, DIVERSIDADE GENÉTICA E MAPA  
PARCIAL DE LIGAÇÃO DO CAFEEIRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 24 de julho de 2001.

---

Dr. Antonio Alves Pereira  
(Conselheiro)

---

Prof. Laércio Zambolim  
(Conselheiro)

---

Prof. Cosme Damião Cruz

---

Dr. Ivan Schuster

---

Prof. Ney Sussumu Sakiyama  
(Orientador)

Aos meus pais, Paulo (*in memoriam*) e Maria

Aos meus irmãos, José, Múnico e Leila

Ao meu esposo José Flávio

À minha sobrinha Bruna

## AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade em realizar este curso.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa.

Ao Professor Ney, pela dedicação e orientação e, principalmente, pela preocupação com a formação de um profissional competente.

Ao Professor Laércio Zambolim, pela confiança, pelo apoio, pelas sugestões e pelo empenho na realização do trabalho.

Ao pesquisador da EPAMIG Dr. Antonio Alves Pereira, pela amizade, pelo incentivo e pelo exemplo de amor à pesquisa.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pelo apoio, pelo aconselhamento e sugestões.

Ao Professor Cosme Damião Cruz e ao Dr. Ivan Schuster, pela valiosa colaboração durante a realização do trabalho e curso.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de curso e de laboratório, pelo convívio.

Aos funcionários Delfim, Geraldo, Valtinho e José Carlos, pelo apoio na condução do trabalho.

Aos meus amigos Raquel de Freitas, Leonardo Parequi, Giovana Torres e Bárbara Fontes, pelo convívio e demonstrações de carinho e amizade.

Aos meus pais, pelo exemplo de perseverança, de simplicidade e amor ao próximo.

A meus irmãos e sobrinhas, por serem a minha família.

Ao meu esposo José Flávio, pelo amor, pelo companheirismo, pelo incentivo, pela compreensão e pelo desprendimento demonstrados em todos os momentos de nossa convivência.

À FAPEMIG, à FINEP e ao CBP&D-Café, pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. O cafeeiro.....	03
2.1.1. Taxonomia e citogenética.....	03
2.1.2. Diversidade genética.....	14
2.1.3. Genética e melhoramento.....	16
2.1.4. Resistência à <i>Hemileia vastatrix</i> .....	20
2.2. Marcadores genéticos.....	25
2.2.1. Marcadores moleculares.....	26
2.3. Mapas de ligação.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE ACESSOS DO SUBGÊNERO <i>Coffea</i> AVALIADAS POR MARCADORES RAPD.....	42
RESUMO.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50

4.	CONCLUSÕES.....	
		66
REFERÊNCIAS	BIBLIOGRÁFICAS.....	
		67
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CLONES DE CAFEEIROS		
DIFERENCIADORES DE <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. Et Br.....		
		70
RESUMO.....		
		70
1.	INTRODUÇÃO.....	
		71
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	
		74
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	
		77
4.	CONCLUSÕES.....	
		83
REFERÊNCIAS	BIBLIOGRÁFICAS.....	
		84
MAPA PARCIAL DE LIGAÇÃO GÊNICA DE <i>Coffea arabica</i> L.....		
		87
RESUMO.....		
		87
1.	INTRODUÇÃO.....	
		89
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	
		93
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	
		96
4.	CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS	BIBLIOGRÁFICAS.....	104



## RESUMO

TEIXEIRA-CABRAL, Terezinha A., D.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2001. **Padrões moleculares, diversidade genética e mapa parcial de ligação do cafeeiro.** Orientador: Ney Sussumu Sakiyama. Conselheiros: Antonio Alves Pereira, Everaldo Gonçalves de Barros e Laércio Zambolim.

Cinquenta e dois *primers* arbitrários foram utilizados para avaliar a reprodutibilidade e a influência do número de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) na estimação de distâncias genéticas entre 40 acessos do gênero *Coffea* do banco de germoplasma da UFV/EPAMIG (incluindo 4 espécies diferentes). A técnica RAPD mostrou-se adequada para a estimação de distâncias genéticas (complemento de Jaccard) entre acessos de *Coffea*, obtendo-se nível de reprodutibilidade de 76,88%. O número de locos não influenciou a formação dos grupos principais, mas influenciou a ordenação dos acessos dentro dos subgrupos. Para a caracterização molecular de 18 clones diferenciadores de raças de *Hemileia vastatrix* foram utilizados 35 *primers* da Operon Technologies, Inc. Os 35 *primers* identificaram 158 locospolimórficos. O agrupamento, utilizando o método UPGMA, foi realizado com base na matriz de valores de dissimilaridades (complemento de Jaccard), e os grupos formados foram compatíveis com as informações disponíveis na literatura sobre a origem genealógica. A técnica RAPD foi eficaz na caracterização dos clones diferenciadores, produzindo marcas específicas para cada clone. O mapa parcial de ligação gênica para *Coffea arabica* L. foi construído a partir de uma população segregante RC<sub>1</sub> obtida do cruzamento entre Mundo Novo (IAC 464-18) e Híbrido

de Timor (CIFC 2570), sendo este último utilizado como genitor recorrente. Foram obtidos 93 marcadores RAPD, dos quais 87 (93,5%) apresentaram segregação 1:1 ( $P>0,01$ ), quatro (4,4%) segregação 2:1 ( $P>0,05$ ) e dois (2,2%) segregação 5:1 ( $P>0,05$ ). Para construção do mapa, foram utilizados os 87 marcadores que segregaram 1:1, sendo que cinco não mostraram -se ligados aos grupos formados. Oitenta e dois marcadores RAPD resultaram em oito grupos de ligação cobrindo 540,6 cM. Os grupos obtidos tiveram uma boa densidade de marcadores, exceto dois grupos. O maior intervalo entre dois marcadores foi 36.4 cM, e 94,5% dos intervalos não excederam a 20 cM. O tamanho dos grupos de ligação apresentou alta correlação com o número de marcadores ( $r=0,887$ ), indicando distribuição aleatória dos marcadores nos grupos. O número de grupos de ligação é inferior ao correspondente número haplóide de cromossomos (22) e, portanto, o genoma da espécie foi parcialmente explorado e muitas regiões ainda não foram identificadas.

## ABSTRACT

TEIXEIRA-CABRAL, Terezinha A., D.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2001. **Molecular patterns, genetic diversity and partial linkage map of coffee plant.** Adviser: Ney Sussumu Sakiyama. Committee members: Antonio Alves Pereira, Everaldo Gonçalves de Barros and Laércio Zambolim.

Fifty two arbitrary *primers* were used to evaluate the reproductibility and the influence of the marker numbers RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) in estimating the genetic distances among 40 accesses of the *Coffea* genus from the germplasm bank of UFV/EPAMIG (including 4 different species). The RAPD technique was shown to be appropriate for estimating the genetic distances (Jaccard complement) among *Coffea* accesses, as a reproductibility level of 76.88% is obtained. The loci numbers did not influence the formation of the main groups, however it influenced the ordering of the accesses within subgroups. For molecular characterization of 18 coffee differentials to identify *Hemileia vastatrix* races, 35 *primers* from Operon Technologies, Inc were used. The 35 *primers* identified 158 polymorphic loci. The grouping by the UPGMA method was accomplished based on dissimilarity values matrix (Jaccard complement), and the formed groups were compatible to the information available in literature on genealogical origin. The RAPD technique was effective in characterization of the coffee differentials, so producing specific marks for each clone. The partial genetic linkage map for *Coffea arabica* L. was built from a segregative RC<sub>1</sub> population obtained from crossbreeding between Mundo Novo (IAC 464-18) and Timor Hybrid (CIFC

2570), with the latter used as recurrent genitor. The following were obtained: 93 RAPD markers, from which 87 (93.5%) showed segregation 1:1 ( $P>0.01$ ), four (4.4%) segregation 2:1 ( $P>0.05$ ), and two (2.2%) segregation 5:1 ( $P>0.05$ ). For map construction those 87 markers segregating 1:1 were used, and five showed no linkage to the formed groups. Eighty two RAPD markers resulted into eight linkage groups covering 540.6 cM. The obtained groups showed to have a satisfactory marker density, exception for two groups. The wider range between two markers was 36.4 cM, and 94.5% of the ranges did not exceed to 20 cM. The size of the linkage groups highly correlated to the number of markers ( $r=0.887$ ), indicating random distribution of the markers within groups. The number of the linkage groups is lower to the corresponding haploid number of chromosomes (22), therefore the species genoma was partially explored, and many areas were not still identified.

## 1. INTRODUÇÃO

O café é um produto de exportação e muitos países estão envolvidos na sua produção, comercialização e consumo. No mercado internacional movimenta, anualmente, bilhões de dólares, sendo que para o Brasil, maior produtor e exportador mundial, o cultivo do café tem importante papel econômico e social.

A produção mundial de café concentra-se em duas espécies: *Coffea arabica* L (café arábica), a única espécie alotetraplóide e autofértil do gênero, e *Coffea canephora* Pierre et Froenher (café robusta), diplóide e auto-incompatível. *C. arabica* é responsável por 70% da produção mundial e 99% da produção da América Latina, por estar associada a bebida de alta qualidade.

Pesquisas na área do melhoramento genético do cafeeiro, realizadas no Brasil, resultaram na obtenção de cultivares com alto potencial produtivo, mas sensíveis a estresses bióticos e abióticos. Por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil longo, o melhoramento genético do cafeeiro é lento, sendo importante a implementação de técnicas que facilitem e acelerem a seleção e avaliação de materiais superiores dentro de um programa de melhoramento. Entre essas técnicas estão a caracterização de genótipos, a obtenção de informações sobre diversidade genética em bancos de germoplasma e a construção de mapas de ligação.

Para realização de estudos de caracterização, de diversidade e mapeamento genético, é necessário dispor de marcadores genéticos de fácil monitoramento, que sejam identificáveis em qualquer idade da planta, revelem grande número de polimorfismos e não sejam influenciados pelo ambiente.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, foram desenvolvidos vários tipos de marcadores genéticos baseados na análise direta do DNA, os denominados marcadores moleculares. Uma nova geração de marcadores moleculares, baseados na amplificação de fragmentos de DNA e separação dos fragmentos por eletroforese para visualização dos polimorfismos, surgiu com o desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Tais marcadores possuem os requisitos necessários à constituição de um bom marcador genético. Um desses marcadores denominado RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) detecta polimorfismos de seqüências de nucleotídeos baseado na amplificação de DNA, usando como iniciador um oligonucleotídeo de seqüência arbitrária (*primer*). Esses marcadores são fáceis de serem detectados, pois não requerem informações sobre a seqüência de DNA a ser amplificada ou a síntese de *primers* específicos, permite a automatização do processo e requer pequena quantidade de DNA.

Este trabalho foi desenvolvido objetivando avaliar a diversidade genética, obter padrões moleculares e construir um mapa parcial de ligação para o cafeeiro, utilizando-se marcadores RAPD.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O cafeeiro

#### 2.1.1. Taxonomia e citogenética

Um estudo detalhado da taxonomia de *Coffea* e sua distribuição geográfica foi feita pelo botânico Francês Auguste Chevalier. Em 1940 e 1942 Chevalier publicou revisões gerais das espécies de *Coffea* e em 1947 estudando detalhadamente o material existente em herbário reuniu 60 espécies do gênero em quatro seções: *Eucoffea*, *Mascaracoffea*, *Argocoffea* e *Paracoffea*. A seção *Eucoffea* englobando as principais espécies (KRUG e CARVALHO, 1951).

Leroy, em 1980, propôs excluir do gênero *Coffea* as seções *Argocoffea* e *Paracoffea*, permanecendo apenas *Eucoffea* (atualmente denominada *Coffea*) e *Mascaracoffea*, e subdividir o gênero em três subgêneros, isto é, *Coffea*, *Psilanthopsis* e *Baracoffea* (CHARRIER e BERTHAUD, 1985). A contagem de cromossomos foi feita para a maioria das espécies do gênero *Coffea*, sendo o número básico para o gênero 11 cromossomos (BOUHARMONT, 1963; CHARRIER e BERTHAUD, 1985).

O subgênero *Coffea* é composto por aproximadamente 100 espécies, das quais duas são economicamente importantes, isto é, *Coffea arabica* e *C. canephora* (CHARRIER e BERTHAUD, 1985). A espécie *C. arabica* é tetraplóide ( $2n=4x=44$ ) e autocompatível, multiplicando-se predominantemente

por autofecundação, com taxa de fecundação cruzada da ordem de 10% (KRUG, 1936; KRUG, 1945; CARVALHO e KRUG, 1949; CARVALHO, 1988). As demais espécies deste subgênero são diplóides ( $2n=2x=22$ ) e auto-incompatíveis, multiplicando-se na natureza exclusivamente por fecundação cruzada (KRUG, 1936, 1937; SYBENGA, 1960; BOUHARMONT, 1963; LEROY e PLU, 1966; CHARRIER e BERTHAUD, 1985; CARVALHO, 1988; CARVALHO et al., 1991).

Nas espécies *C. canephora*, *C. congensis* e *C. dewvrei* existe o fenômeno da auto-incompatibilidade genética. Em *C. canephora*, o mecanismo genético da auto-incompatibilidade é definido por uma série de genes alelomorfos S, que controlam as relações entre o tubo polínico e o estigma (CONAGIN e MENDES, 1961). A auto-incompatibilidade em *C. canephora* do tipo gametofítica controlada por um único loco (loco S) foi comprovada em análise molecular. O loco S está ligado a um marcador RFLP (g1069D) no grupo de ligação 9. Nenhum recombinante foi observado entre o marcador g1069D e o loco S, em uma população de 23 duplo-haplóides. A disponibilidade de um marcador ligado do loco S deve facilitar a análise genética de auto-incompatibilidade, em programas de melhoramento do cafeeiro (LASHERMES et al., 1996).

A contagem e medição dos cromossomos somáticos de diversas espécies de *Coffea* mostrou que, embora os números de cromossomos, comprimentos e morfologia não tenham sido muito diferentes no gênero, foi possível separar algumas espécies de outras, com base nesse estudo (BOUHARMONT, 1958). Vinte e dois cromossomos somáticos foram encontrados em seis espécies de *Coffea*: *C. arnoldiana*, *C. bengalensis*, *C. carrisoi*, *C. kapakata*, *C. ligustroides* e *C. racemosa*. Os comprimentos dos cromossomos das seis espécies estudadas foram comparados àqueles das espécies previamente estudadas por BOUHARMONT (1958). Nenhuma diferença foi constatada entre os diferentes idiogramas observados no gênero, pelo menos para seus primeiros quatro cromossomos. O comprimento relativo de cada cromossomo e a localização de seus centrômeros são similares em todas as espécies (BOUHARMONT, 1963).

Análise precisa do cariograma de *Coffea arabica*, por meio de análise de imagem, permitiu a identificação dos pares de homólogos e dos grupos

cromossômicos que sugere a tetraploidia desta espécie. O complemento cromossômico desta espécie pôde ser subagrupado em 11 conjuntos de dois pares de homólogos, considerando sua similaridade morfológica. Os dois conjuntos diplóides confirmam a herança tetraplóide de *C. arabica* (FONTES e CARVALHO, 2000). Os cromossomos de *Coffea* são relativamente pequenos (1-3 $\mu$ m), mas métodos modernos de coloração de cromossomos (bandeamento) abrem possibilidades de estudo da morfologia de cromossomos em maiores detalhes. Todas as espécies do gênero *Coffea* mantiveram uma estrutura cromossômica similar, que provavelmente originou do mesmo genoma básico A (origem monofilética) (CHARRIER e BERTHAUD, 1985).

Pesquisas realizadas em *C. arabica*, e em algumas outras espécies diplóides, permitiram a identificação do número e morfologia dos cromossomos em paquíteno ligados ao nucléolo. Os cromossomos diferem em comprimento total e na relação de comprimento dos braços. Das nove espécies diplóides analisadas, seis mostraram apenas um cromossomo nucleolar ligado a um único nucléolo. Duas espécies, *C. racemosa* e *C. salvatrix* apresentaram dois cromossomos ligados a um só nucléolo, enquanto *C. stenophylla* revelou número variável de um a três. *C. arabica* possui dois cromossomos ligados a um único nucléolo. As espécies *C. canephora* e *C. congensis*, distintas morfológicamente, apresentam, no braço maior do bivalente nucleolar, o mesmo número e o mesmo padrão de distribuição de cromômeros, tendo comprimento diferente em cada espécie (PINTO-MAGLIO e CRUZ, 1987).

Observações realizadas sobre a microsporogênese, nas variedades Semperflorens e Caturra de *Coffea arabica*, mostraram que a formação de micrósporos é normal. Poucas irregularidades foram observadas na distribuição dos cromossomos, tendo, a grande maioria dos gametas, n=22 cromossomos, sendo o comportamento meiótico normal, com pareamento na forma de bivalentes, isto é, comportamento de uma planta dissômica (MENDES, 1950).

No estudo da microsporogênese e formação de sementes de uma planta monossômica de café (*Coffea arabica* L.) com 2n=43 cromossomos, foi observada a formação de tetravalentes, de ocorrência rara em *C. arabica*, que pode ser explicada por alterações no controle genético do pareamento cromossômico, talvez devido à irradiação a que foi submetido um dos pais, ou

em virtude da condição monossômica da planta em estudo (FORNI-MARTINS e CRUZ, 1989).

A hibridação da espécie *C. arabica* L. com outras espécies diplóides produz plantas triplóides ( $2n=33$ ) altamente estéreis. Os retrocruzamentos dos híbridos interespecíficos com a espécie *C. arabica* são difíceis e, quando obtidos, o produto é muito variável devido, principalmente, à sua constituição citológica. Duas plantas obtidas pelo retrocruzamento de um híbrido triplóide (*C. arabica* x *C. canephora*) com a espécie *C. arabica* demonstraram que o estudo da constituição de novas progênies pode levar à descoberta de novas plantas, cujas características sejam as mais favoráveis. Ambas possuem 44 cromossomos (MENDES, 1951).

Híbridos triplóides obtidos através da hibridação interespecífica entre *C. arabica* e *C. canephora* foram estéreis devido a irregularidades meióticas. Com a duplicação do número de cromossomos destes híbridos, obtendo assim, híbridos hexaplóides, eliminou-se quase completamente a esterilidade. Essas ocorrências em híbridos interespecíficos triplóides e hexaplóides indicam grande probabilidade de que *C. arabica* seja um alopoliplóide (KRUG e CARVALHO, 1951).

Vale chamar a atenção para os híbridos interespecíficos, principalmente, aqueles que envolvem a espécie tetraplóide *C. arabica*, e outras espécies diplóides, como *C. canephora*, *C. dewevrei* e *C. congensis*. Estes híbridos triplóides, após duplicação do número de cromossomos, poderão constituir fonte de novas formas de *Coffea*, permitindo a expansão do cultivo do café. A espécie *C. congensis* é, fenotipicamente, bem semelhante a *C. canephora* (KRUG e CARVALHO, 1952.).

Com base nos estudos de meiose (MEDINA, 1950; MENDES 1950) e resultados de análises genéticas (KRUG e CARVALHO, 1951), CARVALHO (1952) considerou que, sendo a origem alotetraplóide de *C. arabica* verdadeira, o cruzamento que deu origem a essa espécie deve ter ocorrido há muito tempo. O autor discute que, do cruzamento entre as diversas variedades de *C. arabica* com a variedade Típica, foram obtidas relações simples, correspondendo a segregações de um a dois genes e que não foram observadas relações correspondentes a segregações de tetraplóides ou de

genes duplicados e concluiu que *C. arabica* comporta-se como um diplóide normal.

KAMMACHER e CAPOT (1972), estudando o pareamento cromossômico no híbrido entre *C. arabica* e *C. canephora* e os cromossomos de *C. arabica*, concluíram que a espécie *C. arabica* não é um autotetraplóide, mas um anfidiplóide que é portador de dois genomas com  $n=11$ , um dos quais possui cromossomos relativamente pequenos, extremamente similar à estrutura cromossômica do genoma presente na espécie *C. canephora*.

Considerando que *C. arabica* é tetraplóide e *C. canephora* é diplóide, pode-se admitir que, na origem espontânea do Híbrido de Timor, ou não houve redução cromática na formação dos esporos que originaram os gametas ou houve uma duplicação cromossômica no gameta de *C. canephora*. Em centenas de metáfases de células das plantas CIFC 832/1 e CIFC 832/2, o número de cromossomos encontrado com maior frequência foi 44. Os cromossomos não apresentam grandes diferenças morfológicas. Entretanto, é possível separar dois pares de cromossomos grandes, um par muito pequeno e o restante de tamanho intermediário. Provavelmente estes dois pares maiores são provenientes um de *C. canephora* e outro de *C. arabica* (RIJO, 1974). Como o *C. arabica* é um alotetraplóide em que um dos ancestrais foi, provavelmente, a espécie *C. canephora*, a facilidade de emparelhamento de cromossomos homólogos das duas espécies cruzadas seria favorecida semelhantemente ao que acontece em *Hordeum* spp. (SCHOOLER, 1963; LIU e SCHOOLER, 1965) e em *Aegilops* spp. (FELDMAN, 1965a,b). Nesses casos, este genoma comum atuaria durante a hibridação como um tampão citológico, dando às formas grande estabilidade (RIJO, 1974).

Estudo citológico realizado em material coletado da planta  $F_1$  (H2460), que deu origem ao café Icatu (*C. arabica* x *C. canephora*), mostrou irregularidade em todas as fases da meiose, ocasionando número reduzido de frutos e sementes e progênies com muitos indivíduos aneuplóides. Embora a planta híbrida tenha 44 cromossomos, parece já haver, no tecido somático, uma instabilidade na divisão mitótica, explicando o aparecimento de algumas células-mães de pólen com número diferente de 44 cromossomos (42-46). Como o genoma de *C. canephora* foi duplicado e existe a possibilidade deste genoma ser comum à *C. arabica*, a redução na fertilidade deste híbrido pode

ser atribuída à associação em multivalentes dos cromossomos durante a sinapse, ocasionando uma separação diferenciada. Isto talvez explique a alta taxa de esterilidade apresentada pelo híbrido (BOAVENTURA e CRUZ, 1987).

O estudo do pareamento cromossômico, com base no exame de 795 células em metáfase I da meiose, foi realizado em três variedades de *C. arabica*. O modo de pareamento estritamente diplóide ocorreu em 2/3 dos casos, sendo notados dois a oito univalentes em 25% das células examinadas. O reagrupamento de bivalentes em associações secundárias foi freqüente. Em 1/10 das placas metafásicas examinadas, observou-se formação de um a três tetravalentes. A estrutura mais provável de *C. arabica* é aquela de um alotetraplóide segmentar, ou seja, formado pela justaposição de dois genomas de  $n=11$ , dos quais certos cromossomos conservam uma grande similaridade (GRASSIAS e KAMMACHER, 1975).

Entre os vários cruzamentos interespecíficos realizados em Campinas, *C. canephora* e *C. congensis* foi o que produziu maior porcentagem de plântulas, mas, os híbridos obtidos foram completamente estéreis. A facilidade de cruzamento entre estas duas espécies foi conhecida pelos melhoristas de Dutch, na Indonésia (CRAMER, 1957; FERWERDA, 1948). Quanto ao cruzamento entre *C. congensis* e *C. eugenioides*, o sucesso não foi muito grande, mas o híbrido obtido é vigoroso. É importante mencionar que as espécies tetraplóides usualmente produzem mais sementes, quando usadas como fêmeas em cruzamentos com espécies diplóides, e que a produção de sementes foi maior em cruzamentos usando formas tetraplóides induzidas artificialmente das espécies diplóides (CARVALHO, e MONACO, 1967).

A alta freqüência de bivalentes observada em híbridos interespecíficos entre *Coffea canephora* e *C. liberica* indica considerável homologia entre os cromossomos destas espécies, sugerindo que elas podem ter um ancestral comum. Elas podem ter sido mantidas separadas por alguma barreira de incompatibilidade, mas algumas introgressões podem ter ocorrido. Aparentemente, a facilidade com que a hibridação entre espécies de café pode ser realizada nem sempre está correlacionada com relações genômicas e taxonômicas (CHINNAPPA, 1970).

Análise citogenética de híbridos  $F_1$  entre *C. canephora* e *C. liberica* mostrou que o nível de diferenciação cromossômica entre estas duas espécies

é baixo, bem como o fato de elas possuírem o mesmo genoma básico. Isso é confirmado pela presença de numerosos multivalentes nos anfidiplóides obtidos pela duplicação do número de cromossomos desses híbridos (LOUARN, 1980).

Nos híbridos  $F_1$  entre *Coffea canephora* Pierre et e *C. eugenioides* Moore, 35% das células analisadas conservaram um pareamento normal de 11 bivalentes. A fertilidade polínica dos híbridos (43%), que foi menor que dos pais (96 e 89%), está diretamente relacionada à falta de pareamento na metáfase I, nestes mesmos híbridos. A maioria da segunda geração é viável; a fertilidade polínica variou de 28 a 95% (LOUARN, 1976).

A poliploidia está certamente envolvida na origem de *C. arabica*, e a autopoliploidização de uma espécie diplóide é muito improvável. Exceto para genes que controlam a cor de folhas jovens, mais de 40 características foram investigadas e todas mostraram herança dissômica (KRUG e CARVALHO, 1951). Além disso, apenas bivalentes ocasionais, uma média de 1,9-4,5/célula, são formados na meiose de haplóides (di-haplóides) (MENDES e BACCHI, 1940; VISHVESHWARA, 1960; BERTHAUD, 1976). Diversos autores têm postulado que *C. arabica* originou da hibridação de espécies diplóides, seguida pela duplicação de cromossomos e diferenciação. Parece provável que *C. eugenioides* é uma das espécies mais próximas de *C. arabica*. Outras prováveis espécies ancestrais incluem *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica* e *C. dewevrei*. Como pouco é conhecido sobre as relações filogenéticas entre essas espécies diplóides, é muito difícil determinar o mais provável ancestral de *C. arabica*. À luz dessa consideração, *C. arabica* pode, provavelmente, ser propriamente considerada um alopoliplóide segmentar no sentido definido por STEBBINS (1947), conforme diversos autores sugeriram (MEDINA-FILHO et al., 1984).

Foi sugerido (CRAMER, 1957; KRUG e CARVALHO, 1951) que *C. canephora* e *C. eugenioides* podem estar relacionados com *C. arabica*, não apenas devido à sua distribuição geográfica, mas, também, em razão das similaridades morfológicas de certas formas de *C. eugenioides* com alguns mutantes de *C. arabica*. THOMAS (1944) registrou a presença de *C. eugenioides* e *C. canephora* nas mesmas áreas de florestas de Uganda, e como os híbridos artificiais entre essas espécies são relativamente férteis,

produzem quantidades razoáveis de sementes a partir de flores de polinização aberta (CARVALHO e MONACO, 1967).

Com relação a origem de *C. arabica*, foi também assumido que pode ser o produto de hibridação natural de *C. eugenioides* e *C. congensis* (CRAMER, 1957), seguida por duplicação de cromossomos e diferenciação. Híbrido diplóide entre estas espécies possui semelhança com *C. arabica* ao nível diplóide (CARVALHO e MONACO, 1967).

Hille Ris Lambers (citado por CRAMER, 1957) notou a ocorrência espontânea de *C. eugenioides*, *C. congensis* e *C. canephora* na mesma localidade, na África. Estas espécies podem formar um único complexo, que compartilha certos genes comuns. Cruzamentos entre *C. eugenioides* e *C. congensis* ou *C. eugenioides* e *C. canephora* podem ter ocorrido no passado. Poliploidia adicional razoável fertilidade e preservaria as novas combinações. Visto que o café é uma planta perene, a introgressão pode ter ocorrido entre tetraplóides e diplóides. Os retrocruzamentos para a forma tetraplóide resultariam em uma grande combinação de caracteres das três espécies (CARVALHO e MONACO, 1967).

As relações genéticas entre dez espécies de *Coffea*, e algumas cultivares de três dessas espécies, foram estudadas quanto à composição de pigmentos flavanóides e compostos fenólicos, sob o ponto de vista quimiotaxonômico, sendo os dados obtidos analisados com recurso da metodologia de taxonomia numérica. Comprovou-se a participação de *C. eugenioides*, juntamente com *C. liberica* ou *C. canephora*, na formação da espécie tetraplóide *C. arabica*, não havendo, contudo, dados suficientes que justifiquem a indicação definitiva entre uma das duas últimas espécies. Foi excluída a participação de *C. congensis* como possível constituinte de *C. arabica*, baseando-se nos resultados obtidos das plantas examinadas (LOPES et al., 1984).

A análise eletroforética do polimorfismo de cafeeiros baseado na variação do DNA mitocondrial nas espécies *C. canephora*, *C. eugenioides* e *C. arabica* mostrou que as espécies *C. eugenioides* e *C. arabica* possuem o mesmo genoma mitocondrial, muito diferente daquele de *C. canephora*. Os resultados obtidos sugerem que *C. eugenioides* e *C. arabica* são descendentes do mesmo ancestral próximo a *C. eugenioides* (BERTHOU et al., 1980). De

acordo com a análise de DNA do cloroplasto (cpDNAs) não há diferença entre *C. arabica* e *C. eugenoides* e nem entre *C. canephora* e *C. congensis*. Com relação aos padrões de restrição de DNA da mitocôndria (mtDNAs), foram verificadas similaridades entre *C. arabica*, *C. eugenoides* e *C. congensis*. O padrão de cpDNA mostrou que as espécies *C. canephora* e *C. congensis* podem ter origem comum, correspondendo às séries robustóides, sendo, entretanto, levemente diferentes com relação ao padrão de mtDNA. Isso sugere a diversificação deste grupo filogenético, antes da separação de *C. arabica* e *C. eugenoides* (BERTHOU et al., 1983).

Pela análise de afinidades serológicas entre as espécies de *Coffea*, foi possível verificar que *C. arabica* apresenta maior afinidade por *C. congensis* e *C. eugenoides*, e depois por *C. canephora* (HÖFLING e OLIVEIRA, 1981). Esses resultados sugerem que as espécies *C. eugenoides* e *C. congensis* apresentam maior possibilidade de terem participado da formação de *C. arabica*.

O DNA total de quatro espécies diplóides (*C. eugenoides*, *C. congensis*, *C. canephora* e *C. liberica*) foi utilizado como sonda, em preparações cromossômicas de *C. arabica* (RAINA et al., 1998). *C. eugenoides* marcou fortemente e preferencialmente 22 cromossomos da espécie tetraplóide *C. arabica*, enquanto os 22 cromossomos restantes foram marcados com DNA de *C. congensis*. A similaridade entre *C. arabica* e as duas espécies diplóides foi confirmada pela técnica FISH (*fluorescent in situ hybridization*), usando dois genes ribossômicos. Ficou confirmada a natureza alotetraplóide de *C. arabica*, e a participação das espécies diplóides *C. eugenoides* e *C. congensis* em sua formação.

Hibridização in situ realizada em preparações cromossômicas de *C. arabica* usando, como sonda, DNA total de *C. canephora* marcado com digoxigenina e DNA total de *C. eugenoides* marcado com biotina, revelou que 22 cromossomos mostraram predominantemente fluorescência amarela, sugerindo maior afinidade para sonda de DNA genômico de *C. canephora*. Os outros 22 cromossomos apareceram laranja-vermelho, sugerindo que a coloração vermelha devido ao DNA genômico de *C. eugenoides* foi mais intenso que a fluorescência verde-amarelo. Esses resultados sugerem que *C. arabica* é um anfidiplóide formado pela hibridação entre *C. eugenoides* e *C.*

*canephora*, ou ecotipos relacionados a esta espécie. Neste mesmo trabalho, utilizando marcadores RFLP, os autores concluíram que os acessos pertencentes às espécies caneforóides (*C. canephora* e *C. congensis*) foram agrupados juntos (LASHERMES et al., 1999).

Raina e colaboradores (1998) dispuseram de elementos comparativos necessários para a decisão entre *C. canephora* e *C. congensis*, pois, utilizaram o DNA genômico dessas duas espécies como sonda. Este estudo comparativo não foi possível no trabalho de Lashermes e colaboradores (1999) porque foi utilizado, como sonda, apenas o DNA de *C. canephora*. Portanto, *C. eugenioides* e *C. congensis* são as possíveis espécies diplóides envolvidas na formação de *C. arabica*.

Parece que todas as espécies diplóides de café preservaram a identidade de sua origem comum, durante a história evolucionária, apesar do isolamento geográfico. Um exemplo de espécies que são morfológica e ecologicamente distintas, mas mostram pareamento cromossômico normal e boa fertilidade nos híbridos, são *C. canephora* (distribuição na África Central e Oeste) e *C. congensis* (limitada aos bancos e ilhas inundadas do Congo e rio Oubangui). A última espécie ocupa um ecotipo específico, bem isolado por uma barreira estritamente ecológica (BERTHAUD e GUILLAUMET, 1978).

*C. arabica* pode ter originado de uma hibridação natural entre duas espécies diplóides ancestrais, seguida pela formação de gameta não-reduzido. O grau de homologia dos dois genomas pode ter sido alto em consequência da origem monofilética das espécies participantes, mas vários mecanismos (pareamento preferencial, regulação genética da sinápse) provavelmente tenham exercido um importante papel na diploidização progressiva do arquétipo tetraplóide para o atual anfidiplóide *C. arabica* (CHARRIER e BERTHAUD, 1985).

O estudo do comportamento meiótico de *C. eugenioides*, com o número de cromossomos duplicado com colchicina ( $2n=44$  cromossomos), revelou que houve maior número de monovalentes e menor número de tetravalentes e trivalentes do que em *C. canephora* com número de cromossomos duplicado com colchicina ( $2n=44$ ). Portanto, parece que em café o pareamento está mais condicionado por fatores genéticos, pois, estas

espécies possuem cromossomos de tamanho e morfologia semelhantes (BOAVENTURA et al., 1988).

Em *C. arabica*, foram observadas similaridades estruturais em 12 pares de bivalentes e presença de duas associações secundárias. As associações secundárias em *C. arabica* podem ser relatadas como uma evidência adicional de homeologia entre alguns cromossomos desta espécie (PINTO-MAGLIO e CRUZ, 1998).

A presença ou ausência de pareamento cromossômico nem sempre indica relação filogenética (De WET e HARLAN, 1972) porque existem muitos exemplos em que autopoliplóides não mostram multivalentes (processo de poliploidização) e alopoliplóides nem sempre formam bivalentes (pareamento preferencial). De acordo com JACKSON (1982), as denominadas autopoliplóide, alopoliplóide e alopoliplóide segmentar, classificações dos poliplóides baseadas no comportamento de híbridos  $F_1$ , representam condições relacionadas à ação gênica no pareamento cromossômico (STEBBINS, 1947).

Baseado na alta similaridade morfológica observada entre os cromossomos que formam o complemento *C. arabica* pode-se confirmar sua condição alopoliplóide segmentar. Esta similaridade morfológica, contrastando com o baixo nível de anormalidade de pareamento, torna possível a hipótese de que exista, nesta espécie, um sistema genético em que o pareamento entre cromossomos homeólogos seja evitado pela ação de genes como *Ph*, encontrado em *Triticum*, *Avena*, *Festuca Gossypium*, *Nicotiana* e *Lolium*. O efeito dessa classe de sistema genético é comum em alopoliplóide segmentar, em que há restrição de pareamento entre cromossomos homeólogos. Em autopoliplóides, foram relatadas restrições de pareamento mesmo entre cromossomos homólogos (PINTO-MAGLIO e CRUZ, 1998).

De 23 marcadores RFLP analisados, 18 (75%) apresentaram-se em duplicatas nos acessos de *C. arabica*. Essas duplicações foram interpretadas como representando os dois pares de cromossomos homeólogos esperados, no caso de um genoma alotetraplóide. Em cinco locos, um único alelo foi detectado em *C. arabica*. Não foi possível decidir se os padrões refletiram um loco ou dois homozigotos, locos distintos compartilhando o mesmo alelo (LASHERMES et al., 1999).

Em uma progênie F<sub>2</sub> de *C. arabica*, foram observadas segregações dissômicas de alelos RFLP, com pareamento regular de bivalentes de cromossomos homólogos no híbrido F<sub>1</sub>. Em contraste, locos RFLP seguiram herança tetrassômica no híbrido arabusta (*C. arabica* x *C. canephora*), embora tenha sido verificado predomínio de bivalentes na meiose desses híbridos. Os resultados sugerem que cromossomos homeólogos não pareiam em *C. arabica*, não como consequência de diferenciação estrutural, mas, por causa do funcionamento de genes de regulação de pareamento (LASHERMES et al., 2000a).

O gene *Ph1* (*pairing homologous*) em trigo (*Triticum aestivum*) é o melhor exemplo geneticamente definido de genes controlando pareamento (FELDMAN 1993; RILEY, 1960). Ele suprime pareamento de homeólogos, enquanto permite pareamento regular de cromossomos homólogos. Um ou diversos genes similares de controle de pareamento podem estar presentes em *C. arabica*. Tais genes podem representar fatores-chave, que foram conservados durante o processo evolucionário e sucesso do estabelecimento de *C. arabica* (LASHERMES et al., 1999).

### **2.1.2. Diversidade genética**

O café arábica foi introduzido no continente Americano vindo do Yemen via Java e Holanda, no início do século XVIII. Evidências históricas sugerem que a população-base descendeu de poucas árvores. No Brasil, o progresso no melhoramento do cafeeiro só foi alcançado com a introdução de germoplasma vindo das Ilhas de Sumatra e Réunion. Esses cafeeiros introduzidos deram origem a dois tipos botânicos distintos: *Coffea arabica* var. Arabica, usualmente denominada Típica, que foi o primeiro café plantado na Ásia e América Latina, e *Coffea arabica* var. Bourbon, que veio para a América do Sul através da ilha de La Réunion, e antigamente era chamada Bourbon. A base genética do café arábica Americano é dessa forma considerada estreita e representa apenas uma pequena porção da variabilidade genética potencial disponível dentro do pool gênico de café (CARVALHO, 1988).

A variação intra-específica em *Coffea canephora* e *Coffea arabica*, incluindo o Híbrido de Timor, e as relações genéticas entre um grupo de

acessos representando outras sete espécies, foram avaliadas usando-se marcadores RAPD (LASHERMES et al., 1993). Variação intraespecífica foi facilmente detectada em *C. canephora* e *C. liberica*, enquanto os *primers* utilizados falharam na revelação de polimorfismos entre os acessos de *C. arabica*. Extensa variação inter-específica foi observada. Dos 112 (23 *primers*) fragmentos amplificados, nenhum polimorfismo foi detectado entre os seis acessos de *C. arabica*. O Híbrido de Timor divergiu dos acessos de *C. arabica*, apenas, pela ausência de dois produtos amplificados e presença de uma banda adicional. A baixa diversidade molecular detectada em *C. arabica*, pode ter diferentes origens. Primeiro, *C. arabica* como uma cultura autopolinizada é altamente homocigota, e todas as mutações deletérias que poderiam contribuir para diversidade molecular são eliminadas pela seleção. Segundo, *C. arabica* pode apresentar uma estreita base genética em relação à sua gênese, ou seja, o evento de formação da espécie alotetraplóide *C. arabica* pode ter sido relativamente recente, e envolveu um limitado número de plantas. O alto grau de similaridade (0,99) nos padrões dos produtos amplificados, observados entre *C. arabica* e Híbrido de Timor (832/1), sugere que uma hibridação interespecífica inicial deve ter ocorrido, seguida por diversos retrocruzamentos espontâneos com *C. arabica* para gerar o Híbrido de Timor (LASHERMES et al., 1993).

Utilizando marcadores RAPD, as espécies diplóides *C. liberica* e *C. canephora* foram separadas dos genótipos de *C. arabica*. Os genótipos de *C. arabica* formaram três grupos distintos, ou seja, germoplasma derivado da Etiópia, o tipo Bourbon e tipo Típica. Foram, também, identificados produtos amplificados espécie-específicos e introgressão de genes de *C. canephora* em *C. arabica* (OROZCO-CASTILLO et al., 1994).

Análise multivariada foi utilizada para avaliar 148 acessos de *C. arabica*, com base em 18 caracteres morfológicos e agronômicos. Dois grupos foram formados: os acessos do grupo 1 (acessos da Etiópia coletados no oeste do Great Rift Valley) possuem hábito de crescimento mais ereto, folhas menores e são, em média, mais resistentes à ferrugem e CBD que os acessos do grupo 2 (variedades cultivadas e acessos da Etiópia coletados no leste do Great Rift Valley). Essa estrutura, juntamente com evidências históricas, sugere

que o grupo 1 não foi envolvido na domesticação de *C. arabica* (MONTAGNON e BOUHARMONT, 1996).

Relações genéticas entre 18 acessos, representando 11 espécies de *Coffea*, foram examinadas usando-se os marcadores RAPD e STS (*sequence tagged sites*) de mitocôndria e cloroplasto. As espécies mais próximas de *C. arabica* foram: *C. eugenioides* (0,819), *C. canephora* (0,723) e *C. stenophylla* (0,714). Foi verificado baixo nível de variação intraespecífica em *C. arabica*, quando comparada com *C. canephora* (OROZCO-CASTILLO et al., 1996).

A baixa diversidade genética, verificada em *C. arabica*, contrasta com a considerável variabilidade encontrada nas espécies diplóides (BERTHAUD e CHARRIER, 1988). Assim, as espécies diplóides próximas a *C. arabica*, tais como *C. canephora* e *C. congensis*, constituem uma valiosa fonte de genes importantes para o melhoramento do cafeeiro (CARVALHO, 1988). No Híbrido Arabusta (*C. arabica* x *C. canephora*) verificou-se alto grau de pareamento cromossômico intergenômico. Essa possibilidade de recombinação intergenômica, que é ausente ou rara em *C. arabica*, pode oferecer a possibilidade de troca de genes entre os genomas homeólogos e constituir uma fonte extremamente interessante de variabilidade genética (LASHERMES et al., 2000a).

Entre genótipos derivados do Híbrido de Timor, observou-se que a diversidade genética era aproximadamente o dobro da diversidade verificada em *C. arabica*. Embora representando apenas uma pequena proporção da diversidade genética disponível em *C. canephora*, o Híbrido de Timor constitui uma considerável fonte de diversidade genética para o melhoramento de arábica. Análise de parentesco genético entre genótipos derivados do Híbrido de Timor sugeriu que a introgressão não foi restrita à substituição cromossômica, mas também envolveu recombinações cromossômicas (LASHERMES et al., 2000b).

### **2.1.3. Genética e melhoramento**

O modelo de classificação das espécies, proposto por HARLAN e De WET (1971), e aplicado às espécies de *Coffea*, indicou grande potencial para o melhoramento de *C. arabica* concentrado na reserva gênica secundária, ou

seja, aquela encontrada em espécies afins. Dessa reserva, *C. canephora*, *C. congensis*, *C. racemosa* e *C. dewevrei*, vêm sendo exploradas como importantes fontes de resistência a pragas e doenças e a condições ambientais adversas (CARVALHO et al., 1984). Para que o aproveitamento das espécies silvestres seja mais eficiente, é essencial que se realizem pesquisas mais detalhadas sobre as relações filogenéticas entre as espécies de *Coffea* e gêneros afins (CARVALHO et al., 1991).

KRUG e CARVALHO (1951) relataram que, durante 18 anos, cerca de 30 mutantes de *C. arabica* foram analisados. A maioria é originária da mutação de um ou mais genes. Em *C. arabica* é conhecido um maior número de mutantes do que em *C. canephora*. Isso pode ser devido ao fato de *C. canephora* ser auto-estéril, possuir polinização cruzada e, freqüentemente, ser reproduzida por estaquia, enquanto *C. arabica* é autofértil e propagada por sementes. As chances de encontrar novos mutantes recessivos são maiores em *C. arabica* que em *C. canephora*.

As bases genéticas das principais diferenças existentes entre as diferentes variedades de *Coffea arabica*, em relação à cultivar Arabica, foram determinadas no Instituto Agrônomo de Campinas, durante cinquenta anos de pesquisa. Verificou-se que, embora a herança seja simples, o efeito pleiotrópico de certos genes é, muitas vezes, bastante acentuado. Outros genes possuem efeito bem específico, como é o caso do gene responsável pela cor do endosperma (cera) e o gene responsável pelo ângulo de inserção dos ramos plagiotrópicos (erecta). Quatro genes que controlam o comprimento do internódio e, conseqüentemente, a altura das plantas Caturra (Ct), São Bernardo (Sb), Vila Lobos (VI) e San Ramon (Sr), apresentam dominância completa. Alguns genes analisados mostraram-se úteis a investigações básicas no cafeeiro, como o gene cera que foi utilizado como marcador genético para avaliar a taxa de fecundação cruzada natural em arábica. Outros genes apresentam vantagens no melhoramento, pelo fato de contribuírem para melhoria da produção (gene tt do Bourbon), influir na precocidade de maturação (gene xanthocarpa), modificar o ângulo de inserção dos ramos plagiotrópicos (gene Er) e reduzir a altura das plantas sem prejudicar a capacidade produtiva, facilitando tanto a colheita manual como a mecânica (gene Ct). O conhecimento desses genes, de seus efeitos nas plantas, de

interações com outros genes e tipo de herança contribuíram para aumentar o conhecimento sobre o cafeeiro do ponto de vista científico e orientou o melhoramento de uma forma prática e objetiva. Até o início da década de 90, foram caracterizados cerca de 50 marcadores genéticos morfológicos do cafeeiro (CARVALHO et al., 1991).

*C. arabica* é um dos poucos exemplos de planta perene, em que os métodos comuns de melhoramento para culturas diplóides autógamias foram aplicados com sucesso. As variedades resultantes foram suficientemente homogêneas para permitir propagação via semente, e praticamente todo arábica plantado no mundo é estabelecido a partir de sementes. As novas demandas para resistência a doenças, maior rendimento e melhoria de qualidade, bem como a alteração na arquitetura da planta (crescimento compacto), exige dos melhoristas programas complexos de cruzamentos e retrocruzamentos, envolvendo a recombinação de muitos caracteres (van der VOSSSEN, 1985).

Seleção individual de plantas seguida por avaliação de progênes, hibridação e seleção pedigree são os métodos mais empregados. Para a transferência de genes controladores de caracteres específicos (internódios curtos e resistência a pragas e doenças), presentes em outras cultivares ou espécies próximas, o retrocruzamento é utilizado. Em arábica, o rendimento é altamente afetado pelo ambiente e, assim, a melhor avaliação de genótipos elite é feita em testes replicados de progênes, em múltiplos locais e durante várias estações de crescimento. O cafeeiro tem um longo ciclo de vida e a vida econômica da cultura deve ultrapassar 20 anos. Assim, não é surpresa que, em progênes selecionadas, o vigor vegetativo seja altamente correlacionado com o rendimento. Com base nestes princípios, foram desenvolvidas cultivares de *C. arabica* com potencial produtivo, em média, 300% superior à cultivar Arábica, a primeira cultivar de café plantada no Brasil e também conhecida como Típica ou Nacional. Duas diferenças básicas são observadas entre as cultivares atuais e a cultivar Arabica, sendo a primeira o vigor vegetativo, e a segunda o componente básico do rendimento (número de flores por inflorescência e o número de inflorescências por axila foliar). Outros aspectos que devem ser considerados em um programa de melhoramento, além do rendimento total, são a densidade de sementes, a porcentagem de sementes

anormais e relação entre café beneficiado e café em coco (MEDINA-FILHO et al., 1984).

Atualmente, os programas de melhoramento estão voltados para o desenvolvimento de materiais que combinem alto rendimento com resistência a estresses biótico e abiótico e boa qualidade de bebida. Entre os estresses bióticos, os que mais chamam a atenção dos melhoristas são: a ferrugem alaranjada causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., a *coffee berry disease* (CBD) causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae*, as lesões foliares causadas por larvas do inseto *Leucoptera coffeella* e danos provocados por nematóides de várias espécies. No caso dos estresses abióticos, o que mais preocupa é o dano causado pela geada e baixas temperaturas (MEDINA-FILHO et al., 1984).

Métodos efetivos de seleção para resistência a doenças são disponíveis, e a duração de programas de melhoramento objetivando ao desenvolvimento de variedades resistentes depende da eficiência de seleção para alto rendimento e boa qualidade do produto. Isso é mais crítico, em países onde tradicionalmente são produzidos cafés de qualidade superior. Correlações fenotípicas significativas observadas entre o rendimento dos 2-3 primeiros anos e a produção acumulada de 5-6 anos, e entre parâmetros de crescimento e rendimento para arábica e robusta, indicaram possibilidades de seleção antecipada para potencial de rendimento (van der VOSSSEN, 1985).

A produtividade de café beneficiado tem alta correlação genotípica com o vigor vegetativo (0,905) e seca de ponteiros (-0,862). Portanto, estas características podem ser utilizadas com segurança para avaliação indireta do potencial produtivo do cafeeiro (SEVERINO et al., 2000).

Outro tipo de metodologia, que pode acelerar o melhoramento do cafeeiro, é a propagação clonal de genótipos superiores via embriogênese somática (SANTOS et al., 2000), aproveitando inclusive os benefícios de híbridos F<sub>1</sub> (heterose para rendimento e melhor estabilidade rendimento) (SRINIVASAN e VISHVESHWARA, 1978; van der VOSSSEN, 1985; FONTES et al., 2000).

#### 2.1.4. Resistência à *Hemileia vastatrix*

As interações *Coffea-Hemileia vastatrix* são caracterizadas, principalmente, pelas expressões fenotípicas de incompatibilidade (imunidade ou hipersensibilidade) e de compatibilidade com a formação de grandes pústulas com esporulação abundante (congenialidade), ocorrendo, também, expressões intermediárias de resistência (manchas cloróticas com poucos uredosporos e pústulas de tamanho pequeno a médio).

Em *C. arabica*, quatro genes dominantes,  $S_{H1,2,4,5}$ , simples ou associados, condicionam o espectro de resistência dos grupos fisiológicos de café  $\alpha$ ,  $\gamma$ , E, I, C, D, J, L, W a algumas raças fisiológicas de *H. vastatrix* (NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT e NORONHA-WAGNER, 1971). Existem algumas indicações de que o gene  $S_{H4}$ , em condições de baixa intensidade de luz, exibe dominância incompleta, demonstrando que a resistência incompleta pode ser governada pela relação gene a gene (ESKES, 1983a).

As variedades Típica, Bourbon, Caturra, Catuaí, Mundo Novo, etc. (grupo E) possuem o gene  $S_{H5}$  e Kent's (grupo D) os genes  $S_{H2,5}$ . Populações da Etiópia presentes em todos os grupos acima carregam quatro genes maiores, simples ou em associação. Esses genes são superados, total ou parcialmente, por raças com diferentes combinações de genes de virulência  $v_1$ ,  $v_2$ ,  $v_4$  e  $v_5$ . A análise das interações hospedeiro-patógeno permitiu reconhecer a validade da teoria gene a gene (FLOR, 1955) para o complexo *Coffea-Hemileia vastatrix* e, assim, inferir nos prováveis genótipos das raças fisiológicas estudadas do fungo (NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT e NORONHA-WAGNER, 1971). Entretanto, como não se conhecem todos os estádios do ciclo sexuado de *H. vastatrix*, a existência desses genótipos para a virulência não pôde, até agora, ser confirmada.

Os genes  $S_{H2,3}$  correspondem a dois genes previstos por MAYNE (1936) ao estudar, na Índia, as diferentes interações de seleções de *C. arábica* e de segregantes tetrapóides de híbridos *C. arabica* x *C. liberica* com as raças fisiológicas do fungo ali prevalentes. Como o gene  $S_{H3}$  se encontra-se apenas nos cafeeiros pertencentes a Seleções Indianas desta origem interespecífica, é provável que provenha do genitor *C. liberica* (NORONHA-

WAGNER e BETTENCOURT, 1967). Os genes  $S_{H2,3}$  estão associados ao gene  $S_{H5}$ , condicionando os espectros de resistência dos grupos G ( $S_{H3,5}$ ) e H ( $S_{H2,3,5}$ ). Esses genes são anulados, total ou parcialmente, pelas raças de ferrugem com diferentes combinações de virulência v2, v3 e v5 (RODRIGUES et al., 1975).

O Híbrido Timor foi estudado a partir de 1955 no Centro de Investigações da Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Oeiras, Portugal. Através da avaliação de duas plantas (CIFC 832/1 e 832/2) de fenótipo semelhante ao do arábica, originadas de sementes recebidas diretamente da Sociedade Agrícola Pátria e Trabalho em Timor, foi verificada resistência a todas as raças de *Hemileia vastatrix*. A partir de 1960, clones e progênies do Híbrido de Timor foram distribuídas pelo CIFC, diretamente ou através da Estação de Quarentena dos Estados Unidos, para todas as estações experimentais dos países produtores de café. Admite-se, com base em informações colhidas na ilha de Timor, que a população do Híbrido de Timor, em sua maioria, tenha se formado a partir de sementes de uma única planta existente em plantação de arábica, estabelecida em 1917/18, nessa mesma ilha, a uma altitude de 800 metros. As observações feitas pela Missão de Estudos Agronômicos do Ultramar (MEAU), em Timor, e as segregações de fenótipo próximo do robusta, que ocorrem por vezes, nas progênies de Híbrido de Timor, em estudo no CIFC e nas estações experimentais, parecem confirmar a hipótese desse cultivar ter resultado de um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, em que, provavelmente, um gameta não-reduzido de robusta tenha combinado com outro normal de arábica. De fato, encontram-se cafeeiros do Híbrido Timor autoférteis e em condição tetraplóides ( $2n=44$ ), ao lado de plantas aneuplóides com número variável de cromossomos. Sua origem híbrida interespecífica é, também, denunciada pelo elevado número de grãos 'moca' que algumas plantas produzem. O fato de, em Timor, ser comum deixar nos viveiros, lado a lado, cafeeiros arábica e robusta já muito desenvolvidos e em frutificação, certamente facilitou o aparecimento de híbridos entre ambas as espécies, uma vez que as sementes ali obtidas são aproveitadas para a formação de novos viveiros. Em 1955, o CIFC recebeu sementes que foram registradas como CIFC 832, sendo as plantas 832/1 e 832/2 oriundas dessa introdução. Em

1960, um novo lote de sementes foi registrado como CIFC 1343 (BETTENCOURT, 1973).

A população derivada do Híbrido de Timor possui cinco genes dominantes,  $S_{H5,6,7,8,9}$ , condicionando, sozinhos ou associados, espectros de resistência dos grupos R, 1, 2 e 3. Os genes  $S_{H6}$  a  $S_{H9}$  são provenientes de *C. canephora*, um dos pais de Híbrido de Timor. Estes genes são superados, total ou parcialmente, pelas raças de ferrugem com diferentes combinações dos genes  $v_5$ ,  $v_6$ ,  $v_7$ ,  $v_8$  e  $v_9$  (BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988). A dominância do gene  $S_{H6}$  (grupo R) foi demonstrada pelo cruzamento do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) - grupo R - com o clone 849/1 (Matari) - grupo  $\beta$  - dando origem a plantas exclusivamente do grupo R, sendo que na geração F2 houve segregação típica de um gene 3R:1 $\beta$  (BETTENCOURT et al., 1980).

Na população Icatu, também foi obtida informação sobre a provável existência de oligogenes condicionando resistência completa ou incompleta a algumas raças. A progênie autofecundada de H4782-10-225 inoculada com a raça II, mostrou taxa de segregação Mendeliana. Em muitas outras progênies, foram identificados grupos distintos de plantas resistentes e suscetíveis, em taxas que indicariam a presença de um ou poucos genes, principalmente com dominância incompleta. Quando esses genes estiverem em homozigose ou juntos, podem conferir resistência completa. É provável que alguns desses genes sejam idênticos aos genes maiores  $S_{H6}$  a  $S_{H9}$ , detectados no germoplasma de Híbrido de Timor (ESKES et al., 1990).

O café Icatu originou-se do cruzamento do haplóide duplicado de *C. arabica*, portanto, com  $2n=44$  cromossomos e homozigoto, com *C. canephora* duplicado, também com  $2n=44$  cromossomos, seguido de retrocruzamentos com plantas selecionadas de *C. arabica*. Às plantas oriundas desses retrocruzamentos foi dada a denominação de café Icatu (BOAVENTURA e CRUZ, 1987; CARVALHO, 1982; CARVALHO, 1988).

Além dos genes  $S_H$  já identificados pelo CIFC, um ou mais genes de efeito maior, que ainda não perderam a resistência completa, podem estar presentes nos genótipos do grupo A da população Híbrido de Timor e Icatu (BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988).

Os estudos genéticos, realizados no CIFC, basearam-se na análise qualitativa das expressões bem definidas de resistência completa (imunidade

ou hipersensibilidade) e susceptibilidade. Existe, agora, maior interesse no desenvolvimento de estudos com uma análise quantitativa de resistência incompleta, usando, em adição ao tipo de reação, outros parâmetros tais como a freqüência de infecção, o período latente e produção de uredosporos.

Nos últimos vinte anos, tem sido dada atenção para à avaliação da resistência incompleta (RI) à *H. vastatrix* em *C. arabica*, *C. canephora* (Conilon) e alguns híbridos interespecíficos tais como Icatu e Catimor. Os resultados até agora obtidos indicam a existência deste tipo de resistência, sendo que seu controle genético parece ser oligogênico em alguns casos e poligênico em outros (BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988).

Em *C. arabica*, a não retenção de folhas com pústulas, pelos cultivares Mundo Novo e Catuaí Amarelo, caracteriza um tipo incomum de resistência horizontal, em que a taxa de desenvolvimento da doença não é alterada e o início da epidemia é retardado. Isto fica evidente, quando comparado com o cultivar Harar, que apresenta uma grande capacidade de reter folhas com pústulas (RIBEIRO et al., 1981). Variação para RI em *C. arabica* à *H. vastatrix* também foi investigada por ESKES e CARVALHO (1983). Esses pesquisadores concluíram que existe correlação positiva entre rendimento e nível da doença no campo, e que a variação genética para RI entre cultivares de *C. arabica* é relativamente pequena, sendo os resultados inconsistentes entre os testes de resistência. Além do grupo E ( $S_H5$ ), outros grupos como C ( $S_H1,5$ ) e D ( $S_H2,5$ ) também têm sido pesquisados com o objetivo de verificar o grau de resistência residual, quando os genes de efeito maior são superados pelas raças de virulência. É interessante notar que, em relação ao gene  $S_H2$ , os pesquisadores são unânimes em afirmar que este não apresenta efeito residual; entretanto, em relação a  $S_H1$ , há discordância sobre a presença ou não de efeito residual (BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988).

A pesquisa sobre RH em *C. canephora* tem focalizado a cultivar Conilon, com indicação da ocorrência de resistência raça específica em vários graus. Alguns genótipos parecem ter resistência monogênica dominante, mas existe indicação da presença de genes de efeito menores. Os componentes de resistência correlacionam-se com o tipo de reação, sendo esta característica importante em estudos de resistência incompleta, pois, pode fornecer indícios sobre possíveis mecanismos de resistência. A RI à *H. vastatrix* em Conilon

varia de acordo com a idade da folha e com a intensidade de luz, indicando que, provavelmente, genes de efeito menores dependentes de condições ambientais estejam presentes. Genes de efeito menores que são influenciados por fatores da planta e do ambiente não são continuamente operantes no processo de resistência. Assim, a pressão de seleção para virulência aumentada no patógeno não é contínua. Mutantes para virulência podem, inicialmente, ter menor adaptação. Se a pressão de seleção não é constante, tais mutantes são, provavelmente, menos competitivos que outros genótipos de ferrugem. Desta maneira, a influência de fatores da planta e do ambiente na resistência, como ocorre em Conilon, pode aumentar a durabilidade da resistência (ESKES, 1983b).

Os híbridos interespecíficos mais estudados para resistência à ferrugem são derivados de cruzamentos, produzidos naturalmente ou artificialmente, entre *C. canephora* e *C. arabica*, conhecidos como Catimor e Icatu. RI em Icatu é caracterizada, principalmente, pelo grau de heterogeneidade de tipo de reação. Tipo de reação heterogênea tem sido relacionada a genes maiores específicos, e a expressão desses genes pode ser influenciada pela temperatura, intensidade de luz e, ou estágio de desenvolvimento da planta. Desta maneira, o tipo de reação heterogênea à ferrugem do cafeeiro, em Icatu, deve estar relacionado com genes de raça específica que possuem uma expressão instável. Plantas com níveis intermediários de resistência mostram heterogeneidade de tipos de reação na mesma planta e na mesma folha, quando inoculadas com culturas puras de *H. vastatrix*, fato este que tem dificultado a classificação de Icatu em grupos fisiológicos de resistência (ESKES e COSTA, 1983). Estudos de herança em genótipos de Icatu com níveis variáveis de resistência incompleta, autopolinizados e, ou cruzados com Catuaí, mostraram uma distribuição bimodal para o tipo de reação, indicando herança mono ou oligogênica (BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988); entretanto, é possível que resistência incompleta, herdada poligenicamente, esteja presente em Icatu. Contudo, será extremamente difícil separar tal resistência da resistência incompleta monogênica, a não ser que sejam realizados estudos precisos sobre herança (ESKES e COSTA, 1983).

Em contraste ao Icatu, Catimor está bem definido nos grupos fisiológicos A, 1, 2, 3, R de resistência vertical (RODRIGUES et al., 1975). Mas, vale lembrar que estudos feitos por FONSECA (1979) e por ALMEIDA (1980) constataram diferentes níveis de resistência horizontal nos genótipos segregantes para suscetibilidade. Observações a nível de campo, na Índia, com gerações avançadas de Catimor, realizadas pelo CIFC, mostraram que algumas plantas que ficaram infectadas apresentaram apenas níveis muito moderados de doença (BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988).

Plantas derivadas do germoplasma de HT, com escores baixos para tipo de reação (1 ou 2 na escala de 0 a 9) provavelmente possuem maior número e dose de genes que as plantas com escores maiores (3 a 4). Uma conclusão similar foi obtida a partir de estudos de genes maiores, que conferem resistência à ferrugem em genótipos de Icatu (ESKES e LEVY, 1987). Devido a esta aparente aditividade entre genes de resistência, a seleção fenotípica para baixos tipos de reação à ferrugem, em derivados do HT e genótipos de Icatu, pode favorecer o acúmulo desses genes. A combinação de diversos genes em um genótipo, provavelmente, conduzirá a resistência durável à ferrugem do cafeeiro (ESKES et al., 1990).

## **2.2. Marcadores genéticos**

Marcadores genéticos são quaisquer características que possibilitem a diferenciação entre indivíduos e que sejam reproduzidos na descendência. Características morfológicas, fisiológicas ou moleculares podem ser usadas como marcadores genéticos. Os primeiros marcadores utilizados em plantas foram os marcadores morfológicos, determinados por mutações simples em um gene específico. Embora sejam de fácil monitoramento, possuem limitações, tais como número restrito de marcadores disponíveis, ausência de ligação com característica de importância econômica, influência do ambiente e efeitos deletérios das mutações.

Mais recentemente, um outro tipo de marcador genético começou a ser utilizado, as isoenzimas (HEIDRICH-SOBRINHO, 1982). Por serem produtos diretos da expressão de genes, podem ser identificados em qualquer fase da planta e não interferem com o processo biológico que se deseja estudar

(ROBINSON, 1998). Entretanto, possuem a desvantagem de evidenciar número limitado de polimorfismos entre genótipos próximos, especialmente entre genótipos de *Coffea arabica* L. (OROZCO-CASTILLO et al., 1994).

### **2.2.1. Marcadores moleculares**

Com o advento da biologia molecular, vários marcadores genéticos baseados na análise direta do DNA foram desenvolvidos, e com a vantagem de serem potencialmente ilimitados em número. A utilidade desses marcadores de DNA é determinada, em grande parte pela tecnologia empregada para revelar os polimorfismos. O primeiro e mais amplamente utilizado foi RFLP (*Restriction Fragment Length polymorphisms*), primeiramente utilizado para mapeamento (BOTSTEIN et al., 1980). A técnica do RFLP é baseada na digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, na separação dos fragmentos em gel de agarose e na transferência destes para membranas de nitrocelulose, onde são hibridizados com sondas de DNA. As sondas são marcadas com nucleotídeos radioativos ou quimioluminescentes, e, após a hibridização, são expostas a um filme de raio-X e submetidas ao processo de revelação. Os fragmentos serão detectados, se possuírem região de homologia à sonda. Os marcadores RFLP apresentam herança codominante, sendo possível a identificação de indivíduos homocigotos e heterocigotos na população. Outra importante vantagem dos RFLPs é o fato de representarem locos únicos em cada genoma, e possibilitarem a utilização de sondas heterólogas, permitindo o mapeamento comparativo entre espécies relacionadas. Uma grande limitação do RFLP é a inexistência de bibliotecas de sondas para espécies pouco estudadas. Outra limitação é sua complexidade técnica, o que requer laboratórios bem equipados e mão-de-obra altamente especializada.

Novos marcadores genéticos baseados na amplificação seletiva do DNA tornaram-se possíveis graças à tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase - PCR (MULLIS e FALOONA, 1987). Um desses marcadores foi desenvolvido por Williams et al. (1990), sendo chamado RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). O RAPD é uma variação da técnica de PCR, e detecta polimorfismos em seqüências de nucleotídeos baseados na amplificação de segmentos de DNA de até 2000 pb, distribuídos ao acaso no

genoma. Como iniciadores (*primer*), são utilizados decâmeros de nucleotídeos de seqüência arbitrária, não sendo necessário o conhecimento prévio da seqüência de DNA a ser amplificada. Duas outras vantagens desses marcadores são a automatização do processo e a pequena quantidade de DNA requerida. Os polimorfismos revelados pela técnica RAPD são oriundos de mutações de ponto, ou deleções no sítio de pareamento do *primer* ou inserções entre os sítios de pareamento. Tais polimorfismos baseiam-se na presença ou ausência do fragmento amplificado de DNA, sendo considerados marcadores dominantes e, por isso não distinguem locos em estado heterozigoto, constituindo uma desvantagem do método (CARLSON et al., 1991). Uma outra desvantagem é que o RAPD pode gerar padrões de bandas variáveis, que não são devidos à variação genética, sendo chamados artefatos. Estes artefatos contribuem para a não reprodutibilidade e perda de confiabilidade do método, em estudos genéticos. A concentração e pureza do DNA, concentração de  $Mg^{++}$  e controle térmico do termociclador são as principais fontes de artefatos relatados em RAPD. Um alto nível de padronização e controle é necessário para que os produtos gerados pelo RAPD sejam reprodutíveis, marcados com confiança e resolvidos consistentemente entre reações amplificadas separadamente (ELLSWORTH et al., 1993).

Os marcadores microssatélites também são marcadores que se baseiam em ampliações de PCR. Esses marcadores são denominados repetições de seqüências únicas (SSR – *simple sequence repeats*) e amplificam repetições de di-, tri-, tetra-, ou penta-nucleotídeos. Tendo disponíveis os *primers* de microssatélites, são de utilização mais rápida, mais econômicos e requerem menos trabalho do que a utilização de marcadores RFLPs (DENNY et al., 1996). São também codominantes e altamente reprodutíveis.

O AFLP é uma classe recente de marcadores, que alia a especificidade dos sítios de restrição do RFLP às facilidades da amplificação da PCR, apresentando-se como uma ferramenta útil na caracterização de genomas e no mapeamento genético (VOS et al., 1995). Em espécies com bastante variabilidade, pode-se obter grande número de marcadores com apenas um par de *primers*. O polimorfismo gerado por esta técnica é preferencialmente dominante.

### 2.3. Mapas de ligação

O mapeamento genômico de uma espécie consiste na produção de um conjunto ordenado de informações sobre as seqüências de DNA que cobrem todo o genoma. Os mapas, assim gerados, podem ser classificados em três tipos, isto é, genético, citogenético e físico. Os mapas citogenéticos representam a aparência de um cromossomo, quando examinado ao microscópio. Particularmente importante é a aparência de regiões de coloração diferencial (bandas), cada uma contendo milhares de pares de bases, de tal modo que cada cromossomo tem um aparência única. Tais mapas são de baixa resolução, mas servem para a importante função de ajudar a identificar cromossomos específicos e regiões cromossômicas. Recentemente, tornou-se possível localizar segmentos de interesse do DNA em regiões cromossômicas num mapa citogenético, usando-se métodos de microscopia fluorescente (GREEN e WATERSTON, 1993).

Os mapas físicos consistem de pontos de referência ordenados com distâncias conhecidas entre um e outro. Vários tipos de pontos de referência são usados na construção de mapas físicos do DNA. Um deles é o local de restrição, identificando as localizações relativas dos sítios para as enzimas de restrição dentro de clones individuais, sendo que o padrão de tais sítios pode ser usado para estabelecer a relação de sobreposição entre os clones. Um outro tipo de referência são os STS (*sequence tagged site*), definidos como pequenas extensões de seqüências de DNA, que podem ser detectadas especificamente por um ensaio de PCR (GREEN e WATERSTON, 1993).

Os mapas genéticos, também conhecidos como mapas de ligação, refletem a localização relativa de marcadores genéticos (em oposição aos físicos) dentro de um intervalo do DNA. Esses mapas têm um significado mais abstrato do que os mapas físicos ou citogenéticos, visto que o espaçamento entre os marcadores é baseado em padrões de herança ao invés de distâncias físicas (GREEN e WATERSTON, 1993).

Os marcadores usados no mapeamento genético são derivados de diferenças implícitas na seqüência de DNA entre indivíduos. Eles permitem que segmentos dos dois cromossomos homólogos sejam distinguidos e seguidos de uma geração para a próxima. O processo de construção de mapas

genéticos envolve o estabelecimento da relação entre diferentes marcadores à medida que eles prosseguem através da meiose. Se dois conjuntos de marcadores estão presentes em cromossomos diferentes, eles distribuem ao acaso na meiose, e, portanto na próxima geração. Se, entretanto, os marcadores estão presentes no mesmo cromossomo, eles são herdados juntos, exceto quando ocorre recombinação durante a meiose. Quanto mais perto os dois marcadores estiverem um do outro no cromossomo, menos provável será a ocorrência do evento de recombinação entre eles. Medindo-se a frequência de eventos de recombinação, é possível estimar a distância genética entre os marcadores e sua ordem relativa, permitindo, assim a construção de mapas genéticos.

Por meio do mapa genético, é possível representar a ordem e a distância relativa entre os locos nos grupos de ligação. A distância genética é medida em termos de frequência de recombinação entre marcadores, que é transformada em distância de mapa (centiMorgans) por meio de algoritmos apropriados. As fórmulas mais comumente utilizadas no mapeamento são as de Haldane e de Kosambi, sendo que a última considera a interferência parcial entre permutas genéticas adjacentes. A frequência de recombinação é variável entre diferentes regiões do cromossomo, entre tipos de cromossomos e entre espécies. Assim, mapas genéticos e físicos fornecem informações diferentes sobre o DNA. Os dois mapas são colineares em relação à ordem dos marcadores; entretanto, não existe relação simples entre frequências de recombinação (distâncias genéticas) e distâncias físicas.

Uma das aplicações mais importantes da tecnologia de marcadores moleculares, no melhoramento de plantas, é a geração de mapas genéticos, que podem ser usados para determinar a localização de genes responsáveis por caracteres simples e complexos. Para o caso de caracteres de herança simples, a identificação de marcadores ligados a genes, que conferem resistência a patógenos, permite monitorar e acelerar a introgressão desses genes em cultivares comerciais, além de possibilitar a piramidação de genes em uma única cultivar. Marcadores ligados a genes de interesse também podem fornecer um ponto de partida para a clonagem de genes baseada em mapa (*Map-Based Cloning*). Por outro lado, a grande maioria dos caracteres de importância econômica está sob controle genético complexo, envolve a ação

de vários genes, e é altamente influenciada pelas condições ambientais, sendo de difícil manipulação e compreensão. Esses locos são denominados locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs - *Quantitative Trait Loci*) (GELDERMANN, 1975), sendo que, para a maioria desses caracteres, existem poucas informações sobre o número, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações entre os locos que controlam sua expressão. Com o uso de mapas genéticos e técnicas de mapeamento de QTLs, é possível obter tais informações. A disponibilidade de vários tipos de marcadores (morfológicos, bioquímicos e moleculares), aliada ao surgimento de pacotes computacionais e metodologias estatísticas apropriadas, tem permitido a construção de mapas genéticos saturados para um grande número de espécies de plantas (TANKSLEY et al. 1992; CAUSSE et al. 1994; REINISCH et al. 1994; BECKER et al., 1995; PLOMION et al., 1995; BÖRNER e KORZUN, 1998; JOOBEUR et al. 1998; SPADA et al. 1998 e VUYLSTEKE et al., 1999).

Complicações advindas da poliploidia podem dificultar o mapeamento genético de espécies poliplóides. Essas dificuldades incluem o grande número de grupos de ligação, a detecção de locos múltiplos por um único marcador e comigração de fragmentos de diferentes locos que podem impedir a interpretação de relações alélicas e análises genéticas (O'DONOUGHUE et al., 1995).

Um mapa parcial de ligação gênica, para a espécie diplóide *Coffea canephora* foi construído utilizando-se população de duplos haplóides (DH) (PAILLARD et al., 1996). Foram utilizados 100 marcadores RAPD e 47 marcadores RFLP, que mapearam 15 grupos de ligação cobrindo 1402 cM. Foi detectado baixo nível de polimorfismo (18% RFLP e 29% RAPD), sendo que 81% marcadores RAPD e 85% marcadores RFLP segregaram 1:1. O cafeeiro tem diversos fatores que dificultam estudos genéticos, tais como o baixo nível de polimorfismo (PAILLARD et al., 1993) e complicações inerentes à poliploidia. No caso das espécies diplóides de *Coffea*, que se reproduzem exclusivamente por fecundação cruzada, a dificuldade está na obtenção de populações segregantes derivadas de cruzamentos controlados (PAILLARD et al., 1996).

Um outro mapa parcial de ligação gênica para *Coffea* sp foi obtido, a partir de 62 plantas RC<sub>1</sub> oriundas do cruzamento entre *C. pseudozanguebariae*

e *C. liberica* var. *dewevrei*, sendo o último utilizado como genitor recorrente. Foram mapeados 14 grupos de ligação, em que 167 marcadores AFLP e 13 marcadores RFLP cobriram 1144 cM. Foram observadas distorções de segregação em 30% dos locos, principalmente 3:1 e 1:3 (KY et al., 2000).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L.C. **Resistência vertical e horizontal à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em gerações F4 e F5 de progênies de cafeeiros Catimor.** Viçosa, UFV. 38p. (Tese M.S.). 1980.
- BECKER, J., VOS, P., KUIPER, M., SALAMINI, F., HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Mol. Gen. Genet.**, v.249, p.65-73, 1995.
- BERTHAUD, J. Étude cytogenétique d'un haploide de *C. arabica*. **Café Cacao Thé**, v.20, p.91-96, 1976.
- BERTHAUD, J., CHARRIER, A. Genetics resources of *Coffea*. In: CLARKE, R.J., MACRAE, R. (Eds). **Coffee**, v.4: agronomy. Elsevier Applied Science, London, p.1-41, 1988.
- BERTHAUD, J., GUILLAUMET, J.L. 'Les caféiers sauvages en Centrafrique'. **Café Cacao Thé**, v.22, p.171-186, 1978.
- BERTHOUE, F., MATHIEU, C., VEDEL, F. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. **Theor. Appl. Genet.**, v.65, p.77-84, 1983.
- BERTHOUE, F., TROUSLOT, P., HAMON, S., VEDEL, F., QUETIER, F. Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers: Variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages. Variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces: *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*. **Café Cacao Thé**, v.24, n.4, p.313-326, 1980.
- BETTENCOURT, A.J. Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timor'. **Circular** n. 23. Instituto Agrônomo. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. 20p. 1973.

- BETTENCOURT, A.J., NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk et Br. **Agronomia Lusitana**, v.31, p.285-92, 1971.
- BETTENCOURT, A.J., NORONHA-WAGNER, M., LOPES, J. Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (“Híbrido de Timor”) à *Hemileia vastatrix* Berk. & BR. **Broteria Genética**, v.1, n.76, p.53-8, 1980.
- BETTENCOURT, A.J., RODRIGUES JR., C.J. Principles e practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. In: CLARKE, R.J., MACRAE, R. (eds). **Coffee**. Elsevier Applied Science, London, 1988. v.4: Agronomy, p. 199-235.
- BOAVENTURA, Y.M.S., CRUZ, N.D. Citogenética do híbrido interespecífico (*Coffea arabica* L. var. Bourbon x *C. canephora* Pierre ex Froehner var. Robusta (Linden Chev.) que originou o café Icatu. **Turrialba**, v.37, n.2, p.171-178, 1987.
- BOAVENTURA, Y.M.S., CRUZ, N.D., GOMES, C.R.B. Observações na microsporogênese de *Coffea eugenioides* Moore com número de cromossomos duplicados. **Turrialba**, v.38, n.1, p.31-38, 1988.
- BÖRNER A., KORZUN V. A consensus linkage map of rye (*Secale cereale* L.) including 374 RFLPs, 24 isozymes and 15 gene loci. **Theor. Appl. Genet.**, v.97, p.1279-1288, 1998.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M.H., DAVIS, R.W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Amer. J. Human Genet**, v.32, p.314-331, 1980.
- BOUHARMONT, J. Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre *Coffea*. Publ. INEAC, Sér. Scient., n.77, 94pp, 1958.
- BOUHARMONT, J. Somatic chromosomes of some *Coffea* species. **Euphytica**, v.12, p.254-157, 1963.
- CARLSON, J.E, TULSIERAM, L.K., GLAUBITZ, J.C., LUK, V.W.K., KAUFFELDT, C., RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theor. and Appl. Genet.**, v.83, p.194-200, 1991.
- CARVALHO, A. Melhoramento do cafeeiro – cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora*. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INT. SUR LE CAFÉ, 10. Salvador, BA. ASIC, 1982. p.363-368.
- CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: CLARKE, R.J., MACRAE, R. (eds) **Coffee**, Elsevier Applied Science, London, 1988. v.4: Agronomy, p.129-165.

- CARVALHO, A. Taxonomia de *Coffea arabica* L. VI Caracteres morfológicos dos haplóides. **Bragantia**, v.12, n.4-6, p.201-212, 1952.
- CARVALHO, A., KRUG, C.A. Genética de *Coffea*. XII Hereditariedade da cor amarela da semente. **Bragantia**, v.IX, p.193-203, 1949.
- CARVALHO, A., MEDINA-FILHO, H.P., FAZUOLI, L.C. Evolução e melhoramento do cafeeiro. **Colóquio sobre Citogenética e Evolução de Plantas**, 1, Piracicaba, 1984. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, p.215-234.
- CARVALHO, A., MEDINA-FILHO, H.P., FAZUOLI, L.C., GUERREIRO-FILHO, O., LIMA, M.M.A. Aspectos genéticos do cafeeiro. **Rev. Brasil. Genet.**, v.14, n.1., p.135-183, 1991.
- CARVALHO, A., MONACO, L.C. Genetic relationships of selected *Coffea* species. **Ciência e Cultura**, v.19, n.1, p.151-165, 1967.
- CAUSSE, MA., FULTON, T.M.; CHO, Y.G., AHN, S.N., CHUNGWONSE, J., WU, K., XIAO, J., YU, Z., RONALD, P.C., HARRINGTON, S.E., SECOND, G., MCCOUCH, S.R., TANKSLEY, S.D. Saturated molecular map of the rice genome based on an interespecific backcross population. **Genetics**, 138:1251-1274, 1994.
- CHARRIER, A., BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N., WILLSON, K.C. **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, USA, 1985. p.13-47.
- CHINNAPPA, C.C. Interespecific hybrids of *Coffea canephora* and *C. liberica*. **Genetica**, v.41, p.141-146, 1970.
- CONAGIN, C.H.T.M., MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora*. **Bragantia**, v.20, p.787-804, 1961.
- CRAMER, P.J.S. Review of literature of coffee research in Indonesia. Turrialba (Costa Rica). Interamerican Institute of Agricultural Sciences. 262p. (**Miscellaneous publ.**, n.15), 1957.
- DE WET, J.M.J., HARLAN, J.R. Chromosome pairing and phylogenetic affinities. **Taxon**, v.21, p.67-70, 1972.
- DENNY, R.L., LANGE, D.L., PENUELA, S., MUDGE, J., ORF, J.H., YOUNG, N.D. Marker-assisted selection for soybean cyst nematode resistance. **Soybean Genetics Newsl.**, v.23, n.3, p.179-182, 1996.
- ELLSWORTH, D.L., RITTENHOUSE, K.D., HONEYCUTT, R.L. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. **BioTechniques**, v.14, p.214-217, 1993.

- ESKES, A.B. Characterization of incomplete resistance to *Hemileia vastatrix* in *Coffea canephora* cv. Kouillou. **Euphytica**, v.32, p.639-48, 1983b.
- ESKES, A.B. **Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*)**. Wageningen, Land bouwhogeschool, 1983a. 140p. (Tese Ph.D.).
- ESKES, A.B., CARVALHO, A. Variation for incomplete resistance to *Hemileia vastatrix* in *Coffea arabica*. **Euphytica**, v.32, p.625-37, 1983.
- ESKES, A.B., COSTA, W.M. Characterization of incomplete resistance to *Hemileia vastatrix* in the Icatu coffee populações. **Euphytica**, v.32, p.649-57, 1983.
- ESKES, A.B., HOOGSTRATEN, J.G.J., TOMA-BRAGUINI, M., CARVALHO, A. Race-specificity and inheritance of incomplete resistance to coffee leaf rust in some Icatu coffee progenies and derivatives of Hibrido de Timor. **Euphytica**, v.47, p.11-19, 1990.
- ESKES, A.B.; LEVY, F.A. Análise genética, a nível diplóide, da resistência encontrada no café Icatu à *Hemileia vastatrix*. Primeiros resultados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEERAS, 14, Campinas. **Resumos...** Rio de Janeiro, MIC/IBC, p.97-99, 1987.
- FELDMAN, W. Chromosome pairing between differential genomes in hybrids of tetraploid *Aegilops* species. **Evolution**, v.19, p.563-568, 1965b.
- FELDMAN, W. Cytogenetic activity and mode of action of the pairing homoeologous (*Ph1*) gene of wheat. *Crop Sci*, v.33, p.894-897, 1993.
- FELDMAN, W. Further evidence for natural hybridization between tetraploid species of *Aegilops* section *Pleionathera*. **Evolution**, v.19, p.162-174, 1965a.
- FERWERDA, F.P. Coffee breeding in Java. **Economic Botany**, v.2, n.3, p.258-272, 1948.
- FLOR, H.H. Host parasite interaction in flax-rust, its genetics and other implications. **Phytopathology**, v.45, p.680-685. 1955.
- FONSECA, S.E.A. **Resistência não específica em cultivares de *Coffea arabica* L. e progênies de Catimor a raças de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.** Viçosa, UFV. 42p. (Tese M.S.). 1979.
- FONTES, B.P.D., CARVALHO, C.R. Estudo dos cromossomos de *Coffea arabica* por método de análise de imagem. In: Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, MG. 2000. **Resumos Expandidos...** Brasília, DF, EMBRAPA CAFÉ/MINASPLAN, 2000. p.591-594.

- FONTES, J.R., CARDOSO, A.A., CRUZ, C.D., ZAMBOLIM, L., SAKIYAMA, N.S., PEREIRA, A.A. Estudo da capacidade combinatória e da heterose em cruzamentos entre linhagens de Catuái e Híbrido de Timor, café. In: III Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, Londrina, PR, 1999. **Resumos Expandidos...** Londrina, PR, IAPAR/IRD, 2000. p.255-260.
- FORNI-MARTINS, E.R., CRUZ, N.D. Estudo da microsporogênese e formação de uma planta monossômica de café (*Coffea arabica* L.). **Turrialba**, v.39, n.3, p.323-327, 1989.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theor. Appl. Genet.**, v.46, n.1, p.319-330, 1975.
- GRASSIAS, M., KAMMACHER, P. Observations sur la conjugaison chromosomique de *Coffea arabica* L. **Café Cacao Thé**, v.19, n.3, p.177-190, 1975.
- GREEN, E.D., WATERSTON, R.H. O projeto do genoma humano: perspectivas e implicações para a medicina clínica. **Suplemento JAMA**, v.3, n.8, p.969-990, 1993.
- HARLAN, J.R., DE WET, J.M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, v.20, p.509-517, 1971.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos. **Pesq. Agrop. Bras.**, v.17, n.2, p.281-286, 1982.
- HÖFLING, J.F., OLIVEIRA, A.R. A serological investigation of some *Coffea* species with emphasis on the origin of *C. arabica* L. **Ciência e Cultura**, v.33, n.1, p.66-72, 1981.
- JACKSON, R.C. Polyploid and diploid: news perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. **Amer. J. Bot.**, v.69, p.1512-1523, 1982.
- JOOBEUR, T., VIRUEL M.A., VICENTE, M.C., JAUREGUI, B., BALLESTER, J., DETTORI, M.T., VERDE, I., TRUCO, M.J., MESSEGUER, R., BATLLE, I., QUARTA, R., DIRLEWANGER, E., ARÚS, P. Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using almond x peach F<sub>2</sub> progeny. **Theor. Appl. Genet.**, v.97, p.1034-1041, 1998.
- KAMMACHER, P., CAPOT, J. Sur les relations caryologiques entre *Coffea arabica* et *Coffea canephora* 1972. **Café Cacao Thé**, v.16, n.4, p.289-294, 1972.
- KRUG, C.A. Cytological observation in *Coffea* – III. **J. Genet.**, v.34, p.399-414, 1937.

- KRUG, C.A. Melhoramento do cafeeiro. Doze anos (1933-1944) de pesquisas básicas e aplicadas realizadas nas Seções de Genética, Café e Citologia do Instituto Agrônomo. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, v.20, p.863-872; 979-992; 1038-1046, 1945.
- KRUG, C.A. Plano de estudos em execução no Departamento de Genética do Instituto Agrônomo. Campinas, Instituto Agrônomo, 39p. (**Boletim técnico**, 26), 1936.
- KRUG, C.A., CARVALHO, A. Melhoramento do cafeeiro. V Melhoramento por hibridação. **Bragantia**, v.12, n.4-6, p.141-151. 1952.
- KRUG, C.A., CARVALHO, A. The genetic of *Coffea*. **Advanc. Genet.**, v.4, p.127-158, 1951.
- KY, C.L., BARRE, P., LORIEUX, M., TROUSLOT, P., AKAFFOU, S., LOUARN, J., CHARRIER, A., HAMON, S., NOIROT, M. Interespecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp). **Theor. Appl. Genet.**, v.101, n.4, p.669-676, 2000.
- LASHERMES, P., ANDRZEJEWSKI, S., BERTRAND, B., BERTRAND, B., COMBES, M.C., DUSSERT, S., GRAZIOSI, G., TROUSLOT, F.A. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v.100, p.139-146, 2000b.
- LASHERMES, P., COMBES, M.C., ROBERT, J., TROUSLOT, P., D'HONT, A., ANTHONY, F., CHARRIER, A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Mol. Gen. Genet.**, v.261, p.259-266, 1999.
- LASHERMES, P., COUTURON, E., MOREAU, N., PAILLARD, M., LOUARN, J. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.458-462, 1996.
- LASHERMES, P., CROS, J., MARMEY, P., CHARRIER, A. Use of random amplified DNA markers to analyse variability and relationships of *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.40, p.91-99, 1993.
- LASHERMES, P., PACZEK, V., TROUSLOT, P., COMBES, M.C., COUTURON, E., CHARRIER, A. Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* x *C. canephora*. **The Journal of Heredity**, v.91, n.1, p.81-85, 2000a.
- LEROY, J.F., PLU, A. Sur les nombres chromosomiques des *Coffea* malgaches. **Café Cacao Thé**, v.10, p.216-217, 1966.
- LIU, L.C., SCHOOLER, A.B. *Hordeum depressum* Rydb x Allotetraploid (*H. marinum* Huds x *H. pusillum* Nutt.). **Cytologia**, v.30, p.201-204. 1965.

- LOPES, C.R., CUNHA, R.A., BLOTTA, L.F. Estudo taxonômico do gênero *Coffea* com emprego de métodos numéricos. **Turrialba**, v.34, n.4, p.421-430, 1984.
- LOUARN, J. Hybrides interspécifiques entre *Coffea canephora* Pierre et *C. eugenioides* Moore. **Café Cacao Thé**, v. 20, n.1, p.33-52, 1976.
- LOUARN, J. Hybrides interspécifiques entre *Coffea canephora* Pierre et *C. liberica* Bull. Ex Hiern. **Café Cacao Thé**, v.24, n.4, p.297-304, 1980.
- MAYNE, W.W. **Annual Report of the Coffee Scientific Officer**. Mysore Coffee Experimental Station. 21p. (Bulletin 14), 1936.
- MEDINA, D.M. Observações citológicas em *Coffea* XVI – Microsporogênese em *Coffea arabica* L. var. *rugosa* K.M.C. **Bragantia**, v.10, p.61-65. 1950.
- MEDINA-FILHO, H.P., CARVALHO A., SONDAHL, M.R., FAZUOLO, L.C., COSTA, W.M. Coffee breeding and related evolutionary aspects. In: JANICK, J. (ed) **Plant breeding reviews**, Westport, AVI, 1984. v.2, p.157-193, 1984.
- MENDES, A.J.T. A hibridação interespecífica no melhoramento do cafeeiro. **Bragantia**, v.11, n.10-12, p.297-306, 1951.
- MENDES, A.J.T. Observações citológicas em *Coffea*. XV Microsporogênese em *Coffea arabica* L. **Bragantia**, v.10, n.3, p.79-87, 1950.
- MENDES, A.J.T., BACCHI, O. Observações citológicas em *Coffea*. V: Uma variedade haplóide (di-haplóide) de *Coffea arabica* L. **Boletim Técnico** n.77. Instituto Agrônomo, Campinas, 1940.
- MONTAGNON, C., BOUHARMONT, P. Multivariate analysis of phenotypic diversity of *Coffea arabica*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.43, p.221-227, 1996.
- MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v.55, n.2, p.335-350. 1987.
- NORONHA-WAGNER, M., BETTENCOURT, A.J. Genetic study of the resistance of *Coffea* sp to leaf rust 1. Identification and behavior of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany**, v.45, p.2021-31, 1967.
- O'DONOUGHUE, L.S., KIANIAN, S.F., RAYAPATI, P.J., PENNER, G.A., SORRELLS, M.E., TANKSLEY, S.D., PHILLIPS, R.L., RINES, H.W., LEE, M., FEDAK, G., MOLNAR, S.J., HOFFMAN, D., SALAS, C.A., WU, B., AUTRIQUE, E., DEYNZE, V. A molecular linkage map of cultivated oat. **Genome**, v.38, p.368-380, 1995.

- OROZCO-CASTILLO, C., CHALMERS, K.J., POWEL, W., WAUGH, R. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. **Plant Cell Reports**, v. 15, p.337-341, 1996.
- OROZCO-CASTILLO, C., CHALMERS, K.J., WAUGH, R., POWEL, W. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.87, p.934-940. 1994.
- PAILLARD, M., DUCHATEAU, N., PÉTIARD, V. Diversité génétique de quelques groupes de caféiers: utilisation des outils moléculaires, RFLP et RAPD. ASIC, 15<sup>e</sup> Colloque, Montpellier, pp 33-40, 1993.
- PAILLARD, M., LASHERMES, P., PÉTIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.41-47, 1996.
- PINTO-MAGLIO, C.A.F., CRUZ, N.D. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. I. Nucleolar chromosomes. **Caryologia**, v.40, n.1-2, p.7-23. 1987.
- PINTO-MAGLIO, C.A.F., CRUZ, N.D. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. **Caryologia**, v.51, n.1, p.19-35. 1998.
- PLOMION, C., BAHRMAN, N., DUREL, C.E., O'MALLEU, D.M. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. **Heredity**, 74:661-668, 1995.
- RAINA, S.N., MUKAI, Y., YAMAMOTO, M. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). **Theor. Appl. Genet.**, v.97, p.1204-1209, 1998.
- REINISCH, A.J., DONG, J., BRUBAKER, C.L., STELLY, D.M., WENDEL, J.F., PATERSON, A.H. A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. **Genetics**, 138:829-847, 1994.
- RIBEIRO, I.J.A., BERGAMIN FILHO, A., CARVALHO, P.C.T. Avaliação da resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cultivares de *Coffea arabica* L. em condições naturais de epidemia. **Summa Phytopathologica**, v.7, p.80-95, 1981.
- RIJO, L. Observações citológicas no caféiro "Híbrido de Timor". **Portugaliae Acta Biologica**, Serie A, v. 13, n.1-2, p.157-168, 1974.
- RILEY, R. The diploidization of polyploid wheat. **Heredity**, v.15, p.407-429, 1960.
- ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 329-368.

- RODRIGUES JR., C.J., BETTENCOURT, A.J., RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology**, v.13, p.49-70, 1975.
- SANTOS, A.C.P., CORDEIRO, A.T. CAMPOS, M.R.C., OTONI, W.C., ZAMBOLIM, L. Calogênese em *Coffea* via cultura semi-sólida. In: Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, MG. 2000. **Resumos Expandidos...Brasília, DF, EMBRAPA CAFÉ/MINASPLAN, 2000.** p.156-159.
- SCHOOLER, A.B. Wild barley hybrides IV *Hordeum depressum* x Allotetraploid (*H. compressum* x *H. pusillum*). **Jour. Hered.**, v.54, p.130-132. 1963.
- SEVERINO, L., SAKIYAMA, N.S., PEREIRA, A.A., MIRANDA, G.V., ZAMBOLIM, L. Correlações genotípicas e análises de trilha em café (*Coffea arabica* L.). In: Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, MG. 2000. **Resumos Expandidos...Brasília, DF, EMBRAPA CAFÉ/MINASPLAN, 2000.** p.527-5530.
- SPADA, A., CAPORALI, E., MARZIANI, G., PORTALUPPI, P., RESTIVO, F.M., TASSI, F., FALAVIGNA, A. A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. **Theor. Appl. Genet.**, 97:1083-1089, 1998.
- SRINIVASAN, C.S., VISHVESHWARA, S. Heterosis and stability for yield in Arabica coffee. **Indian Journal of Genetics & Planta Breeding**, v.38, n.3, p.416-420, 1978.
- STEBBINS, G.L. Types of polyploids: their classification and significance. **Adv. Genet.**, v.1, p.403-429. 1947.
- SYBENGA, J. Genética y citología del café. **Turrialba**, v.10, n.3, p.83-137, 1960.
- TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W., PRINCE, J.P., DE VICENTE, M.C., BONIERBALE, M.W., BROUN, P., FULTON, T.M., GIOVANNONI, J.J., GRANDILLO, S., MARTIN, G.B., MESSEGUER, R., MILLER, J.C., MILLER, L., PATERSON, A.H., PINEDA, O., RODER, M.S., WING, R.A., WU, W., YOUNG, N.D. High-density molecular-linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, 132:1141-1160, 1992.
- THOMAS, A.S. The wild coffees of Uganda. **Genetics**, v.40, p.563. 1944.
- VAN DER VOSSSEN, H.A.M. Coffee selection and breeding. In: CLIFFORD, M.N., WILLSON, K.C. **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage.** The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, USA, 1985. p.48-96.
- VISHVESHWARA, S. Occurrence of a haploid *Coffea arabica* L. cv. *Kents*. **Indian Coffee**, v.34, n.3, p.123-124, 1960.

- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, v.23, n.18, p.4407-4414, 1995.
- VUYLSTEKE, M., MANK, R., ANTOISE, R., BASTIAANS, E., SENIOR, M.L., STUBER, C.W., MELCHINGER, A.E., LUBBERSTEDT, T., XIA, X.C.; STAM, P., ZABEAU, M., KUIPER, M. Two high-density AFLP® linkage maps *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.99, p.921-935, 1999.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.

## **DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE ACESSOS DO SUBGÊNERO *Coffea* AVALIADAS POR MARCADORES RAPD**

### **RESUMO**

A diversidade genética de cultivares de *Coffea arabica* L. é relativamente pequena e sua ampliação é importante para o futuro do melhoramento do cafeeiro. Assim, informações sobre distâncias genéticas entre acessos de um banco de germoplasma, baseadas em marcadores moleculares, são úteis na avaliação da diversidade presente. Cinquenta e dois *primers* arbitrários foram utilizados para avaliar a reprodutibilidade e influência do número de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) na estimação de distâncias genéticas entre 40 acessos do gênero *Coffea* do banco de germoplasma da UFV/EPAMIG (incluindo 4 espécies diferentes). A técnica RAPD mostrou-se adequada para a estimação de distâncias genéticas entre acessos de *Coffea*, sendo satisfatório o nível de reprodutibilidade (76,88%), considerando-se duas avaliações sucessivas. O número de locos, considerado neste estudo, não influenciou a formação dos grupos principais, mas influenciou a ordenação dos acessos dentro dos subgrupos.

Palavras indexadas: café, *Coffea*, marcadores RAPD, reprodutibilidade, distância genética, diversidade genética.

## 1. INTRODUÇÃO

O subgênero *Coffea* compreende cerca de 100 espécies distribuídas em diferentes seções. Das espécies cultivadas, *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre et Froenher (café robusta) são as de maior importância econômica, embora outras espécies tenham uma valiosa reserva de genes para diferentes propostas do melhoramento genético. Na produção mundial, *Coffea arabica* contribui com aproximadamente 70% por estar associada com produto de qualidade superior.

Pesquisas na área do melhoramento genético do cafeeiro, realizadas no Brasil, resultaram na obtenção de cultivares com potencial produtivo 300% superior ao das cultivares tradicionais. Entretanto, evidências históricas indicam que as populações básicas para as seleções das cultivares atuais originaram de poucas plantas introduzidas, oriundas do Yemen. A ampliação da diversidade genética tornou-se importante na promoção do melhoramento desta cultura (Medina-Filho et al., 1984). Informações sobre distâncias genéticas, entre acessos de um banco de germoplasma, são úteis para identificação da diversidade genética.

Durante muitos anos, melhoristas contaram com marcadores fenotípicos para analisar a diversidade genética. Entretanto, tais marcadores possuem limitações, incluindo a influência do ambiente e o número restrito de descritores. Mais recentemente, marcadores moleculares bioquímicos, tais como as isoenzimas, têm sido usados com este propósito, apesar de terem a desvantagem do limitado número de marcadores disponíveis. Isto é

particularmente importante para espécies cultivadas com estreita base genética. Em café, isoenzimas têm-se mostrado ineficientes no estudo de diversidade genética (Berthou e Trouslot, 1977).

Com o advento da biologia molecular, vários marcadores genéticos baseados na análise direta do DNA foram desenvolvidos, com a vantagem de serem potencialmente ilimitados em número. Montagnon and Bouharmont (1996) analisaram a diversidade fenotípica entre 148 acessos de *Coffea arabica*, com base em 18 marcadores morfológicos e agrônômicos, e relataram a importância do uso de marcadores moleculares no estudo da diversidade desses materiais. A utilidade desses marcadores de DNA é determinada, em grande parte, pela tecnologia empregada para revelar os polimorfismos. O primeiro e mais amplamente utilizado foi RFLP (*Restriction Fragment Length polymorphisms*) (Botstein et al., 1980), que oferece a vantagem do grande número de marcadores polimórficos; entretanto, seu uso para estudos de organização de germoplasmas é limitado pelo custo e uso intensivo de mão-de-obra.

Com o desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), várias técnicas foram desenvolvidas para detectar polimorfismos de DNA pela amplificação de fragmentos específicos de DNA e separação dos fragmentos por eletroforese para visualização dos polimorfismos. Uma dessas técnicas foi desenvolvida por Williams et al. (1990) e denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Estes marcadores são fáceis de serem detectados, pois, não requerem informações sobre a seqüência de DNA a ser amplificada ou a síntese de *primers* específicos. Duas outras vantagens consistem na automatização do processo e pequena quantidade de DNA requerida. Estas vantagens fazem com que os marcadores RAPD sejam escolhidos para determinação de similaridades genéticas (Thormann e Osborn, 1992). Entretanto, o método RAPD pode gerar padrões de bandas variáveis, que não são devidos à variação genética e que são denominados artefatos. Estes artefatos contribuem para a não reprodutibilidade e perda de confiabilidade do método, em estudos genéticos. A concentração e pureza do DNA, concentração de  $Mg^{++}$  e controle térmico do termociclador são as principais fontes de artefatos relatados em RAPD. Um alto nível de padronização e controle é necessário para que os produtos gerados pelo

RAPD sejam reprodutíveis, marcados com confiança e resolvidos, consistentemente, entre reações amplificadas separadamente.

Outros marcadores baseados na PCR, como microsátélites e AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), também têm sido utilizados para análise de diversidade em culturas como soja (Akkaya et al., 1992), cevada (Sanchez et al., 1996; Struss e Plieske, 1998), milho (Pejic et al., 1998) e arroz (Fuentes et al., 1999), inclusive em *Coffea* (Lashermes et al., 2000).

Este trabalho teve objetivo avaliar a reprodutibilidade e a influência do número de marcadores RAPD na estimação de distâncias genéticas entre 40 acessos do gênero *Coffea* do banco de germoplasma da UFV/EPAMIG, localizado no campus da Universidade Federal de Viçosa.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Material genético

Na Tabela 1, encontram-se listados os 40 genótipos do banco de germoplasma, avaliados quanto à diversidade genética com base em marcadores RAPD. Uma planta de cada acesso foi utilizada no presente trabalho.

### Extração de DNA

O DNA foi extraído de folhas jovens, seguindo-se o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1990) com a adição de PVP-40 (solúvel) no tampão de extração. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado a 4°C. Na época da amplificação, foi diluído em TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para uma concentração final de 10 ng/μl.

### Amplificação de DNA e análise eletroforética dos produtos

O trabalho foi realizado em duas etapas de amplificações, sendo que na primeira etapa foram utilizados 24 *primers* e na segunda 39 *primers*. Onze *primers* foram comuns às duas etapas de amplificações. Os *primers* (Tabela 2) são de 10 bases, da Operon Technologies, sendo que as amplificações foram

feitas em termociclador Perkin-Elmer 9600 e cada reação contou com um volume total de 25 µl, contendo os seguintes componentes: 25 ng de DNA genômico, 1 unidade de AmpliTaq DNA polimerase, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 µM de *primer*, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl pH 8,3 e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e o volume final completado com água ultrapura. Foi utilizado o seguinte programa: um ciclo para desnaturação (95°C por 1 min), 39 ciclos para amplificação (15 seg a 94°C, 30 seg a 35°C, 60 seg a 72°C) e, para finalizar, 7 min a 72°C. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em geis de agarose 1,4%, corados com brometo de etídio, visualizados em UV e fotodocumentados. RAPDs foram registrados como presença ou ausência de bandas. Somente foram consideradas as bandas polimórficas mais nítidas.

### **Análise dos dados**

A planilha de dados foi montada, atribuindo-se valor 1 para a presença, e 0 para a ausência de bandas. Estimativas de similaridades genéticas foram expressas como coeficientes de similaridades de Jaccard (Jaccard, 1901) empregando-se a equação  $SG_{ij} = a/(a+b+c)$ , em que  $SG_{ij}$  é a similaridade genética entre os genótipos  $i$  e  $j$ ,  $a$  é o número de bandas presentes em ambos  $i$  e  $j$ ,  $b$  é o número de bandas presentes em  $i$  e ausentes  $j$ , e  $c$  é o número de bandas presentes em  $j$  e ausentes em  $i$ . A conversão para distância genética (DG) foi feita, empregando-se a equação  $DG_{ij} = 1 - SG_{ij}$ . O programa GENES (Cruz, 1997) foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas. O dendrograma, baseado na matriz de distâncias genéticas, foi obtido pela análise de agrupamento do programa STATISTICA, versão 5.0, usando-se o método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic average*).

Tabela 1 - Acessos de *Coffea* utilizados para avaliação de distâncias genéticas com marcadores RAPD.

<b>Genótipos</b>	<b>Origem</b>
01. <i>Coffea racemosa</i>	<i>Coffea racemosa</i>
02. <i>Coffea congensis</i>	<i>Coffea congensis</i>
03. <i>Coffea canephora</i> T 3755	<i>Coffea canephora</i>
04. UFV 557-3	<i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i>
05. Híbrido de Timor CIFC 4106	<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>
06. Híbrido de Timor CIFC 2234	<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>
07. Típica UFV 2945 (China)	<i>Coffea arabica</i>
08. Típica UFV 536 (Portugal)	<i>Coffea arabica</i>
09. Catuaí Vermelho IAC 15	<i>C. arabica</i> (Caturra Amarelo x Mundo Novo)
10. Catuaí Vermelho IAC 44	<i>C. arabica</i> (Caturra Amarelo x Mundo Novo)
11. Catuaí Vermelho IAC 99	<i>C. arabica</i> (Caturra Amarelo x Mundo Novo)
12. Catuaí Vermelho IAC 81	<i>C. arabica</i> (Caturra Amarelo x Mundo Novo)
13. Catuaí Amarelo IAC 30	<i>C. arabica</i> (Caturra Amarelo x Mundo Novo)
14. Catuaí Amarelo IAC 86	<i>C. arabica</i> (Caturra Amarelo x Mundo Novo)
15. Catuaí Amarelo IAC 47	<i>C. arabica</i> (Caturra Amarelo x Mundo Novo)
16. Catuaí Amarelo IAC 113	<i>C. arabica</i> (Caturra Amarelo x Mundo Novo)
17. Mundo Novo IAC 464-18	<i>C. arabica</i> (Bourbon Vermelho x Sumatra)
18. Mundo Novo IAC 515-3	<i>C. arabica</i> (Bourbon Vermelho x Sumatra)
19. Mundo Novo IAC 376-4-32	<i>C. arabica</i> (Bourbon Vermelho x Sumatra)
20. Mundo Novo IAC 388-17-16	<i>C. arabica</i> (Bourbon Vermelho x Sumatra)
21. Mundo Novo IAC 376-4-22	<i>C. arabica</i> (Bourbon Vermelho x Sumatra)
22. Bourbon Amarelo UFV 535 (CENICAFE)	<i>Coffea arabica</i>
23. Bourbon UFV 2952	<i>Coffea arabica</i>
24. Bourbon UFV 2946 (China)	<i>Coffea arabica</i>
25. Bourbon UFV 2947 (China)	<i>Coffea arabica</i>
26. Caturra Vermelho CIFC 19/1	<i>C. arabica</i> (mutação em Bourbon Vermelho)
27. Catimor UFV 395-141 (F <sub>3</sub> de CIFC HW 26/5)	<i>C. arabica</i> (Caturra Vermelho x H. Timor)
28. Catimor UFV 386-19 (F <sub>3</sub> de CIFC HW 26/5)	<i>C. arabica</i> (Caturra Vermelho x H. Timor)
29. Catimor UFV 1310 (F <sub>4</sub> de CIFC HW)	<i>C. arabica</i> (Caturra Vermelho x H.

26/5)	Timor)
30. Catimor UFV 1359 (F <sub>4</sub> de CIFC HW 26/5)	<i>C. arabica</i> (Caturra Vermelho x H. Timor)
31. Catimor UFV 2983 (F <sub>5</sub> de CIFC HW 26/5)	<i>C. arabica</i> (Caturra Vermelho x H. Timor)
32. H 484-2	<i>C. arabica</i> (Mundo Novo x H. Timor)
33. H 415-3	<i>C. arabica</i> (Catuaí Amarelo x H. Timor)
34. Mundindu UFV 315-76	<i>C. arabica</i> (Mundo Novo x S 795)
35. Cachimor UFV 351-13	<i>C. arabica</i> [(Vila Sarchi x H. Timor) x Caturra Amarelo]
36. Cavimor UFV 357-4	<i>C. arabica</i> [(Caturra x H. Timor) x Catuaí Amarelo]
37. San Ramon UFV 3094	<i>C. arabica</i> (mutação em Típica)
38. Airi UFV 3095	<i>C. arabica</i> (seleção em San Ramon)
39. Purpuracens UFV 4072	<i>C. arabica</i> (mutação em Catuaí Amarelo)
40. H 843	<i>C. arabica</i> (UFV 1359 x Maragogipe)

CENICAFE - Centro Nacional de Investigaciones del Café (Colômbia); CIFC - Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (Portugal); ERU - Estação Regional de Vige (Angola); IAC - Instituto Agrônomo de Campinas (Brasil); T - Turrialba (Costa Rica); UFV - Universidade Federal de Viçosa (Brasil); H - híbrido; HW - híbrido Wagner.

Tabela 2 - Lista de *primers* utilizados na avaliação de distâncias genéticas entre 40 genótipos de cafeeiro.

<i>Primers</i> utilizados na 1 <sup>a</sup> amplificação	<i>Primers</i> utilizados na 2 <sup>a</sup> amplificação	<i>Primers</i> utilizados na 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> amplificações
01. OPA-01	01. OPA-01	01. OPA-01
02. OPA-02	02. OPA-02	02. OPA-02
03. OPA-04	03. OPA-05	03. OPA-05
04. OPA-05	04. OPA-07	04. OPA-10
05. OPA-10	05. OPA-08	05. OPA-18
06. OPA-12	06. OPA-09	06. OPA-20
07. OPA-18	07. OPA-10	07. OPB-01
08. OPA-20	08. OPA-11	08. OPB-07
09. OPB-01	00. OPA-13	09. OPB-11
10. OPB-07	10. OPA-17	10. OPB-12
11. OPB-11	11. OPA-18	11. OPC-09
12. OPB-12	12. OPA-19	
13. OPC-01	13. OPA-20	
14. OPC-02	14. OPB-01	
15. OPC-03	15. OPB-02	
	25. OPB-19	
	26. OPB-20	
	27. OPC-09	
	28. OPE-01	
	29. OPE-08	
	30. OPE-15	
	31. OPE-19	
	32. OPF-03	
	33. OPF-06	
	34. OPF-14	
	35. OPG-09	
	36. OPG-16	
	37. OPG-17	
	38. OPH-16	
	39. OPH-17	

16. OPC-04	16. OPB-03
17. OPC-05	17. OPB-04
18. OPC-08	18. OPB-05
19. OPC-09	19. OPB-06
20. OPC-10	20. OPB-07
21. OPC-13	21. OPB-10
22. OPC-15	22. OPB-11
23. OPD-15	23. OPB-12
24. OPD-20	24. OPB-16

---

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Distâncias genéticas com base em 151 locos RAPD

Os 24 *primers* utilizados na primeira etapa de ampliações deram origem a 151 bandas polimórficas, média de 6,29 bandas por *primer*. Sendo que, 22 (14,57%) bandas foram polimórficas entre os acessos da espécie *C. arabica*. A Figura 1 apresenta um exemplo de padrão eletroforético obtido com o *primer* OPC-09.

As distâncias genéticas, expressas como complementos aritméticos dos coeficientes de Jaccard, obtidas para 40 genótipos de cafeeiro e baseadas nos 151 locos polimórficos de marcadores RAPD (Tabela 3), variaram de 0% (entre os genótipos Mundo Novo IAC 515-3 e Mundo Novo IAC 388-17-16 e entre Catuaí Vermelho IAC 81 e Catuaí Amarelo IAC 86, dentre outros pares) a 95% (entre as espécies *C. racemosa* e *C. canephora*). O acesso mais próximo de *C. racemosa* foi o acesso UFV 557-3, com 71,15% de distância, concordando com a origem genealógica, pois este é descendente de *C. racemosa*. Os acessos de *C. arabica* apresentaram uma distância média de 89% da espécie *C. racemosa*. Lashermes e colaboradores (1995), trabalhando com marcadores RAPD, encontraram distância de 95% entre *C. arabica* e *C. racemosa*.

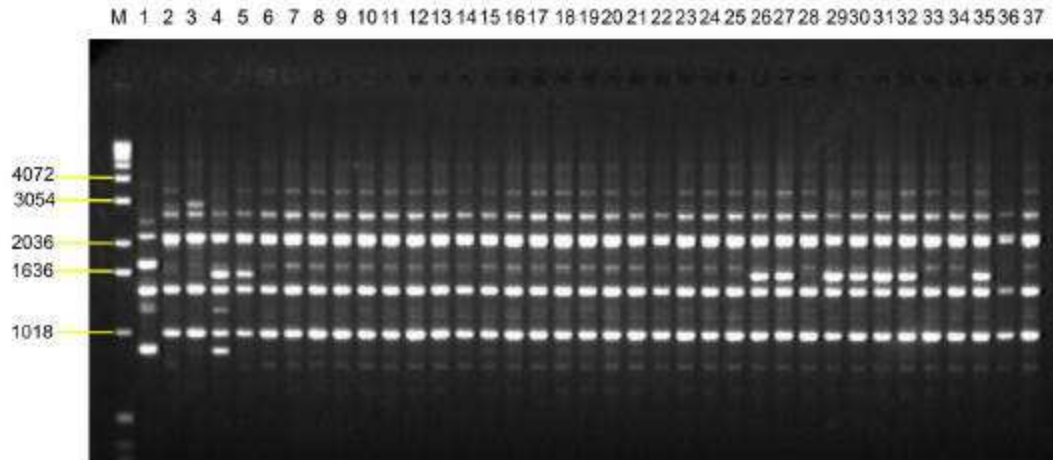


Figura 1 - Perfil eletroforético de genótipos de café obtido com o *primer* OPC-09. Da esquerda para a direita: M - DNA marcador de peso molecular 1 kb Ladder; 1 - *C. racemosa*; 2 - *C. congensis*; 3 - *C. canephora*; 4 - UFV 557-3; 5 - Híbrido de Timor CIFC 4106; 6 - Híbrido de Timor CIFC 2234; 7 - Típica UFV 2945; 8 - Típica UFV 536; 9 - Catuaí IAC 15; 10 - Catuaí IAC 44; 11 - Catuaí IAC 99; 12 - Catuaí IAC 81; 13 - Catuaí IAC 86; 14 - Catuaí IAC 47; 15 - Catuaí IAC 113; 16 - Mundo Novo IAC 464-18; 17 - Mundo Novo IAC 515-3; 18 - Mundo Novo IAC 376-4-32; 19 - Mundo Novo IAC 388-17-16; 20 - Mundo Novo IAC 376-4-22; 21 - Bourbon Amarelo UFV 535; 22 - Bourbon UFV 2952; 23 - Bourbon Vermelho UFV 2946; 24 - Bourbon Vermelho UFV 2947; 25 - Caturra CIFC 19/1; 26 - Catimor UFV 395-141; 27 - Catimor UFV 386-19; 28 - Catimor UFV 1310; 29 - Catimor UFV 1359; 30 - Catimor UFV 2983; 31 - H 484-2; 32 - H 415-3; 33 - Mundindu UFV 315-76; 34 - Cachimor UFV 351-13; 35 - Cavimor UFV 357-4; 36 - San Ramon UFV 3094 e 37 - Airi UFV 3095.

A análise de agrupamento baseada nos complementos aritméticos de Jaccard, utilizando o método UPGMA em torno de 19% de distância genética (Figura 2), definiu seis grupos: grupo A, com um genótipo (*C. racemosa*); grupo B, com um genótipo (*C. canephora*); grupo C, com um genótipo (UFV 557-3); grupo D, com um genótipo (*C. congensis*); grupo E, com um genótipo (Híbrido de Timor em geração F<sub>1</sub> CIFC 4106); e grupo F com os 35 genótipos restantes. A espécie mais distante de *C. arabica* foi *C. racemosa*, seguida por *C. canephora* e *C. congensis*. Esta ordem de distância está de acordo com publicações anteriores (Lashermes et al., 1995; Raina et al., 1998).

Tabela 3 - Matriz de distâncias genéticas expressas como complementos aritméticos dos coeficientes de Jaccard, e obtidas para 40 genótipos de cafeeiro, baseadas em 151 (acima da diagonal) e 314 (abaixo da diagonal) locos polimórficos de marcadores RAPD.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	-	0,907	0,946	0,705	0,88	0,894	0,873	0,884	0,874	0,891	0,878	0,881	0,877	0,88	0,876	0,863	0,87	0,873	0,873	0,873	0,867	0,882
2	0,912	-	0,609	0,402	0,377	0,302	0,275	0,302	0,275	0,254	0,258	0,269	0,226	0,242	0,277	0,261	0,265	0,275	0,25	0,275	0,242	0,29
3	0,923	0,626	-	0,759	0,722	0,738	0,731	0,756	0,734	0,733	0,733	0,747	0,753	0,719	0,733	0,72	0,739	0,731	0,731	0,731	0,716	0,742
4	0,752	0,435	0,728	-	0,393	0,351	0,349	0,347	0,349	0,346	0,358	0,325	0,348	0,338	0,354	0,337	0,333	0,349	0,329	0,349	0,308	0,361
5	0,919	0,42	0,716	0,434	-	0,213	0,206	0,226	0,257	0,261	0,265	0,25	0,259	0,25	0,231	0,191	0,212	0,206	0,232	0,206	0,235	0,194
6	0,907	0,329	0,714	0,407	0,319	-	0,038	0,04	0,074	0,057	0,077	0,057	0,071	0,058	0,041	0,056	0,057	0,038	0,038	0,038	0,038	0,057
7	0,898	0,312	0,714	0,376	0,333	0,096	-	0	0,067	0,068	0,069	0,052	0,064	0,052	0,018	0,017	0,051	0	0,034	0	0,034	0,017
8	0,899	0,31	0,71	0,374	0,342	0,081	0,016	-	0,073	0,057	0,077	0,056	0,068	0,058	0,02	0,019	0,057	0	0,038	0	0,038	0,019
9	0,898	0,32	0,724	0,39	0,363	0,131	0,055	0,055	-	0,034	0,069	0,018	0,022	0,018	0,018	0,082	0,018	0,067	0,034	0,067	0,034	0,083
10	0,9	0,329	0,719	0,39	0,37	0,121	0,076	0,061	0,039	-	0,07	0	0	0,018	0,019	0,083	0,035	0,068	0,034	0,068	0,035	0,085
11	0,902	0,342	0,704	0,397	0,373	0,131	0,085	0,07	0,079	0,054	-	0,054	0,022	0,054	0,056	0,085	0,053	0,069	0,035	0,069	0,036	0,086
12	0,9	0,318	0,713	0,381	0,36	0,108	0,061	0,046	0,024	0,015	0,054	-	0	0	0	0,068	0,018	0,052	0,018	0,052	0,018	0,069
13	0,9	0,318	0,706	0,39	0,35	0,135	0,061	0,061	0,024	0,045	0,069	0,031	-	0	0	0,064	0,022	0,064	0,022	0,064	0,022	0,085
14	0,9	0,318	0,713	0,381	0,36	0,108	0,061	0,046	0,024	0,015	0,054	0	0,031	-	0	0,068	0,018	0,052	0,018	0,052	0,018	0,069
15	0,9	0,314	0,711	0,377	0,356	0,115	0,069	0,053	0,031	0,038	0,077	0,023	0,038	0,023	-	0,036	0,019	0,018	0,018	0,018	0,019	0,036
16	0,892	0,309	0,709	0,371	0,344	0,104	0,04	0,024	0,048	0,054	0,063	0,039	0,054	0,039	0,047	-	0,067	0,017	0,05	0,017	0,051	0,034
17	0,898	0,312	0,714	0,376	0,344	0,109	0,016	0,031	0,04	0,061	0,07	0,046	0,046	0,046	0,054	0,024	-	0,051	0,017	0,051	0,018	0,068
18	0,898	0,312	0,714	0,376	0,344	0,109	0,016	0,031	0,04	0,061	0,07	0,046	0,046	0,046	0,054	0,024	0	-	0,034	0	0,034	0,017
19	0,897	0,322	0,72	0,382	0,346	0,119	0,024	0,04	0,048	0,07	0,079	0,055	0,055	0,055	0,063	0,032	0,008	0,008	-	0,034	0	0,051
20	0,9	0,32	0,717	0,375	0,348	0,106	0,008	0,024	0,041	0,063	0,071	0,048	0,048	0,048	0,056	0,025	0	0	0,008	-	0,034	0,017
21	0,898	0,312	0,714	0,376	0,344	0,109	0,016	0,031	0,04	0,061	0,07	0,046	0,046	0,046	0,054	0,024	0	0	0,008	0	-	0,052
22	0,903	0,318	0,719	0,391	0,34	0,103	0,024	0,039	0,063	0,083	0,093	0,069	0,069	0,069	0,076	0,048	0,024	0,024	0,032	0,025	0,024	-
23	0,899	0,316	0,708	0,389	0,348	0,102	0,024	0,039	0,063	0,083	0,092	0,068	0,068	0,068	0,076	0,047	0,024	0,024	0,032	0,024	0,024	0,016
24	0,902	0,367	0,731	0,406	0,356	0,151	0,092	0,092	0,123	0,147	0,158	0,133	0,133	0,133	0,141	0,115	0,107	0,107	0,116	0,103	0,107	0,115
25	0,902	0,367	0,724	0,406	0,346	0,151	0,092	0,092	0,123	0,147	0,144	0,133	0,119	0,133	0,141	0,115	0,107	0,107	0,116	0,103	0,107	0,115

1/: 1 - C. racemosa; 2 - C. congensis; 3 - C. canephora; 4 - UFV 557-3; 5 - H.Timor CIFC 4106; 6 - H.Timor CIFC 2234; 7 - Típica UFV 2945 (China); 8 - Típica UFV 536 (Portugal); 9 - Catuaí 15; 10 - Catuaí 44; 11 - Catuaí 99; 12 - Catuaí 81; 13 - Catuaí 30; 14 - Catuaí 86; 15 - Catuaí 47; 16 - Catuaí 113; 17 - M.Novo 464-18; 18 - M.Novo 515-3; 19 - M.Novo 376-4-32; 20 - M.Novo 388-17-16; 21 - M.Novo 376-4-22; 22 - Bourbon UFV 535; 23 - Bourbon UFV 2952; 24 - Bourbon UFV 2946; 25 - Bourbon UFV 2947; 26 - Caturra CIFC 19/1; 27 - Catimor UFV 395-141; 28 - Catimor UFV 386-19; 29 - Catimor UFV 1310; 30 - Catimor UFV 1359; 31 - Catimor UFV 2983; 32 - H 484-2; 33 - H 415-3; 34 - Mundindu; 35 - Cachimor; 36 - Cavimor; 37 - San Ramon; 38 - Airi; 39 - Purpuracens; 40 - H 843.

Tabela 3 - Cont.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2E	0,89	0,312	0,708	0,375	0,354	0,101	0,053	0,038	0,062	0,067	0,076	0,053	0,067	0,053	0,06	0,016	0,038	0,038	0,047	0,04	0,038	0,046
27	0,9	0,333	0,697	0,346	0,303	0,123	0,107	0,093	0,129	0,132	0,142	0,119	0,119	0,119	0,126	0,095	0,107	0,107	0,109	0,104	0,107	0,114
2E	0,897	0,308	0,697	0,349	0,304	0,113	0,067	0,06	0,083	0,088	0,104	0,074	0,081	0,074	0,088	0,046	0,067	0,067	0,069	0,062	0,067	0,075
2E	0,901	0,31	0,704	0,373	0,331	0,1	0,053	0,038	0,076	0,081	0,09	0,067	0,081	0,067	0,074	0,046	0,053	0,053	0,062	0,047	0,053	0,061
3C	0,901	0,321	0,697	0,335	0,3	0,166	0,096	0,109	0,132	0,149	0,159	0,136	0,136	0,136	0,143	0,098	0,096	0,096	0,098	0,092	0,096	0,104
31	0,899	0,331	0,684	0,372	0,341	0,156	0,115	0,101	0,123	0,127	0,137	0,113	0,113	0,113	0,121	0,068	0,101	0,101	0,097	0,104	0,101	0,109
32	0,896	0,323	0,708	0,341	0,278	0,192	0,152	0,151	0,174	0,189	0,187	0,176	0,15	0,176	0,183	0,134	0,152	0,152	0,149	0,15	0,152	0,173
33	0,903	0,323	0,695	0,365	0,313	0,145	0,102	0,088	0,11	0,101	0,096	0,087	0,101	0,087	0,108	0,075	0,088	0,088	0,09	0,091	0,088	0,109
34	0,893	0,338	0,715	0,389	0,358	0,129	0,054	0,054	0,092	0,111	0,114	0,097	0,083	0,097	0,104	0,078	0,069	0,069	0,078	0,056	0,069	0,077
3E	0,897	0,308	0,701	0,371	0,309	0,139	0,096	0,095	0,104	0,121	0,131	0,108	0,094	0,108	0,088	0,061	0,081	0,081	0,076	0,084	0,081	0,103
3E	0,904	0,329	0,688	0,352	0,288	0,13	0,114	0,1	0,136	0,139	0,149	0,126	0,126	0,126	0,106	0,102	0,114	0,114	0,117	0,111	0,114	0,135
37	0,899	0,305	0,708	0,379	0,348	0,088	0,024	0,008	0,047	0,053	0,063	0,038	0,053	0,038	0,046	0,016	0,024	0,024	0,032	0,024	0,024	0,031
3E	0,9	0,314	0,71	0,386	0,346	0,101	0,039	0,023	0,047	0,053	0,062	0,038	0,053	0,038	0,046	0,031	0,039	0,039	0,047	0,04	0,039	0,047
3E	0,903	0,329	0,725	0,391	0,34	0,13	0,039	0,054	0,048	0,069	0,093	0,054	0,054	0,054	0,062	0,048	0,024	0,024	0,032	0,025	0,024	0,047
4C	0,9	0,312	0,694	0,347	0,313	0,154	0,083	0,096	0,091	0,109	0,119	0,096	0,096	0,096	0,103	0,069	0,068	0,068	0,07	0,07	0,068	0,076

1/: 1 - C. racemosa; 2 - C. congensis; 3 - C. canephora; 4 - UFV 557-3; 5 - H.Timor CIFC 4106; 6 - H.Timor CIFC 2234; 7 - Típica UFV 2945 (China); 8 - Típica UFV 536 (Portugal); 9 - Catuaí 15; 10 - Catuaí 44; 11 - Catuaí 99; 12 - Catuaí 81; 13 - Catuaí 30; 14 - Catuaí 86; 15 - Catuaí 47; 16 - Catuaí 113; 17 - M.Novo 464-18; 18 - M.Novo 515-3; 19 - M.Novo 376-4-32; 20 - M.Novo 388-17-16; 21 - M.Novo 376-4-22; 22 - Bourbon UFV 535; 23 - Bourbon UFV 2952; 24 - Bourbon UFV 2946; 25 - Bourbon UFV 2947; 26 Caturra CIFC 19/1; 27 - Catimor UFV 395-141; 28 - Catimor UFV 386-19; 29 - Catimor UFV 1310; 30 - Catimor UFV 1359; 31 - Catimor UFV 2983; 32 - H 484-2; 33 - H 415-3; 34 - Mundindu; 35 - Cachimor; 36 - Cavimor; 37 - San Ramon; 38 - Airi; 39 - Purpuracens; 40 - H 843.

Tabela 3 - Cont.

Genótipos	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1	0,875	0,889	0,897	0,86	0,879	0,875	0,879	0,875	0,867	0,865	0,866	0,854	0,87	0,877	0,879	0,87	0,873	0,874
2	0,292	0,353	0,352	0,239	0,254	0,242	0,284	0,27	0,242	0,257	0,246	0,282	0,231	0,243	0,231	0,262	0,25	0,25
3	0,747	0,778	0,753	0,714	0,705	0,718	0,736	0,711	0,711	0,713	0,719	0,74	0,716	0,702	0,716	0,729	0,731	0,721
4	0,329	0,375	0,395	0,321	0,329	0,303	0,35	0,32	0,276	0,313	0,329	0,313	0,316	0,321	0,329	0,342	0,329	0,338
5	0,219	0,284	0,294	0,209	0,186	0,203	0,212	0,194	0,197	0,188	0,197	0,239	0,2	0,2	0,239	0,238	0,232	0,164
6	0,04	0,113	0,113	0,056	0,088	0,096	0,038	0,118	0,091	0,123	0,078	0,055	0,074	0,071	0,039	0,061	0,038	0,08
7	0	0,088	0,103	0,051	0,079	0,088	0	0,073	0,085	0,081	0,053	0,049	0,069	0,095	0,035	0,055	0,034	0,036
8	0	0,057	0,059	0,057	0,088	0,093	0	0,075	0,091	0,071	0,059	0,055	0,073	0,105	0,039	0,061	0,038	0,041
9	0,071	0,138	0,153	0,051	0,109	0,121	0,069	0,138	0,085	0,141	0,086	0,081	0,102	0,095	0,035	0,019	0,034	0,105
10	0,055	0,138	0,138	0,052	0,111	0,105	0,07	0,123	0,086	0,143	0,088	0,082	0,086	0,097	0,035	0,019	0,034	0,107
11	0,074	0,158	0,172	0,053	0,113	0,125	0,071	0,145	0,088	0,145	0,089	0,083	0,105	0,098	0,036	0,057	0,035	0,109
12	0,054	0,136	0,138	0,035	0,097	0,103	0,054	0,123	0,07	0,113	0,071	0,067	0,085	0,082	0,018	0	0,018	0,091
13	0,065	0,163	0,17	0,022	0,118	0,104	0,067	0,13	0,067	0,12	0,087	0,082	0,083	0,1	0,023	0	0,022	0,102
14	0,056	0,14	0,155	0,035	0,097	0,107	0,054	0,123	0,07	0,129	0,071	0,067	0,088	0,082	0,018	0	0,018	0,091
15	0,02	0,111	0,127	0,036	0,085	0,094	0,019	0,077	0,073	0,102	0,071	0,053	0,074	0,085	0,019	0	0,018	0,058
16	0,018	0,103	0,119	0,034	0,094	0,07	0,018	0,055	0,068	0,065	0,069	0,065	0,052	0,109	0,052	0,055	0,05	0,036
17	0,055	0,138	0,153	0,034	0,095	0,105	0,053	0,125	0,069	0,127	0,054	0,066	0,086	0,081	0,018	0,019	0,017	0,089
18	0	0,088	0,103	0,051	0,079	0,088	0	0,073	0,085	0,081	0,053	0,049	0,069	0,095	0,035	0,055	0,034	0,036
19	0,036	0,121	0,136	0,017	0,079	0,088	0,035	0,107	0,052	0,111	0,053	0,049	0,069	0,065	0	0,019	0	0,071
20	0	0,088	0,103	0,051	0,079	0,088	0	0,073	0,085	0,081	0,053	0,049	0,069	0,095	0,035	0,055	0,034	0,036
21	0,036	0,123	0,138	0,018	0,081	0,089	0,036	0,109	0,052	0,113	0,054	0,05	0,07	0,066	0	0,019	0	0,073
22	0,019	0,105	0,121	0,068	0,095	0,105	0,018	0,091	0,102	0,097	0,07	0,066	0,086	0,111	0,053	0,073	0,051	0,055
23	-	0,089	0,093	0,055	0,085	0,089	0	0,074	0,089	0,069	0,057	0,053	0,07	0,102	0,038	0,059	0,036	0,039
24	0,114	-	0	0,138	0,161	0,169	0,073	0,143	0,155	0,148	0,143	0,102	0,15	0,177	0,125	0,148	0,121	0,13
25	0,114	0,016	-	0,153	0,175	0,169	0,089	0,148	0,169	0,177	0,158	0,117	0,155	0,19	0,14	0,158	0,136	0,145

1/: 1 - C. racemosa; 2 - C. congensis; 3 - C. canephora; 4 - UFV 557-3; 5 - H.Timor CIFC 4106; 6 - H.Timor CIFC 2234; 7 - Típica UFV 2945 (China); 8 - Típica UFV 536 (Portugal); 9 - Catuaí 15; 10 - Catuaí 44; 11 - Catuaí 99; 12 - Catuaí 81; 13 - Catuaí 30; 14 - Catuaí 86; 15 - Catuaí 47; 16 - Catuaí 113; 17 - M.Novo 464-18; 18 - M.Novo 515-3; 19 - M.Novo 376-4-32; 20 - M.Novo 388-17-16; 21 - M.Novo 376-4-22; 22 - Bourbon UFV 535; 23 - Bourbon UFV 2952; 24 - Bourbon UFV 2946; 25 - Bourbon UFV 2947; 26 - Caturra CIFC 19/1; 27 - Catimor UFV 395-141; 28 - Catimor UFV 386-19; 29 - Catimor UFV 1310; 30 - Catimor UFV 1359; 31 - Catimor UFV 2983; 32 - H 484-2; 33 - H 415-3; 34 - Mundindu; 35 - Cachimor; 36 - Cavimor; 37 - San Ramon; 38 - Airi; 39 - Purpuracens; 40 - H 843.

Tabela 3 - Cont.

Genótipos	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
26	0,046	0,126	0,126	-	0,095	0,071	0,053	0,091	0,035	0,097	0,07	0,066	0,052	0,081	0,018	0,019	0,017	0,073
27	0,046	0,126	0,126	-	0,095	0,071	0,053	0,091	0,035	0,097	0,07	0,066	0,052	0,081	0,018	0,019	0,017	0,073
28	0,113	0,174	0,174	0,099	-	0,034	0,082	0,086	0,066	0,063	0,017	0,092	0,05	0,047	0,082	0,102	0,079	0,052
29	0,074	0,138	0,138	0,052	0,043	-	0,091	0,056	0,037	0,018	0,019	0,102	0,018	0,052	0,091	0,093	0,088	0,039
30	0,06	0,111	0,111	0,045	0,071	0,051	-	0,075	0,085	0,083	0,055	0,051	0,071	0,098	0,036	0,057	0,035	0,038
31	0,103	0,165	0,165	0,101	0,085	0,044	0,073	-	0,057	0,036	0,058	0,121	0,071	0,103	0,107	0,118	0,107	0,02
32	0,108	0,182	0,182	0,079	0,076	0,036	0,092	0,092	-	0,067	0,036	0,098	0,054	0,05	0,054	0,057	0,052	0,038
33	0,171	0,218	0,206	0,156	0,125	0,108	0,155	0,115	0,146	-	0,034	0,123	0,034	0,078	0,115	0,121	0,111	0,036
34	0,109	0,17	0,157	0,094	0,09	0,065	0,093	0,106	0,098	0,121	-	0,085	0,037	0,017	0,055	0,075	0,053	0,019
35	0,076	0,114	0,114	0,09	0,127	0,096	0,089	0,144	0,135	0,171	0,136	-	0,083	0,108	0,051	0,07	0,049	0,086
36	0,102	0,164	0,164	0,087	0,11	0,065	0,113	0,113	0,092	0,101	0,106	0,116	-	0,067	0,071	0,075	0,069	0,057
37	0,134	0,168	0,168	0,119	0,035	0,064	0,078	0,092	0,097	0,145	0,097	0,134	0,091	-	0,067	0,086	0,065	0,069
38	0,031	0,099	0,099	0,031	0,1	0,067	0,045	0,117	0,094	0,158	0,081	0,062	0,088	0,107	-	0,019	0	0,074
39	0,046	0,113	0,113	0,045	0,113	0,074	0,06	0,129	0,107	0,17	0,094	0,076	0,101	0,12	0,016	-	0,019	0,091
40	0,047	0,129	0,129	0,061	0,128	0,082	0,075	0,118	0,122	0,173	0,109	0,092	0,103	0,135	0,047	0,047	-	0,071
41	0,075	0,153	0,153	0,074	0,099	0,044	0,088	0,045	0,079	0,143	0,094	0,131	0,087	0,106	0,09	0,103	0,09	-

1/: 1 - C. racemosa; 2 - C. congensis; 3 - C. canephora; 4 - UFV 557-3; 5 - H.Timor CIFC 4106; 6 - H.Timor CIFC 2234; 7 - Típica UFV 2945 (China); 8 - Típica UFV 536 (Portugal); 9 - Catuaí 15; 10 - Catuaí 44; 11 - Catuaí 99; 12 - Catuaí 81; 13 - Catuaí 30; 14 - Catuaí 86; 15 - Catuaí 47; 16 - Catuaí 113; 17 - M.Novo 464-18; 18 - M.Novo 515-3; 19 - M.Novo 376-4-32; 20 - M.Novo 388-17-16; 21 - M.Novo 376-4-22; 22 - Bourbon UFV 535; 23 - Bourbon UFV 2952; 24 - Bourbon UFV 2946; 25 - Bourbon UFV 2947; 26 Caturra CIFC 19/1; 27 - Catimor UFV 395-141; 28 - Catimor UFV 386-19; 29 - Catimor UFV 1310; 30 - Catimor UFV 1359; 31 - Catimor UFV 2983; 32 - H 484-2; 33 - H 415-3; 34 - Mundindu; 35 - Cachimor; 36 - Cavimor; 37 - San Ramon; 38 - Airi; 39 - Purpuracens; 40 - H 843.



Considerando o limite de 9,5% de distância genética, o grupo F foi subdividido em três subgrupos: subgrupo F1, com dois genótipos (Bourbon Vermelho UFV 2947 e Bourbon Vermelho UFV 2946); subgrupo F2, com nove genótipos (H 484-2, H 843, Catimor UFV 2983, Catimor UFV 1359, Cachimor UFV 351-13, Cavimor 357-4, Catimor UFV 386-19, H 415-3 e Catimor UFV 395-141); e subgrupo F3 com os 24 genótipos restantes. Todos genótipos do subgrupo F2 são descendentes do Híbrido de Timor. O genótipo Catimor UFV 1310, que é a geração F<sub>4</sub> do cruzamento entre Caturra Vermelho CIFC 19/1 e Híbrido de Timor CIFC 832/1 ficou fora do grupo de descendentes do Híbrido de Timor, aproximando-se mais de seu ancestral Caturra Vermelho. O Híbrido de Timor, CIFC 2234 (UFV 376-52), originário da Tanzânia de seleções VCE 1587, com provável resistência a *Colletotricum kahawae* agente causal da doença “coffee berry” (CBD), foi agrupado com as cultivares comerciais de *C. arabica*, o que está de acordo com resultados obtidos por Fontes e colaboradores (2000). Este material tem fenótipo semelhante a Mundo Novo.

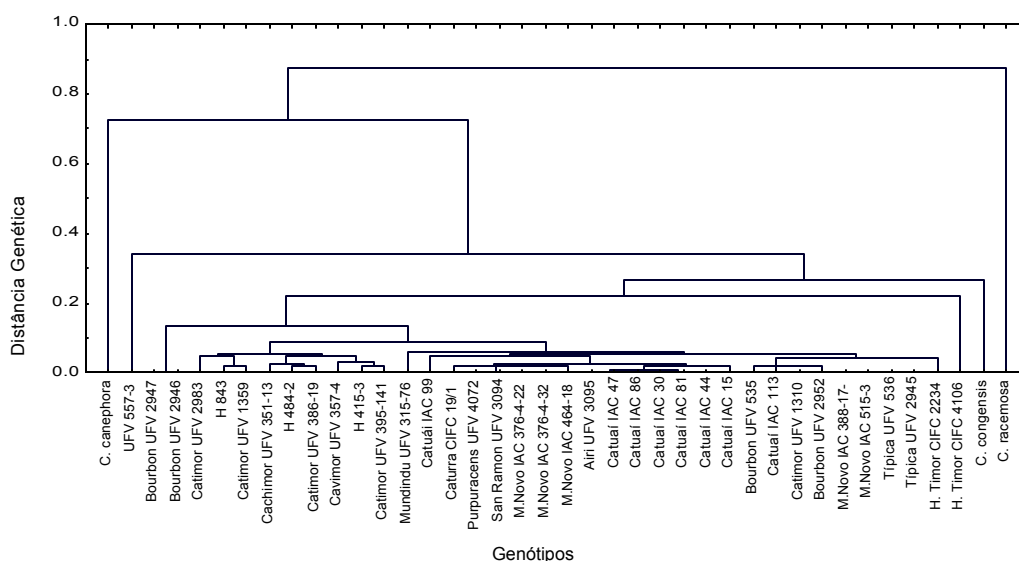


Figura 2 - Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas expressas em complementos de Jaccard, estimadas entre 40 genótipos de café e baseadas em 151 marcadores RAPD oriundos de 24 *primers*.

## Distâncias genéticas com base em 314 locos RAPD

Os 39 *primers*, utilizados na segunda amplificação, deram origem a 314 bandas polimórficas (média de 8,05 bandas por *primer*). Considerando-se apenas os acessos da espécie *C. arabica*, foram obtidas 64 (20,4%) bandas polimórficas.

As distâncias genéticas, obtidas para os 40 genótipos de cafeeiros, baseadas nas 314 bandas polimórficas (Tabela 3) variaram de 0% (entre os genótipos Mundo Novo IAC 515-3 e Mundo Novo IAC 388-17-16 ou Catuaí Vermelho IAC 81 e Catuaí Amarelo IAC 86, dentre outros pares) a 91% (entre as espécies *C. racemosa* e *C. canephora*).

Em torno de 19% de distância genética (Figura 3), os mesmos seis grupos que constam na Figura 2 foram definidos, porém houve uma mudança na posição de *C. congensis* e o Híbrido de Timor CIFIC 4106. No agrupamento apresentado na Figura 3, *C. congensis* ficou mais próximo do grupo de genótipos de origem arábica. Como a distância entre *C. congensis* e cafeeiros arábicos não é muito diferente da distância entre o Híbrido de Timor e cafeeiros arábicos, em torno de 30%, com a inclusão de marcadores houve alteração nas posições.

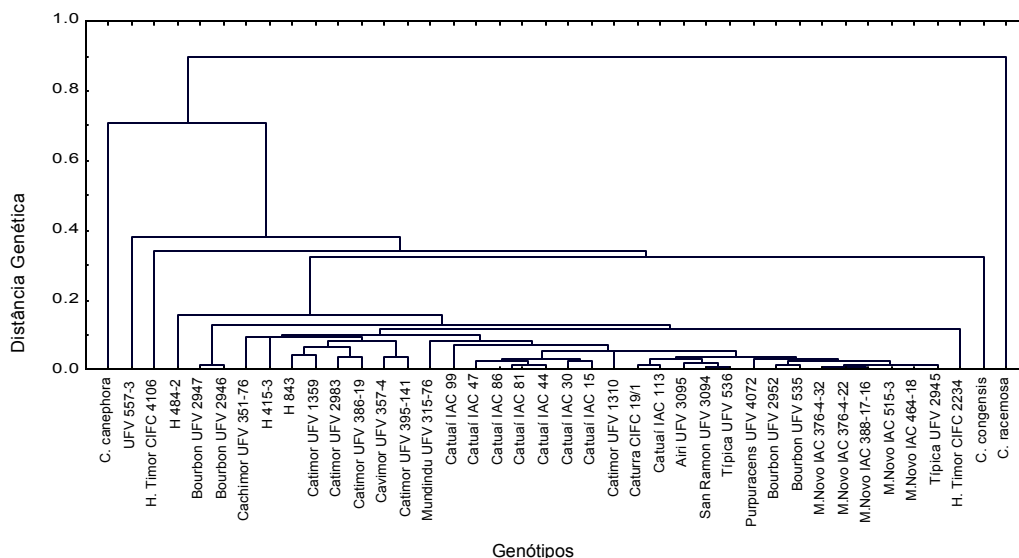


Figura 3 - Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas expressas em complementos de Jaccard, estimadas entre 40 genótipos de cafeeiro e baseadas em 314 marcadores RAPD oriundos de 39 *primers*.

Considerando um limite de 9,5% de distância genética, o grupo F foi subdividido em sete subgrupos: subgrupo F1, com um genótipo (H 484-2); subgrupo F2, com dois genótipos (Bourbon Vermelho UFV 2947 e Bourbon Vermelho UFV 2946); subgrupo F3, com um genótipo (Híbrido de Timor CIFC 2234); subgrupo F4, com um genótipo (Cachimor UFV 351-13); subgrupo F5, com um genótipo (H 415-3); subgrupo F6, com seis genótipos (H 843, Catimor UFV 1359, Catimor UFV 2983, Catimor UFV 386-19, Cavimor UFV 357-4 e Catimor UFV 395-141); e subgrupo F7 com os 23 genótipos restantes. Verifica-se que, com a inclusão de bandas polimórficas, o Híbrido de Timor CIFC 2234 foi separado do grupo de cultivares comerciais de *C. arabica*, enquanto o subgrupo F2 que consta na Figura 2 foi subdividido, originando os subgrupos F1, F4, F5 e F6 que constam na Figura 3. Todos genótipos do subgrupo F6 (Figura 3) são descendentes do cruzamento entre Caturra Vermelho CIFC 19/1 e Híbrido de Timor CIFC 832/1.

#### **Distâncias genéticas com base em 348 locos RAPD**

Considerando os produtos obtidos pelas ampliações com todos os 52 *primers* utilizados nas duas etapas de ampliações, tem-se 348 bandas polimórficas (média de 6,69 bandas por *primer*). Estas 348 bandas vieram de 73 bandas repetidas nas duas ampliações, 54 bandas da primeira amplificação e 221 bandas da segunda amplificação, sendo que, 66 (18,97%) bandas polimórficas foram obtidas entre os cafés arábicos. Portanto, verifica-se que o número total de marcadores polimórficos foi elevado; entretanto, dentro da espécie *C. arabica*, o polimorfismo foi baixo.

As distâncias genéticas obtidas para os 40 genótipos, baseadas nos 348 marcadores RAPD (Tabela 4), variaram de 0% (entre os genótipos Mundo Novo IAC 515-3 e Mundo Novo IAC 388-17-16 ou Catuaí Vermelho IAC 81 e Catuaí Amarelo IAC 86) a 93% (entre as espécies *C. racemosa* e *C. canephora*).

De acordo com o dendrograma (Figura 4), ao nível de 19% de distância genética foram definidos os mesmos seis grupos que constam na Figura 3. Considerando um limite de 9,5%, o grupo F foi subdividido em cinco subgrupos: subgrupo F1, com dois genótipos (Bourbon Vermelho UFV 2947 e Bourbon

Vermelho UFV 2946); subgrupo F2, com um genótipo (Híbrido de Timor CIFIC 2234); subgrupo F3, com dois genótipos (Cachimor UFV 351-13 e H 484-2); subgrupo F4, com sete genótipos (H 843, Catimor UFV 1359, Catimor UFV 2983, H 415-3, Catimor UFV 386-19, Cavimor UFV 357-4 e Catimor UFV 395-141); e subgrupo F5 com os 23 genótipos restantes. Os subgrupos F5 e F6, na Figura 3, foram reunidos no subgrupo F4 da Figura 4, ou seja, o híbrido H 415-3 voltou a fazer parte do subgrupo dos materiais descendentes do Híbrido de Timor. Houve também a formação de um subgrupo com os genótipos Cachimor UFV 351-13 (descendente do cruzamento entre Villa Sarchi CIFIC 971/10 e Híbrido de Timor CIFIC 832/2) e H 484-2, que também têm o Híbrido de Timor como ancestral. Dentro do subgrupo F5 (cafeeiros arábicos) existe bastante coerência na ordenação dos genótipos e, como estão muito próximos, não formam subgrupos. O genótipo Airi (de porte baixo), por exemplo, é seleção de San Ramon (segrega para porte). A cultivar Catuaí Amarelo IAC 113 ficou mais próxima das cultivares Mundo Novo do que das outras cultivares de Catuaí. Das cultivares de Catuaí utilizadas neste trabalho, esta é a única descendente da planta 12 (H2077-2-12-113), as outras são descendentes da planta cinco.

Os 23 genótipos do subgrupo F5, na Figura 4, estão próximos, confirmando a pequena variabilidade genética das variedades comerciais de café arábica, já relatada por outros autores (Lashermes et al., 1993; 1995; Orozco-Castillo et al., 1994; 1996). Verifica-se também a ampla diversidade genética entre as espécies do gênero *Coffea*, e uma relativamente ampla diversidade entre os genótipos originários do Híbrido de Timor, relatada também por Lashermes e colaboradores (2000).

Tabela 4 - Matriz de distâncias genéticas expressas como complementos aritméticos dos coeficientes de Jaccard, e obtidas para 40 genótipos de cafeeiro, baseadas em 151 (acima da diagonal) e 314 (abaixo da diagonal) locos polimórficos de marcadores RAPD.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	-	0,921	0,931	0,764	0,92	0,918	0,906	0,909	0,904	0,906	0,908	0,907	0,905	0,907	0,908	0,9	0,906	0,906	0,904	0,908	0,905	0,91
2	0,906	-	0,639	0,417	0,401	0,315	0,291	0,301	0,296	0,299	0,307	0,293	0,291	0,293	0,296	0,294	0,285	0,291	0,29	0,298	0,287	0,297
3	0,946	0,556	-	0,742	0,73	0,729	0,726	0,722	0,733	0,729	0,726	0,724	0,72	0,724	0,722	0,721	0,728	0,726	0,732	0,729	0,725	0,731
4	0,673	0,457	0,759	-	0,42	0,392	0,368	0,366	0,371	0,366	0,369	0,361	0,368	0,361	0,366	0,36	0,363	0,368	0,366	0,368	0,349	0,382
5	0,9	0,436	0,708	0,455	-	0,286	0,297	0,306	0,331	0,333	0,351	0,328	0,322	0,328	0,322	0,302	0,316	0,306	0,318	0,31	0,312	0,302
6	0,894	0,343	0,689	0,452	0,281	-	0,085	0,078	0,127	0,11	0,113	0,103	0,124	0,103	0,107	0,099	0,104	0,098	0,106	0,094	0,092	0,092
7	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	-	0,007	0,058	0,069	0,071	0,063	0,056	0,063	0,043	0,029	0,035	0,014	0,036	0,007	0,022	0,022
8	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	-	0,065	0,064	0,066	0,057	0,064	0,057	0,037	0,022	0,043	0,022	0,044	0,015	0,029	0,029
9	0,896	0,361	0,723	0,465	0,353	0,107	0,074	0,074	-	0,029	0,059	0,022	0,015	0,022	0,015	0,058	0,036	0,043	0,037	0,045	0,036	0,065
10	0,894	0,343	0,717	0,452	0,333	0,074	0,038	0,038	0,037	-	0,029	0,007	0,028	0,007	0,015	0,057	0,049	0,056	0,05	0,058	0,049	0,076
11	0,889	0,353	0,705	0,463	0,344	0,077	0,04	0,04	0,111	0,077	-	0,036	0,058	0,036	0,044	0,058	0,05	0,058	0,051	0,058	0,051	0,079
12	0,894	0,343	0,717	0,452	0,333	0,074	0,038	0,038	0,037	0	0,077	-	0,021	0	0,007	0,05	0,042	0,049	0,043	0,05	0,042	0,069
13	0,894	0,343	0,717	0,452	0,333	0,074	0,038	0,038	0,037	0	0,077	0	-	0,021	0,015	0,057	0,035	0,043	0,036	0,044	0,036	0,063
14	0,894	0,343	0,717	0,452	0,333	0,074	0,038	0,038	0,037	0	0,077	0	0	-	0,007	0,05	0,042	0,049	0,043	0,05	0,042	0,069
15	0,894	0,343	0,717	0,452	0,333	0,074	0,038	0,038	0,037	0	0,077	0	0	0	-	0,03	0,036	0,029	0,037	0,03	0,036	0,051
16	0,87	0,294	0,689	0,415	0,281	0,074	0,038	0,038	0,107	0,074	0,077	0,074	0,074	0,074	0,074	-	0,036	0,015	0,036	0,015	0,036	0,036
17	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	0	0,074	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	-	0,021	0,015	0,022	0,014	0,043
18	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	0	0,074	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0	-	0,022	0	0,022	0,022
19	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	0	0,074	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0	0	-	0,023	0,015	0,043
20	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	0	0,074	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0	0	0	-	0,015	0,022
21	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	0	0,074	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0	0	0	0	-	0,043
22	0,913	0,353	0,733	0,463	0,29	0,077	0,04	0,04	0,111	0,077	0,08	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	-
23	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	0	0,074	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0	0	0	0	0	0,04
24	0,891	0,371	0,739	0,439	0,364	0,111	0,077	0,077	0,143	0,111	0,115	0,111	0,111	0,111	0,111	0,111	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,115
25	0,891	0,371	0,739	0,439	0,364	0,111	0,077	0,077	0,143	0,111	0,115	0,111	0,111	0,111	0,111	0,111	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,115

1/: 1 - C. racemosa; 2 - C. congensis; 3 - C. canephora; 4 - UFV 557-3; 5 - H.Timor CIFC 4106; 6 - H.Timor CIFC 2234; 7 - Típica UFV 2945 (China); 8 - Típica UFV 536 (Portugal); 9 - Catuaí 15; 10 - Catuaí 44; 11 - Catuaí 99; 12 - Catuaí 81; 13 - Catuaí 30; 14 - Catuaí 86; 15 - Catuaí 47; 16 - Catuaí 113; 17 - M.Novo 464-18; 18 - M.Novo 515-3; 19 - M.Novo 376-4-32; 20 - M.Novo 388-17-16; 21 - M.Novo 376-4-22; 22 - Bourbon UFV 535; 23 - Bourbon UFV 2952; 24 - Bourbon UFV 2946; 25 - Bourbon UFV 2947; 26 Caturra CIFC 19/1; 27 - Catimor UFV 395-141; 28 - Catimor UFV 386-19; 29 - Catimor UFV 1310; 30 - Catimor UFV 1359; 31 - Catimor UFV 2983; 32 - H 484-2; 33 - H 415-3; 34 - Mundindu; 35 - Cachimor; 36 - Cavimor; 37 - San Ramon; 38 - Airi; 39 - Purpuracens; 40 - H 843.

Tabela 4 - Cont.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
26	0,87	0,294	0,689	0,415	0,281	0,074	0,038	0,038	0,107	0,074	0,077	0,074	0,074	0,074	0,074	0	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0,077
27	0,898	0,286	0,674	0,405	0,273	0,138	0,107	0,107	0,167	0,138	0,143	0,138	0,138	0,138	0,138	0,138	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,143
28	0,878	0,257	0,652	0,381	0,242	0,167	0,138	0,138	0,194	0,167	0,172	0,167	0,167	0,167	0,167	0,103	0,138	0,138	0,138	0,138	0,138	0,138	0,172
29	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	0	0,074	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0	0	0	0	0	0	0,04
30	0,872	0,314	0,696	0,35	0,25	0,172	0,143	0,143	0,2	0,172	0,179	0,172	0,172	0,172	0,172	0,107	0,143	0,143	0,143	0,143	0,143	0,143	0,179
31	0,875	0,286	0,674	0,366	0,219	0,138	0,107	0,107	0,167	0,138	0,143	0,138	0,138	0,138	0,138	0,071	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,143
32	0,875	0,286	0,674	0,366	0,273	0,2	0,172	0,172	0,226	0,2	0,207	0,2	0,2	0,2	0,2	0,138	0,172	0,172	0,172	0,172	0,172	0,172	0,207
33	0,898	0,286	0,674	0,405	0,273	0,138	0,107	0,107	0,167	0,138	0,143	0,138	0,138	0,138	0,138	0,138	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,143
34	0,87	0,343	0,717	0,415	0,333	0,074	0,038	0,038	0,107	0,074	0,077	0,074	0,074	0,074	0,074	0,074	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0,077
35	0,875	0,235	0,644	0,405	0,273	0,138	0,107	0,107	0,167	0,138	0,143	0,138	0,138	0,138	0,138	0,071	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,143
36	0,9	0,306	0,652	0,419	0,242	0,103	0,138	0,138	0,194	0,167	0,172	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167	0,138	0,138	0,138	0,138	0,138	0,138	0,172
37	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	0	0,074	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0	0	0	0	0	0	0,04
38	0,894	0,343	0,717	0,452	0,333	0,074	0,038	0,038	0,037	0	0,077	0	0	0	0	0,074	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0,077
39	0,891	0,324	0,711	0,439	0,313	0,038	0	0	0,074	0,038	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0	0	0	0	0	0	0,04
40	0,875	0,286	0,674	0,366	0,219	0,138	0,107	0,107	0,167	0,138	0,143	0,138	0,138	0,138	0,138	0,071	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,107	0,143

1/: 1 - C. racemosa; 2 - C. congensis; 3 - C. canephora; 4 - UFV 557-3; 5 - H.Timor CIFC 4106; 6 - H.Timor CIFC 2234; 7 - Típica UFV 2945 (China); 8 - Típica UFV 536 (Portugal); 9 - Catuaí 15; 10 - Catuaí 44; 11 - Catuaí 99; 12 - Catuaí 81; 13 - Catuaí 30; 14 - Catuaí 86; 15 - Catuaí 47; 16 - Catuaí 113; 17 - M.Novo 464-18; 18 - M.Novo 515-3; 19 - M.Novo 376-4-32; 20 - M.Novo 388-17-16; 21 - M.Novo 376-4-22; 22 - Bourbon UFV 535; 23 - Bourbon UFV 2952; 24 - Bourbon UFV 2946; 25 - Bourbon UFV 2947; 26 Caturra CIFC 19/1; 27 - Catimor UFV 395-141; 28 - Catimor UFV 386-19; 29 - Catimor UFV 1310; 30 - Catimor UFV 1359; 31 - Catimor UFV 2983; 32 - H 484-2; 33 - H 415-3; 34 - Mundindu; 35 - Cachimor; 36 - Cavimor; 37 - San Ramon; 38 - Airi; 39 - Purpuracens; 40 - H 843.

Tabela 4 - Cont.

Genótipos	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1	0,905	0,913	0,916	0,897	0,911	0,907	0,911	0,908	0,907	0,911	0,906	0,897	0,904	0,911	0,906	0,909	0,906	0,908
2	0,297	0,365	0,361	0,289	0,303	0,282	0,299	0,308	0,312	0,289	0,299	0,314	0,284	0,299	0,28	0,293	0,291	0,292
3	0,719	0,745	0,738	0,717	0,705	0,7	0,718	0,709	0,697	0,717	0,712	0,724	0,707	0,697	0,72	0,716	0,732	0,709
4	0,376	0,406	0,404	0,358	0,342	0,339	0,363	0,339	0,349	0,335	0,349	0,361	0,361	0,338	0,36	0,37	0,368	0,342
5	0,312	0,329	0,329	0,32	0,27	0,277	0,295	0,273	0,316	0,243	0,293	0,318	0,276	0,266	0,316	0,322	0,316	0,277
6	0,092	0,158	0,154	0,097	0,124	0,11	0,096	0,16	0,151	0,173	0,13	0,116	0,132	0,131	0,085	0,105	0,111	0,141
7	0,022	0,098	0,093	0,056	0,098	0,068	0,042	0,095	0,114	0,122	0,083	0,049	0,081	0,105	0,029	0,05	0,043	0,075
8	0,029	0,093	0,088	0,05	0,093	0,07	0,035	0,103	0,108	0,13	0,077	0,057	0,089	0,1	0,022	0,043	0,05	0,083
9	0,065	0,141	0,137	0,057	0,125	0,09	0,085	0,135	0,116	0,162	0,098	0,091	0,096	0,119	0,043	0,036	0,029	0,09
10	0,076	0,161	0,158	0,056	0,122	0,088	0,082	0,145	0,113	0,17	0,082	0,101	0,106	0,116	0,042	0,035	0,042	0,101
11	0,079	0,166	0,162	0,057	0,125	0,097	0,085	0,149	0,116	0,174	0,085	0,097	0,109	0,119	0,043	0,051	0,058	0,103
12	0,069	0,154	0,151	0,049	0,115	0,082	0,075	0,138	0,107	0,163	0,075	0,095	0,099	0,11	0,035	0,028	0,035	0,094
13	0,063	0,15	0,146	0,056	0,11	0,082	0,083	0,133	0,101	0,147	0,096	0,076	0,081	0,105	0,043	0,036	0,029	0,088
14	0,069	0,154	0,151	0,049	0,115	0,082	0,075	0,138	0,107	0,163	0,075	0,095	0,099	0,11	0,035	0,028	0,035	0,094
15	0,051	0,14	0,136	0,043	0,107	0,077	0,057	0,116	0,103	0,15	0,083	0,085	0,09	0,107	0,029	0,022	0,029	0,077
16	0,036	0,126	0,121	0,029	0,093	0,056	0,043	0,09	0,077	0,111	0,064	0,077	0,056	0,1	0,029	0,05	0,043	0,056
17	0,043	0,13	0,126	0,035	0,104	0,075	0,063	0,114	0,095	0,14	0,069	0,069	0,074	0,098	0,021	0,043	0,021	0,082
18	0,022	0,111	0,106	0,042	0,098	0,068	0,042	0,095	0,101	0,122	0,069	0,063	0,068	0,105	0,029	0,05	0,029	0,062
19	0,043	0,133	0,129	0,036	0,1	0,07	0,064	0,11	0,084	0,131	0,071	0,07	0,063	0,094	0,022	0,043	0,022	0,077
20	0,022	0,108	0,103	0,043	0,095	0,064	0,036	0,092	0,104	0,119	0,071	0,05	0,07	0,101	0,029	0,051	0,029	0,064
21	0,043	0,118	0,113	0,035	0,092	0,062	0,049	0,102	0,095	0,128	0,076	0,056	0,075	0,086	0,022	0,043	0,022	0,082
22	0,014	0,118	0,113	0,049	0,105	0,075	0,049	0,102	0,108	0,141	0,09	0,069	0,088	0,123	0,036	0,057	0,05	0,069
23	-	0,118	0,113	0,049	0,105	0,075	0,049	0,102	0,107	0,141	0,09	0,069	0,088	0,123	0,036	0,057	0,05	0,069
24	0,077	-	0,008	0,149	0,184	0,159	0,116	0,167	0,195	0,209	0,173	0,129	0,17	0,178	0,124	0,144	0,137	0,153
25	0,077	0	-	0,145	0,181	0,153	0,112	0,163	0,192	0,207	0,17	0,125	0,167	0,175	0,12	0,138	0,133	0,15

1/: 1 - *C. racemosa*; 2 - *C. congensis*; 3 - *C. canephora*; 4 - UFV 557-3; 5 - H.Timor CIFC 4106; 6 - H.Timor CIFC 2234; 7 - Típica UFV 2945 (China); 8 - Típica UFV 536 (Portugal); 9 - Catuaí 15; 10 - Catuaí 44; 11 - Catuaí 99; 12 - Catuaí 81; 13 - Catuaí 30; 14 - Catuaí 86; 15 - Catuaí 47; 16 - Catuaí 113; 17 - M.Novo 464-18; 18 - M.Novo 515-3; 19 - M.Novo 376-4-32; 20 - M.Novo 388-17-16; 21 - M.Novo 376-4-22; 22 - Bourbon UFV 535; 23 - Bourbon UFV 2952; 24 - Bourbon UFV 2946; 25 - Bourbon UFV 2947; 26 Caturra CIFC 19/1; 27 - Catimor UFV 395-141; 28 - Catimor UFV 386-19; 29 - Catimor UFV 1310; 30 - Catimor UFV 1359; 31 - Catimor UFV 2983; 32 - H 484-2; 33 - H 415-3; 34 - Mundindu; 35 - Cachimor; 36 - Cavimor; 37 - San Ramon; 38 - Airí; 39 - Purpuracens; 40 - H 843.

Tabela 4 - Cont.

Genótipos	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
26	0,038	0,111	0,111	-	0,097	0,062	0,056	0,107	0,075	0,146	0,082	0,088	0,08	0,104	0,028	0,049	0,042	0,075
27	0,107	0,172	0,172	0,138	-	0,033	0,072	0,084	0,078	0,11	0,066	0,115	0,083	0,032	0,098	0,117	0,11	0,09
28	0,138	0,2	0,2	0,103	0,034	-	0,062	0,054	0,048	0,088	0,049	0,094	0,047	0,053	0,075	0,088	0,075	0,048
29	0	0,077	0,077	0,038	0,107	0,138	-	0,068	0,099	0,133	0,082	0,088	0,106	0,079	0,056	0,076	0,069	0,075
30	0,143	0,207	0,207	0,107	0,103	0,069	0,143	-	0,1	0,095	0,095	0,138	0,105	0,091	0,121	0,14	0,121	0,048
31	0,107	0,172	0,172	0,071	0,069	0,034	0,107	0,036	-	0,138	0,088	0,132	0,086	0,084	0,088	0,108	0,101	0,081
32	0,172	0,233	0,233	0,138	0,069	0,034	0,172	0,036	0,069	-	0,095	0,151	0,068	0,116	0,147	0,166	0,147	0,113
33	0,107	0,172	0,172	0,138	0	0,034	0,107	0,103	0,069	0,069	-	0,121	0,074	0,066	0,069	0,09	0,083	0,075
34	0,038	0,038	0,038	0,074	0,138	0,167	0,038	0,172	0,138	0,2	0,138	-	0,099	0,122	0,063	0,083	0,076	0,119
35	0,107	0,172	0,172	0,071	0,069	0,034	0,107	0,103	0,069	0,069	0,069	0,138	-	0,09	0,081	0,101	0,081	0,073
36	0,138	0,2	0,2	0,167	0,034	0,067	0,138	0,133	0,1	0,1	0,034	0,167	0,1	-	0,092	0,111	0,105	0,097
37	0	0,077	0,077	0,038	0,107	0,138	0	0,143	0,107	0,172	0,107	0,038	0,107	0,138	-	0,022	0,029	0,088
38	0,038	0,111	0,111	0,074	0,138	0,167	0,038	0,172	0,138	0,2	0,138	0,074	0,138	0,167	0,038	-	0,036	0,108
39	0	0,077	0,077	0,038	0,107	0,138	0	0,143	0,107	0,172	0,107	0,038	0,107	0,138	0	0,038	-	0,088
40	0,107	0,172	0,172	0,071	0,069	0,034	0,107	0,036	0	0,069	0,069	0,138	0,069	0,1	0,107	0,138	0,107	-

1/: 1 - C. racemosa; 2 - C. congensis; 3 - C. canephora; 4 - UFV 557-3; 5 - H.Timor CIFC 4106; 6 - H.Timor CIFC 2234; 7 - Típica UFV 2945 (China); 8 - Típica UFV 536 (Portugal); 9 - Catuaí 15; 10 - Catuaí 44; 11 - Catuaí 99; 12 - Catuaí 81; 13 - Catuaí 30; 14 - Catuaí 86; 15 - Catuaí 47; 16 - Catuaí 113; 17 - M.Novo 464-18; 18 - M.Novo 515-3; 19 - M.Novo 376-4-32; 20 - M.Novo 388-17-16; 21 - M.Novo 376-4-22; 22 - Bourbon UFV 535; 23 - Bourbon UFV 2952; 24 - Bourbon UFV 2946; 25 - Bourbon UFV 2947; 26 Caturra CIFC 19/1; 27 - Catimor UFV 395-141; 28 - Catimor UFV 386-19; 29 - Catimor UFV 1310; 30 - Catimor UFV 1359; 31 - Catimor UFV 2983; 32 - H 484-2; 33 - H 415-3; 34 - Mundindu; 35 - Cachimor; 36 - Cavimor; 37 - San Ramon; 38 - Airi; 39 - Purpuracens; 40 - H 843.

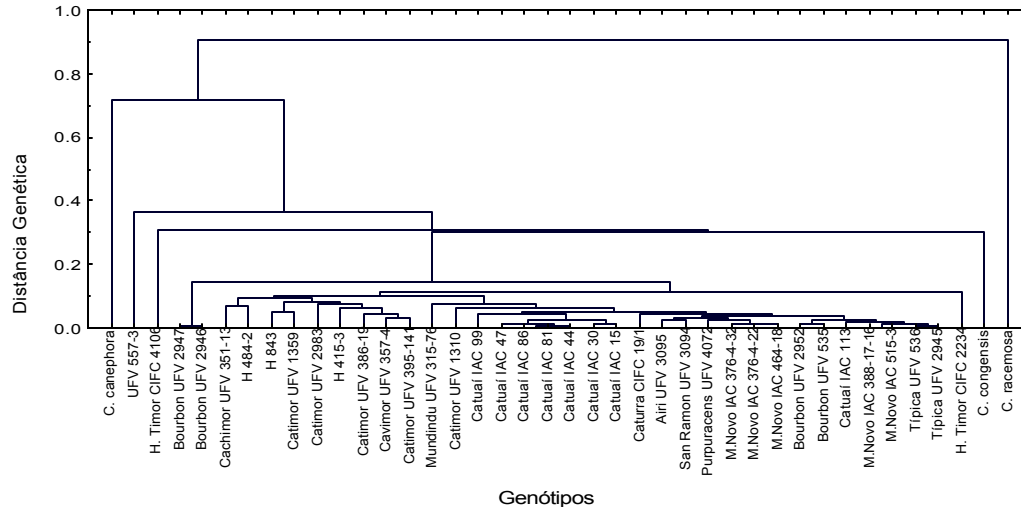


Figura 4 - Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas expressas em complementos de Jaccard, estimadas entre 40 genótipos de cafeeiro e baseadas em 348 marcadores RAPD oriundos de 52 *primers*.

### Distâncias genéticas com base em 73 locos RAPD

Dos 24 *primers* utilizados na primeira etapa de ampliações, 11 foram utilizados na segunda. Esses 11 *primers* geraram 97 bandas polimórficas (média de 8,82 bandas por *primer*) na primeira etapa de ampliações, das quais 73 repetiram os resultados, na segunda etapa de ampliações, para todos os 40 genótipos, o que representou 75,26% de bandas polimórficas repetidas. Dos 39 *primers* utilizados na segunda etapa de ampliações, os 11 que foram utilizados nas duas etapas de ampliações geraram 93 bandas polimórficas (média de 8,45 bandas por *primer*). Dessas 93 bandas, 73 repetiram na primeira etapa de ampliações, o que representou 78,49% de bandas polimórficas repetidas. Portanto, a reprodutibilidade média dos marcadores RAPD polimórficos foi 76,88%. Este valor está próximo àquele obtido por Skroch e Nienhuis (1995), que encontraram 76% para marcadores RAPD em *Phaseolus vulgaris* L.

As distâncias genéticas obtidas para os 40 genótipos de cafeeiro, baseadas nas 73 bandas polimórficas repetidas nas duas reações de amplificação (Tabela 4), variaram de 0% (entre os genótipos Mundo Novo IAC 515-3 e Mundo Novo IAC 388-17-16 e entre Catuai Vermelho IAC 81 e Catuai

Amarelo IAC 86, dentre outros pares) a 95% (entre as espécies *C. racemosa* e *C. canephora*).

Analisando o dendrograma (Figura 5), ao nível de 19% de distância genética, seis grupos foram definidos, os mesmos da Figura 2. Considerando o limite de 9,5% de distância genética, o grupo F foi subdividido em dois subgrupos: o subgrupo F1, com nove genótipos (H 484-2, H 843, Catimor UFV 2983, Catimor UFV 1359, Cachimor UFV 351-13, Cavimor 357-4, Catimor UFV 386-19, H 415-3 e Catimor UFV 395-141), e o subgrupo F2 com os 26 genótipos restantes. Os subgrupos F1 e F3, na Figura 2, correspondem ao subgrupo F2 na Figura 5; portanto, com a inclusão de bandas polimórficas, foi possível separar os genótipos Bourbon Vermelho UFV 2947 e Bourbon Vermelho UFV 2946 do subgrupo das cultivares comerciais de arábica. As 73 bandas polimórficas foram suficientes para diferenciar Catuaí de Mundo Novo, mas não distinguiram linhagens dentro de cada uma dessas cultivares. Utilizando apenas as 73 bandas repetidas, a ordenação dos genótipos dentro do subgrupo F2 foi mais coerente com a genealogia do que a ordenação dentro do subgrupo F3 utilizando-se as 150 bandas. Isto pode ser visto no dendrograma (Figura 5) para os genótipos Típica Vermelho UFV 2945 e Típica Vermelho UFV 536 e cultivares de Mundo Novo.

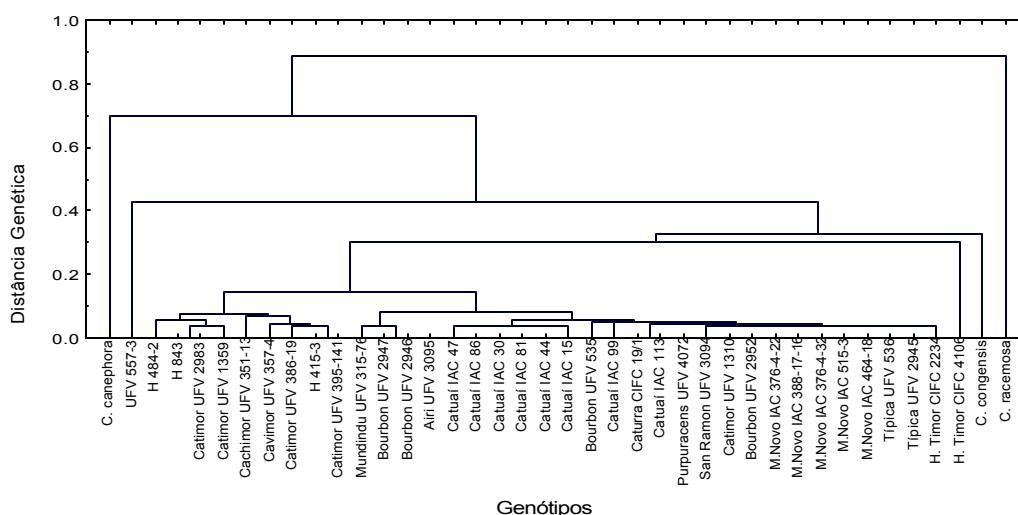


Figura 5 - Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas expressas em complementos de Jaccard, estimadas entre 40 genótipos de café e baseadas em 73 marcadores RAPD oriundos de 11 *primers*, com duas repetições.

## **CONCLUSÕES**

A reprodutibilidade média de marcadores RAPD foi 76,88%.

O número de locos não influenciou a formação dos grupos principais, mas influenciou a formação de subgrupos e a ordenação dos acessos dentro dos subgrupos.

A avaliação de distâncias genéticas entre grupos genealogicamente distintos pode ser efetuada por marcadores RAPD sem repetição, desde que sejam identificados marcadores em número suficiente para tal.

A obtenção de dados com repetição deve ser considerada na avaliação de distâncias genéticas dentro de grupo de genótipos genealogicamente próximos, especialmente quando o número de marcadores polimórficos for baixo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A. and CREGAN, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*. 132:1131-1139.
- BERTHOU, F. and TROUSLOT, P. 1977. L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea*: adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série. p.373-383. In: Proceedings Colloque ASIC, 8<sup>th</sup>, Abidjan, 1977.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.H. et al. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Human Genet.* 32:314-331.
- CRUZ, C.D. 1997. Programa Genes - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Editora UFV, Viçosa.
- DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.
- FONTES, J.R.; SAKIYAMA, N.S.; CARDOSO, A.A. et al. 2000. Avaliação de híbridos F<sub>1</sub> de café (*Coffea arabica* L.) e respectivos genitores, com marcadores RAPD. p.160-163. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 1., 2000, Poços de Caldas, MG. Resumos expandidos.../ Brasília; Embrapa Café e MINASPLAN. v.1.
- FUENTES, J.L.; ESCOBAR, F.; ALVAREZ, A. et al. 1999. Analyses of genetic diversity in cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers. *Euphytica*. 109:107-115.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes el des Jura. 1901. *Bull Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 37:547-579.

- LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B. et al. 2000. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). *Theoretical Applied Genetics*. 100:139-146.
- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; CROS, J. et al. 1995. Origin and genetic diversity of *Coffea arabica* L. based on DNA molecular markers. *Agronomie*. 528-536.
- LASHERMES, P.; CROS, J.; MARMEY, P. and CHARRIER, A. 1993. Use of random amplified DNA markers to analyse variability and relationships of *Coffea* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 40:91-99.
- MEDINA-FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; SONDAHL, M.R. et al. 1984. Coffee breeding and related evolutionary aspects. In: JANICK, J. (ed.) *Plant breeding reviews*. AVI, V.2. p. 157-193.
- MONTAGNON, C. and BOUHARMONT, P. 1996. Multivariate analysis of phenotypic diversity of *Coffea arabica*. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 43:221-227.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R and POWEL, W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theoretical Applied Genetics*. 87:934-940.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; POWEL, W. and WAUGH, R. 1996. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. *Plant Cell Reports*. 15:337-341.
- PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M. et al. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theoretical Applied Genetics*. 97:1248-1255.
- RAINA, S.N.; MUKAI, Y. and YAMAMOTO, M. 1998. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theoretical Applied Genetics*. 97:1204-1209.
- SANCHEZ, H.M.P.; DAVILA, J.A.; LOARCE, Y. and FERRER, E. 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome*. 39:112-117.
- SKROCH, P. and NIENHUIS, J. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theoretical Applied Genetics*. 91:1086-1091.
- STRUSS, D. and PLIESKE, J. 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theoretical Applied Genetics*. 97:308-315.

THORMANN, C.E. and OSBORN, T.C. 1992. Use of RAPD & RFLP markers for germplasm evaluation. In: Symposium Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, 1992, Minneapolis. Proceedings of the Symposium on Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Crop Science Society of America, American Society for Horticultural Science, American Genetic Association. p. 9-11.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6535.

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CLONES DE CAFEEIROS DIFERENCIADORES DE *Hemileia vastatrix* BERK. ET BR.

### RESUMO

A caracterização molecular de clones diferenciadores de raças de *Hemileia vastatrix* facilita e garante a manutenção da identidade genética destes clones, o que é importante para a identificação de raças do patógeno. Para a caracterização molecular, estimação das distâncias genéticas e comparação com a origem genealógica de 18 clones de cafeeiros diferenciadores, do programa de melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, foram utilizados 35 *primers* da Operon Technologies, Inc. Os 35 *primers* identificaram 158 locos polimórficos, marcadores RAPD. O agrupamento com base na matriz de valores de dissimilaridades genéticas foi compatível com as informações disponíveis na literatura sobre a origem genealógica. Foram identificados marcadores específicos para vários clones, e a combinação de 12 marcadores RAPD permitiu a identificação dos clones estudados.

Palavras indexadas: café, *Coffea*, RAPD, ferrugem-do-cafeeiro, clones diferenciadores.

## INTRODUÇÃO

O fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., causador da ferrugem alaranjada do cafeeiro, apresenta grande variabilidade, tendo já sido caracterizadas mais de 30 raças fisiológicas (Mayne, 1932; D'Oliveira, 1954-57; Reyes, 1957; D'Oliveira e Rodrigues, 1960; Rodrigues Jr et al., 1975; Lopes e Godinho, 1976; Zambolim et al., 1997), várias delas ocorrendo no Brasil (Cardoso et al., 1981; Cardoso et al., 1988).

De acordo com estudo genético sobre o comportamento das progênies de plantas de *Coffea arabica* L. e de híbridos interespecíficos, quando inoculadas com raças fisiológicas de *H. vastatrix*, foi possível identificar nove genes dominantes  $S_{H1,2,3,4,5,6,7,8,9}$ , responsáveis pelo controle da resistência a esta doença (Mayne, 1936; Noronha-Wagner e Bettencourt, 1967; Bettencourt e Noronha-Wagner, 1971; Bettencourt et al., 1980; Bettencourt e Rodrigues, 1988). Os genes  $S_{H1,2,4,5}$  estão presentes na espécie *C. arabica* (Noronha-Wagner e Bettencourt, 1967; Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971). O gene  $S_{H3}$  é encontrado apenas nos cafés arábicas originários da Índia e, provavelmente, tenha provindo de *C. liberica* através de hibridação interespecífica (Mayne 1936; Noronha-Wagner e Bettencourt, 1967). Os genes  $S_{H6,7,8,9}$  são provavelmente oriundos de *C. canephora* e, quando associados a um ou mais genes desconhecidos, conferem resistência a todas as raças conhecidas do fungo (Bettencourt e Rodrigues, 1988). Diferentes combinações desses genes são encontrados nas populações derivadas do Híbrido de Timor. Este híbrido é, provavelmente, resultante de um cruzamento natural entre *C.*

*arabica* e *C. canephora* (Bettencourt, 1973), sendo bastante utilizado em programas de melhoramento como fonte de resistência a *Hemileia vastatrix*.

Variedades hospedeiras usadas para identificação de raças do patógeno são denominadas diferenciadoras. Para sistemas hospedeiro-patógeno em que o conceito gene a gene foi provado ou inferido, um grupo de diferenciadoras em que cada membro possui apenas um único gene de resistência foi considerado, por Flor, como o método mais eficiente e informativo em estudos de variação do patógeno (Flor, 1971). A análise das interações hospedeiro-patógeno permitiu reconhecer a validade da teoria gene-a-gene para o complexo *Coffea-Hemileia vastatrix*, e estudos extensivos realizados no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro - CIFC, em Portugal, resultaram na seleção de um grupo de cafeeiros diferenciadores (Bettencourt, 1981).

A caracterização de cafeeiros diferenciadores é importante para garantir a manutenção da identidade genética desses materiais, que é indispensável para propósitos de identificação das raças fisiológicas de *H. vastatrix*. Os marcadores moleculares baseados na análise direta do DNA, por serem potencialmente ilimitados em número e não sofrerem influência do ambiente, são indicados para estudos de caracterização.

Entre as várias técnicas, desenvolvidas para detectar polimorfismos de DNA, utilizando a tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) está a técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que foi desenvolvida por Williams et al. (1990). Esses marcadores são fáceis de serem detectados, pois, não requerem informações prévias sobre a seqüência de DNA a ser amplificada e têm sido eficientes na identificação de acessos de café (Lashermes et al., 1993; Orozco-Castillo et al., 1994; Lashermes et al., 1996; Orozco-Castillo et al., 1996). Duas outras vantagens são a automatização do processo e a pequena quantidade de DNA requerida. Estas vantagens fazem com que marcadores RAPD sejam escolhidos para a caracterização de genótipos em outras espécies (Thormann e Osborn, 1992).

O objetivo deste trabalho foi a caracterização molecular, estimação das distâncias genéticas e comparação com a genealogia de 18 clones de

cafeeiros diferenciadores de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* por meio de marcadores RAPD.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material genético:** O material genético utilizado neste trabalho são clones de *Coffea* sp usados como diferenciadores de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix*, pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, e foram obtidos por propagação vegetativa da coleção original do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro - CIFC (Tabela 1).

**Extração de DNA:** DNA dos 18 genótipos foi extraído de folhas jovens, seguindo-se o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1990) com a adição de PVP-40 (solúvel) no tampão de extração. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado a 4°C. Para amplificação, o DNA foi diluído em TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para uma concentração final de 10 ng/μl.

**Amplificação de DNA e análise eletroforética dos produtos:** Trinta e cinco *primers* de 10 bases da “Operon Technologies” foram utilizados para amplificar o DNA de cada um dos 18 genótipos. A amplificação foi feita em termociclador Perkin-Elmer 9600, e cada reação contou com um volume total de 25 μl, contendo os seguintes componentes: 25 ng de DNA genômico, 1 unidade AmpliTaq DNA polimerase, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 μM de iniciador, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl pH 8,3 e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e o volume final completado com água ultrapura. Foi utilizado o seguinte programa: um ciclo para desnaturação (95°C por 1 min), 39 ciclos para amplificação (15 seg a 94°

C, 30 seg a 35°C, 60 seg a 72°C) e, para finalizar, 7 min a 72°C. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,4%, corados com brometo de etídio, visualizados em UV e fotodocumentados. RAPDs foram registrados como presença ou ausência de bandas. Somente os polimorfismos observados em bandas nítidas foram considerados.

Tabela 1 - Clones de cafeeiros diferenciadores de *Hemileia vastatrix* e respectivas procedências.

Código	Descrição	Procedência	Grupo de Resistência	Genes de Resistência
1. CIFC 110/5	S 4 Agaro	Etiópia	J	S <sub>H</sub> 4,5
2. CIFC 128/2	Dilla & Alghe	Quênia	α	S <sub>H</sub> 1
3. CIFC 87/1	Geisha	Tanzânia	C	S <sub>H</sub> 1,5
4. CIFC 635/3	S 12 Kaffa	Etiópia	W	S <sub>H</sub> 1,4,5
5. CIFC 1006/10	KP 532 (Kent) planta 31	Tanzânia	L	S <sub>H</sub> 1,2,5
6. CIFC 134/4	S 12 Kaffa	Etiópia	I	S <sub>H</sub> 1,4
7. CIFC 32/1	DK 1/6	Índia	D	S <sub>H</sub> 2,5
8. CIFC HW 17/12	CIFC 35/2 x CIFC 134/4	Portugal	O	S <sub>H</sub> 1,2,4,5
9. CIFC H 152/3	CIFC 32/1 x CIFC 110/5	Portugal	γ	S <sub>H</sub> 2,4,5
10. CIFC 644/18	Híbrido Kawisari	Indonésia	M	S <sub>H</sub> ?
11. CIFC 33/1	S 288-23	Índia	G	S <sub>H</sub> 3,5
12. CIFC 147/1	CIFC 34/13 x CIFC 110/5	Portugal	T	S <sub>H</sub> 1,3,4,5
13. CIFC H 153/2	CIFC 87/1 x CIFC 33/1	Portugal	Z	S <sub>H</sub> 1,3,5
14. CIFC 4106	Híbrido de Timor	Timor	A	S <sub>H</sub> 5,6,7,8,9,?
15. CIFC 1343/269	Híbrido de Timor	Timor	R	S <sub>H</sub> 6
16. CIFC 832/1	Híbrido de Timor	Timor	A	S <sub>H</sub> 5,6,7,8,9,?
17. CIFC H 419/20	MN 1535/33 x HW 26/13	Portugal	3	S <sub>H</sub> 5,6,9
18. CIFC H 420/10	MN 1535/33 x HW 26/14	Portugal	1	S <sub>H</sub> 5,6,7,9

Fonte: Adaptação de Bettencourt (1981)

Híbrido Kawisari = *C arabica* x *C. liberica*; S 288-23 = *C arabica* x *C. liberica*; CIFC 34/13 = S 353 4/5 = *C arabica* x *C. liberica*; Híbrido de Timor = *C. arabica* x *C. canephora*; CIFC HW 26 = Caturra Vermelho CIFC 19/1 x Híbrido de Timor CIFC 832/1; CIFC – Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (Oeiras - Portugal); MN = Mundo Novo; H = híbrido.

**Análise dos dados:** A planilha de dados foi montada, atribuindo-se valor 1 para a presença e 0 para a ausência de bandas. Estimativas de similaridades genéticas foram expressas como coeficientes de similaridades de Jaccard (Jaccard, 1901), utilizando-se a equação  $SG_{ij} = a/(a+b+c)$ , em que  $SG_{ij}$  é a similaridade genética entre os genótipos  $i$  e  $j$ ,  $a$  é o número de bandas presentes em ambos  $i$  e  $j$ ,  $b$  é o número de bandas presentes em  $i$  e ausentes em  $j$ , e  $c$  é o número de bandas presentes em  $j$  e ausentes em  $i$ . A conversão para distância genética (DG) foi feita, empregando-se a equação  $DG_{ij} = 1 - SG_{ij}$ . O programa GENES (Cruz, 1997) foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas. O dendrograma, baseado na matriz de distâncias genéticas, foi obtido por meio da análise de agrupamento do programa STATISTICA, versão 5.0, empregando-se o método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic average*). Para a caracterização dos clones, foi feita a comparação dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados no sentido de encontrar padrões moleculares capazes de diferenciá-los.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis eletroforéticos, obtidos para café com a técnica de marcadores RAPD, apresentaram bandas nítidas polimórficas, como o apresentado na Figura 1, obtido com o *primer* OPB-18. Os 35 *primers* utilizados geraram 158 bandas polimórficas, média de 4,5 bandas polimórficas por *primer*.

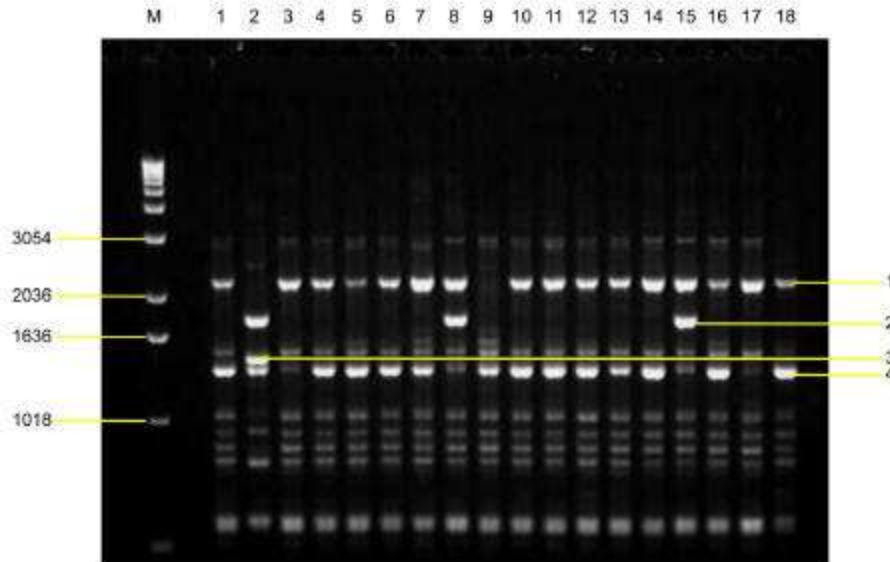


Figura 1 - Perfil eletroforético de DNA obtido com o *primer* OPB-18 para os 18 clones de cafeeiros diferenciadores de *Hemileia vastatrix*. Da esquerda para a direita: M - DNA marcador de peso molecular, 1 - 17/12; 2 - 644/18; 3 - 110/5; 4 - 128/2; 5 - 420/10; 6 - 87/1; 7 - 4106 (Híbrido de Timor); 8 - 33/1; 9 - 832/1; 10 - 635/3; 11 - 1343/269; 12 - 1006/10; 13 - 152/3; 14 - 134/4; 15 - 147/1; 16 - 419/20; 17 - 153/2 e 18 - 32/1.

As distâncias genéticas expressas em complementos aritméticos de Jaccard, obtidas para os 18 clones de cafeeiros diferenciadores de ferrugem, baseadas em 158 marcadores RAPD (Tabela 2), variaram de 4% (entre os clones CIFIC 128/2 e CIFIC 87/1) a 91% (entre os clones CIFIC 644/18 e CIFIC 1343/269). A análise de agrupamento baseada nos complementos aritméticos de Jaccard, utilizando-se o método UPGMA ao nível de 39% de distância genética (Figura 2), definiu três grupos: grupo A, com um clone (Híbrido Kawisari CIFIC 644/18); grupo B, com cinco clones (Híbrido de Timor CIFIC 1343/269, Híbrido de Timor CIFIC 4106, Híbrido de Timor CIFIC 832/1, CIFIC H 419/20 e CIFIC H 420/10, ); e grupo C com os 12 clones restantes. O clone mais divergente foi o Híbrido Kawisari CIFIC 644/18 que é, provavelmente, um híbrido natural tetraplóide entre *C. arabica* e *C. liberica*, suscetível apenas à raça XIII (Chaves, 1976). No grupo B, foram reunidos três progênies de Híbrido de Timor e dois híbridos derivados de cruzamentos envolvendo o Híbrido de Timor CIFIC 832/1.

O clone CIFIC 4106 é a planta selecionada na Ilha de Timor, supostamente o Híbrido de Timor em geração F<sub>1</sub>, reproduzida via propagação vegetativa e introduzida no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro. Os outros dois acessos, CIFIC 1343/269 e CIFIC 832/1, são clones derivados do Híbrido de Timor e introduzidos no CIFIC via sementes. Estes clones foram introduzidos na UFV via propagação vegetativa, sob os registros UFV 516, UFV 305 e UFV 529, respectivamente. No grupo C, estão incluídos nove materiais de arábica e três de arábica com introgressão de *C. liberica*.

Considerando o limite de 25% de distância genética, os grupos B e C foram subdivididos em três subgrupos: subgrupo B1, com um clone (Híbrido de Timor CIFIC1343/269); subgrupo B2, com um clone (CIFIC 4106); subgrupo B3, com três clones (CIFIC 832/1, CIFIC H 419/20 e CIFIC H 420/10); subgrupo C1, com dois clones (CIFIC H 147/1 e CIFIC 33/1); subgrupo C2, com um clone (CIFIC H 153/2); e subgrupo C3 com nove clones (CIFIC 87/1, CIFIC 128/2, CIFIC 110/5, CIFIC 1006/10, CIFIC 635/3, CIFIC 32/1, CIFIC H 152/3, CIFIC 134/4 e CIFIC HW 17/12). O três acessos de Híbrido de Timor (CIFIC 4106, CIFIC 1343/269 e CIFIC 832/1) ficaram em subgrupos diferentes, mostrando que, embora o Híbrido de Timor seja derivado de uma única planta (Bettencourt, 1973), existe bastante variabilidade nas populações e genótipos derivados do

Tabela 2 - Matriz de distâncias genéticas expressas como complementos aritméticos dos coeficientes de Jaccard, obtidas para 18 clones de cafeeiros diferenciadores de ferrugem e baseadas em 158 locos polimórficos de marcadores RAPD.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
CIFC HW 17/12	0																	
CIFC 644/18	0,875	0																
CIFC 110/5	0,127273	0,877193	0															
CIFC 128/2	0,2	0,875	0,163636	0														
CIFC H 420/10	0,266667	0,839623	0,267857	0,254237	0													
CIFC 87/1	0,2	0,873874	0,207547	0,04	0,290909	0												
CIFC 4106	0,421687	0,844445	0,43038	0,414634	0,27027	0,413333	0											
CIFC 33/1	0,393443	0,8	0,327273	0,4	0,431035	0,436364	0,585366	0										
CIFC 832/1	0,454545	0,866072	0,409836	0,396825	0,236364	0,403509	0,324324	0,569444	0									
CIFC 635/3	0,145455	0,842593	0,137255	0,113208	0,218182	0,16	0,405405	0,392857	0,392857	0								
CIFC 1343/269	0,419355	0,90991	0,423729	0,344828	0,327586	0,392857	0,413333	0,559322	0,403509	0,333333	0							
CIFC 1006/10	0,160714	0,842593	0,169811	0,178571	0,25	0,181818	0,415584	0,392857	0,431035	0,1	0,385965	0						
CIFC H 152/3	0,107143	0,848214	0,096154	0,142857	0,220339	0,188679	0,4	0,314815	0,435484	0,078431	0,366667	0,076923	0					
CIFC 134/4	0,071429	0,863248	0,127273	0,20339	0,258621	0,232143	0,419753	0,389831	0,4375	0,09434	0,419355	0,12963	0,074074	0				
CIFC 147/1	0,338235	0,778761	0,328125	0,382353	0,42029	0,40625	0,522222	0,078431	0,536232	0,34375	0,514706	0,359375	0,307692	0,352941	0			
CIFC H 419/20	0,397059	0,866667	0,354839	0,323077	0,172414	0,35	0,316456	0,484375	0,178571	0,310345	0,383333	0,354839	0,34375	0,369231	0,486487	0		
CIFC H 153/2	0,328358	0,716981	0,295082	0,348485	0,399939	0,35	0,476744	0,403226	0,507246	0,275862	0,461538	0,328125	0,269841	0,323077	0,323529	0,5	0	
CIFC 32/1	0,157895	0,850877	0,166667	0,192982	0,22807	0,222222	0,4125	0,385965	0,42623	0,169811	0,362069	0,166667	0,075472	0,142857	0,307692	0,359375	0,3125	0

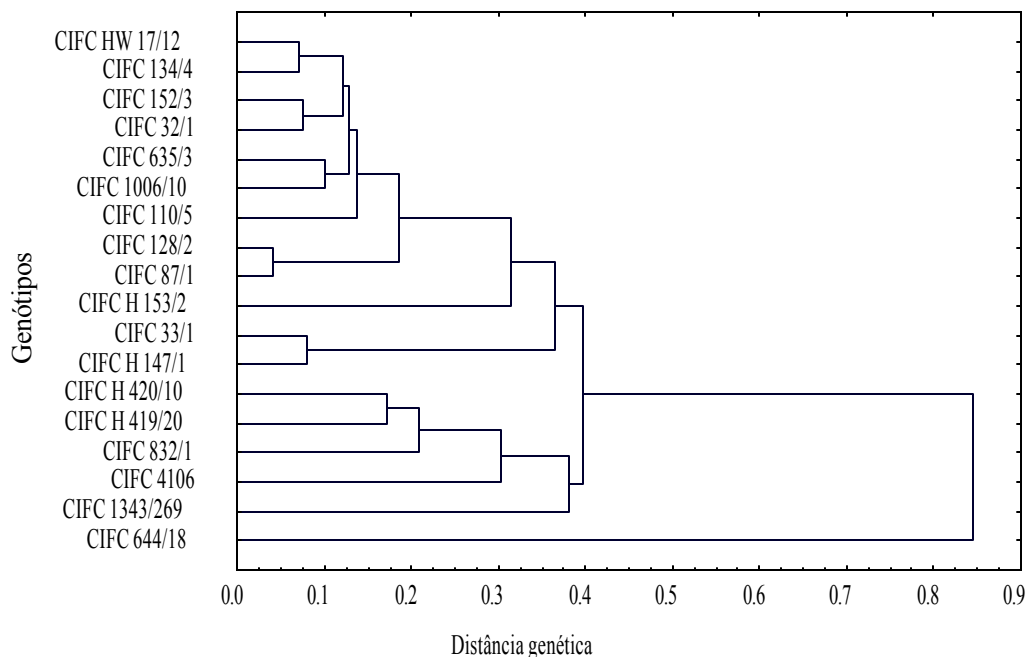


Figura 2 - Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas expressas em complementos de Jaccard, estimadas entre 18 clones de cafeeiros diferenciadores de ferrugem e baseadas em 158 marcadores RAPD oriundos de 35 *primers*.

Híbrido de Timor (Lashermes et al., 2000). É coerente a formação do subgrupo B3 (C1FC 832/1, H 419/20 e H 420/10), pois, o Híbrido de Timor C1FC 832/1 é um dos genitores dos híbridos H 419/20 e H 420/10.

O clone C1FC 33/1 do subgrupo C1 é uma seleção obtida a partir do cruzamento interespecífico entre *C. arabica* e *C. liberica*, realizado na Estação Experimental de Balehonnur (Índia). Esta seleção (C1FC 33/1) e a seleção S 353 4/5 (C1FC 34/13), também oriunda da Índia, foram utilizadas no C1FC (Portugal), em cruzamentos para a obtenção dos híbridos C1FC H 147/1 do subgrupo C1 e C1FC H 153/2 do subgrupo (Bettencourt, 1981). O subgrupo C3 é composto por genótipos puros de arábica (cultivares, seleções ou híbridos). O clone H 153/2 ficou numa posição intermediária entre o subgrupo C1 de clones interespecíficos *C. arabica* x *C. liberica* e o subgrupo C3 de arábicas puros. Esta posição está de acordo com a genealogia, pois, este é um híbrido oriundo do cruzamento entre os clones C1FC 87/1 e C1FC 33/1 (Figura 2). A ordenação dos clones, dentro do subgrupo C3, também concorda com a

origem genealógica; por exemplo, CIFIC 134/4 é um dos genitores do híbrido HW 17/12, e CIFIC 32/1 é um dos genitores do híbrido H 152/3. Verifica-se, portanto, que houve coerência entre o agrupamento obtido com base nos marcadores RAPD e a origem genealógica dos clones. A correspondência entre agrupamentos baseados em marcadores moleculares e a origem de genótipos do gênero *Coffea* foi obtida, também por outros pesquisadores (Orozco-Castillo et al., 1994; 1996; Lashermes et al., 1997).

Dos 158 marcadores RAPD, 60 (38%) foram específicos para o clone Híbrido Kawisari CIFIC 644/18, dez (6,3%) específicos para o clone Híbrido de Timor CIFIC 4106 e seis (3,8%) específicos para o clone Híbrido de Timor CIFIC 1343/269. Um menor número de marcadores específicos foram obtidos para outros clones, variando de um (para o clone CIFIC 87/1) a quatro (para o clone CIFIC 419/20) marcadores. A comparação dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados possibilitou a seleção de 12 marcadores RAPD, cuja combinação, permitiu a identificação dos 18 clones (Tabela 3). Os marcadores OPA08-1125 e OPC08-1692 são específicos aos clones com introgressão de genes de *C. liberica*, enquanto os marcadores OPA01-1066 e OPA07-1565 são específicos aos clones com introgressão de genes de *C. canephora*, e os marcadores OPB07-1764, OPA09-1520, OPA18-1162, OPC03-1018 e OPB12-2624 são específicos aos clones de arábicas puros, sem introgressão recente de genes de outras espécies. Em brócolos e couve-flor (Hu e Quiros, 1991), aipo (Yang e Quiros, 1994), banana (Howell et al., 1994) e melão (Lee et al., 1996), marcadores RAPD também foram apropriadamente utilizados para identificação de cultivares e estudos de parentesco genético.

O padrão molecular obtido poderá ser usado para identificação dos genótipos estudados, o que auxiliará o trabalho de manutenção da identidade genética dos clones de cafeeiros diferenciadores de ferrugem.

Tabela 3 - Caracterização molecular obtida com 12 marcadores RAPD para 18 clones de cafeeiros diferenciadores de *Hemileia vastatrix*.

Marcador	Clones <sup>1/</sup>																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
OPA01-1066 <sup>2/</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
OPA01-1532	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
OPA07-0925	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
OPA07-1565	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
OPA08-1225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
OPA09-1520	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA18-1162	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA20-0867	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
OPB07-1764	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB12-2624	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPC03-1018	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPC08-1692	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

1/: 1 - CIFC 110/5; 2 - CIFC 128/2; 3 - CIFC 87/1; 4 - CIFC 635/3; 5 - CIFC 1006/10; 6 - CIFC 134/4; 7 - CIFC 32/1; 8 - CIFC HW 17/12; 9 - CIFC H 152/3; 10 - CIFC 644/18; 11 - CIFC 33/1; 12 - CIFC 147/1; 13 - CIFC H 153/2; 14 - CIFC 4106; 15 - CIFC 1343/269; 16 - CIFC 832/1; 17 - CIFC H 419/20; 18 - CIFC H 420/10. 2/: + presença da banda; - ausência da banda.

## CONCLUSÕES

Houve coerência entre o agrupamento obtido com base nos marcadores RAPD e a origem genealógica dos clones

O clones de cafeeiros diferenciadores de *Hemileia vastatrix* foram caracterizados e diferenciados pelo padrão molecular obtido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTENCOURT, A.J. 1973. Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timor'. Circular n. 23. Instituto Agrônômico. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. 20p.
- BETTENCOURT, A.J. Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de fatores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk et Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L. Lisboa, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC/IICT), 1981. 93p.
- BETTENCOURT, A.J. & NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk et Br. *Agronomia Lusitana*, Sacavém, 31:285-92, 1971.
- BETTENCOURT, A.J.; NORONHA-WAGNER, M. & LOPES, J. Fator genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Broteria Série Genética*, Lisboa, I (LXXVI), 53-8, 1980.
- BETTENCOURT, A.J. & RODRIGUES JR., C.J. Principles e practice of cofffee breeding for resistance to rust and other disease. In: CLARKE, R.J. & MACRAE, R. (eds). *Coffee*, London, Elsevier Applied Science, 1988. p.199-235. v.4: Agronomy.
- CARDOSO, R.M.L.; ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Novas raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Identificadas em cafeeiros com genótipos complexos, no Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 12, Caxambu, 1985. *Resumos...* Rio de Janeiro, IBC/GERCA, 1981. p.126-127.
- CARDOSO, R.M.L.; ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* Berk et Br. coletada do germoplasma de *Coffea arabica* L. no Estado de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 13:343-346, 1988.

- CHAVES, G.M. Melhoramentos dos cafeeiros visando a obtenção de cultivares resistentes a *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Revista Ceres, Viçosa, 23(128):321-32, 1976.
- CRUZ, C.D. Programa Genes: Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.
- D'OLIVEIRA, B. As ferrugens do cafeeiro. Revista do Café Português, Lisboa, 1(4):5-13; 2(5):5-12; 2(6):5-13; 2(7):9-17; 2(8):5-22; 4(16):5-15. 1954-57.
- D'OLIVEIRA, B. & RODRIGUES Jr., C.J. O problema das ferrugens do cafeeiro. Determinação da resistência à *Hemileia vastatrix* em *Coffea arabica*. Revista do Café Português, Lisboa, 8(29):5-87. 1960.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12(1):13-15. 1990.
- HOWELL, E.C.; NEWBURY, H.J.; SWENNEN, R.L.; WITHERS, L.A. & FORD-LLOYD, B.V. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germoplasm. Genome, Ottawa, 37:328-332. 1994.
- HU, J. & QUIROS, C.F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports, Heidelberg, 10:505-511. 1991.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. Bull Soc. Vaudoise Sci. Nat. 37:547-579. 1901.
- LASHERMES, P.; CROS, J.; MARMEY, P. & CHARRIER, A. Use of random amplified DNA markers to analyse variability and relationships of *Coffea* species. Genetic Resources and Crop Evolution, Dordrecht, 40:91-99. 1993.
- LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; & CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica, Dordrecht, 87:59-64. 1996.
- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; TROUSLOT, P. & CHARRIER, A. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Theoretical Applied Genetics, Berlin, 94:947-955. 1997.
- LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B.; COMBES, M.C.; DUSSERT, S.; GRAZIOSI, G.; TROUSLOT, P. & ANTHONY, F. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). Theoretical Applied Genetics, Berlin, 100:139-146. 2000.
- LEE, S.J.; SHIN, J.S.; PARK, K.W. & HONG, Y.P. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germoplasm. Theoretical Applied Genetics, Berlin, 92:719-725. 1996.

- LOPES, J. & GODINHO, I.L. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Garcia de Orta, Lisboa, 3(1-2):13-16. 1976.
- MAYNE, W.W. Annual Report of the Coffee Scientific Officer, Mysore Coffee Experimental Station, Mysore. 1936. 21p. (Bulletin 14).
- MAYNE, W.W. Physiologic specialization of *Hemileida vastatrix* Berk. et Br. Nature, Londres, 129(3.257):510. 1932.
- NORONHA-WAGNER, M. & BETTENCOURT, A.J. Genetic study of the resistance of *Coffea* sp to leaf rust 1. Identification and behavior of four factors conditioning disease reation in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 45:2021-31, 1967.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R & POWEL, W. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theoretical Applied Genetics, Berlin, 87:934-940, 1994.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; POWEL, W. & WAUGH, R. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. Plant Cell Reports, Heidelberg, 15:337-341, 1996.
- REYES, T.T. Uma nova raça fisiológica de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Revista do Café Português*, Lisboa, 4(16):12-15. 1957.
- RODRIGUES JR., C.J.; BETTENCOURT, A.J. & RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 13:49-70. 1975.
- THORMANN, C.E. & OSBORN, T.C. Use of RAPD & RFLP markers for germplasm evaluation. In: Symposium Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, 1992, Minneapolis. Proceedings of the Symposium on Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Crop Science Society of America, American Society for Horticultural Science, American Genetic Association, 1992. p. 9-11.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. e TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful das genetic markers. Nucleic Acids Research, Oxford, 18:6531-6535, 1990.
- YANG, X. & QUIROS, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theoretical Applied Genetics, Berlin, 86:205-212, 1993.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; PEREIRA, A.A. & CHAVES, G.M. Café (*Coffea arabica* L.). In: Controle de Doenças de Plantas: grandes culturas. Viçosa, UFV, Departamento de Fitopatologia, Brasília, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. v. 1, p.83-141.

## MAPA PARCIAL DE LIGAÇÃO GÊNICA DE *Coffea arabica* L.

### RESUMO

Uma das aplicações mais importantes da tecnologia de marcadores moleculares no melhoramento de plantas é a geração de mapas genéticos, que permitem a geração de informações sobre a estrutura, organização e evolução do genoma. Em *Coffea arabica* L. ( $2n=4x=44$ ), a construção de mapas de ligação tem sido particularmente difícil devido ao baixo nível de polimorfismos e complicações advindas da poliploidia. Marcadores RAPD foram utilizados para a construção de um mapa parcial de ligação gênica para *Coffea arabica* L., a partir de uma população segregante RC<sub>1</sub> obtida do cruzamento entre Mundo Novo e Híbrido de Timor, sendo este último utilizado como genitor recorrente. Foram obtidos 93 marcadores RAPD, dos quais 87 (93,5%) apresentaram segregação 1:1 ( $P>0,01$ ), quatro (4,4%) segregação 2:1 ( $P>0,05$ ) e dois (2,2%) segregação 5:1 ( $P>0,05$ ). Para a construção do mapa, foram utilizados os 87 marcadores que segregaram 1:1, sendo que cinco não mostraram-se ligados aos grupos formados. Oitenta e dois marcadores RAPD resultaram em oito grupos de ligação cobrindo 540,6 cM. Os grupos obtidos tiveram uma boa densidade de marcadores, exceto dois grupos. O maior intervalo entre dois marcadores foi de 36,4 cM, e 94,5% dos intervalos não excederam a 20 cM. O tamanho dos grupos de ligação teve alta correlação com o número de marcadores ( $r=0,887$ ), indicando distribuição aleatória dos marcadores nos

grupos. Entretanto, o número de grupos de ligação é inferior ao correspondente número haplóide de cromossomos (22); portanto, o genoma da espécie foi parcialmente explorado e muitas regiões ainda não foram identificadas.

Palavras indexadas: café, *Coffea arabica*, RAPD, mapa de ligação.

## INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence ao subgênero *Coffea*, família Rubiaceae, formado por aproximadamente 100 espécies (Charrier e Berthaud, 1985). Das espécies cultivadas, *Coffea arabica* L (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre et Froenher (café robusta), são as mais importantes economicamente, sendo *C. arabica* responsável por 70% da produção mundial e 99% da produção da América Latina. *C. arabica* é alotetraplóide ( $2n=4x=44$ ) e autofértil (Carvalho e Krug, 1949; Krug e Carvalho, 1951; Carvalho, 1952; Charrier e Berthaud, 1985), enquanto as outras espécies são diplóides ( $2n=2x=22$ ) e geralmente auto-incompatíveis (Conagin e Mendes, 1961; Monaco, 1972; Charrier e Berthaud, 1985).

Por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil longo, o melhoramento genético do cafeeiro é, via de regra, lento. Sendo assim, é de fundamental importância a implementação de técnicas que facilitem e acelerem a seleção e avaliação de materiais superiores, em um programa de melhoramento. A seleção assistida por marcadores moleculares pode, potencialmente, acelerar o progresso genético pelo aumento na eficiência de seleção, redução no intervalo de gerações e identificação de quebra de ligações indesejáveis.

Inicialmente, os estudos genéticos eram realizados utilizando marcadores morfológicos, tais como cor de flor, cor de semente, cor e tipo de pubescência e albinismo. Os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do

mapeamento genético e das análises de ligação gênica. No entanto, sua utilização na geração de mapas e no melhoramento foi limitada pelo número reduzido de marcadores disponíveis, pela ausência de ligação com características de importância econômica e pelos efeitos deletérios das mutações.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, vários marcadores genéticos baseados na análise direta do DNA foram desenvolvidos, e com a vantagem de serem potencialmente ilimitados em número. O primeiro e mais amplamente utilizado foi RFLP (*Restriction Fragment Length polymorphisms*) (Botstein et al., 1980), que oferece a vantagem do grande número de marcadores polimórficos, mas tem limitação de custo e complexidade técnica.

O desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (Mullis e Faloona, 1987) possibilitou o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares, baseados na amplificação de fragmentos de DNA, e separação dos fragmentos por eletroforese para visualização dos polimorfismos. Uma destas técnicas foi desenvolvida por Williams et al. (1990) e foi denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Estes marcadores são fáceis de serem detectados, pois, não requerem informações sobre a seqüência de DNA a ser amplificada ou a síntese de *primers* específicos. Duas outras vantagens são a automatização do processo e pequena quantidade de DNA requerida.

Uma das aplicações mais importantes da tecnologia de marcadores moleculares, no melhoramento de plantas, é a geração de mapas genéticos, que podem ser usados para determinar a localização de genes responsáveis por caracteres simples e complexos. Para o caso de caracteres de herança simples, a identificação de marcadores ligados a genes que conferem resistência a patógenos permite monitorar e acelerar a introgressão destes genes em cultivares comerciais, além de possibilitar a piramidação de genes em uma única cultivar. Marcadores ligados a genes de interesse também podem fornecer um ponto de partida para a clonagem de genes baseada em mapa (*Map-Based Cloning*). Por outro lado, a grande maioria dos caracteres de importância econômica estão sob controle genético complexo, envolve a ação de vários genes, e é altamente influenciada pelas condições ambientais, sendo de difícil manipulação e compreensão. Esses locos são denominados locos

controladores de caracteres quantitativos (QTLs - *Quantitative Trait Loci*) (Geldermann, 1975) e, para a maioria desses caracteres, existem poucas informações sobre o número, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações entre os locos que controlam sua expressão. Utilizando mapas genéticos e técnicas de mapeamento de QTLs, é possível obter tais informações.

O marco inicial do mapeamento genético foi o fenômeno da ligação genética, explicada por Morgan em 1910. O mapeamento genético baseia-se na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete a proximidade entre eles, criando a possibilidade de se ordenar, linearmente, a informação genética ao longo dos cromossomos. Os primeiros mapas genéticos de espécies cultivadas (MacArthur, 1934; Emerson et al., 1935) foram construídos antes mesmo do material genético ser atribuído ao DNA, sendo utilizados caracteres de herança simples.

A disponibilidade de vários tipos de marcadores (morfológicos, bioquímicos e moleculares), aliada ao surgimento de pacotes computacionais e metodologias estatísticas apropriadas, tem permitido a construção de mapas genéticos saturados para um grande número de espécies de plantas ( Tanksley et al. 1992; Causse et al. 1994; Reinisch et al. 1994; Becker et al., 1995; Plomion et al., 1995; Borner and Korzun, 1998; Joobeur et al. 1998; Spada et al. 1998 e Vuylsteke et al., 1999). Estes mapas permitem a geração de informações básicas sobre a estrutura, organização e evolução do genoma, a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito destas regiões na característica estudada, a decomposição de características complexas nos seus componentes Mendelianos e a reunião de todas estas informações para serem usadas nos programas de melhoramento.

Em *Coffea arabica* L., a construção de mapas de ligação tem sido particularmente difícil devido ao baixo nível de polimorfismos (Paillard et al., 1993; Orozco-Castillo et al., 1994; Lashermes et al. 1996, 1999) e complicações advindas da poliploidia (Paillard et al. 1996). Estas complicações incluem o grande número de grupos de ligação, a detecção de locos múltiplos por uma única sonda, e a co-migração de fragmentos de diferentes locos que

podem impedir a interpretação de relações alélicas e análises genéticas (O'Donoghue et al., 1995).

O objetivo deste trabalho foi construir um mapa parcial de ligação gênica para *Coffea arabica*, utilizando-se marcadores RAPD.



transferida para um novo tubo, e igual volume de isopropanol gelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  foi adicionado. Os tubos foram invertidos várias vezes até precipitar o DNA, e centrifugados a 1000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (DNA) lavado com etanol 70 %. Após descarte do álcool, o DNA foi secado ao ar e dissolvido em TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + Rnase (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Amplificação do DNA e análise eletroforética dos produtos:** Seiscentos e oitenta *primers* de 10 bases da “Operon Technologies” (kits OPA-OPZ e OPBA-OPBH) foram utilizados para amplificar o DNA dos pais e da planta  $F_1$ . Os *primers*, que geraram fragmentos polimórficos mais intensos entre os pais, foram utilizados para amplificar o DNA de 12 plantas  $RC_1$  escolhidas ao acaso. Os *primers*, que confirmaram o polimorfismo, foram utilizados para amplificar o DNA das 92 plantas restantes. A amplificação foi feita em termociclador Perkin-Elmer 9600, e cada reação contou com um volume total de 25  $\mu\text{l}$ , contendo os seguintes componentes: 25 ng de DNA genômico, 1 unidade AmpliTaq DNA polimerase, 0.1 mM de cada dNTP, 0.2  $\mu\text{M}$  de iniciador, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl pH 8.3 e 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  e o volume final completado com água ultrapura. Foi utilizado o seguinte programa: um ciclo para desnaturação ( $95^{\circ}\text{C}$  por 1 min), 39 ciclos para amplificação (15 seg a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 seg a  $35^{\circ}\text{C}$ , 60 seg a  $72^{\circ}\text{C}$ ) e, para finalizar, 7 min a  $72^{\circ}\text{C}$ . Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em geis de agarose 1.4%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados. RAPDs foram registrados como presença ou ausência de bandas.

**Análise dos dados e construção do mapa:** Somente as bandas polimórficas (marcadores) mais nítidas foram consideradas na análise dos dados. Marcadores presentes no pai Mundo Novo e ausentes no pai Híbrido de Timor foram analisados pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para taxas de segregações 1:1, 5:1 e 2:1 na população  $RC_1$ . A proporção 1:1 é esperada para o caso de herança dissômica e tetrassômica, em que a planta  $F_1$  tenha apenas um alelo dominante (i.e. Aa e Aaaa), a proporção 5:1 para o caso de herança tetrassômica em que a planta  $F_1$  tenha dois alelos dominantes (i.e. AAaa) e a

proporção 2:1 representa uma distorção da segregação 1:1. Para a construção do mapa de ligação, foram consideradas apenas os marcadores com segregação 1:1, que é a proporção esperada para herança dissômica em população  $RC_1$ . O programa MAPMAKER/EXP v. 3.0 (Lander et al. 1987) foi utilizado para construção do mapa de ligação. Análise de dois-pontos foi usada para identificar os grupos de ligação com valores de recombinação ( $\theta$ ) máximo de 0.4 e LOD score mínimo de 3.0. A função de Kosambi (Kosambi 1944) foi usada para conversão das taxas de recombinação em distância de mapa (centiMorgan cM).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 680 *primers* avaliados entre os pais e F<sub>1</sub>, 146 (21,5 %) amplificaram bandas específicas presentes em Mundo Novo e F<sub>1</sub> e ausentes no Híbrido de Timor. Em *Coffea canephora*, Paillard et al. (1996), trabalhando com duplos haplóides (DHS), encontraram uma taxa de polimorfismo com marcadores RAPD igual a 29 %, e em lentilha Eujayl et al. (1997) obtiveram 29,7 % em população F<sub>2</sub>.

Desses 146 *primers*, 114 (78,9 %) foram selecionados por apresentarem padrão polimórfico mais intenso e reprodutível nas 12 plantas RC<sub>1</sub>, pais e F<sub>1</sub>. Eujayl et al. (1998), trabalhando com populações RILs (*Recombinant inbred lines*) de lentilha, selecionaram 60,3 % dos *primers* polimórficos entre os pais com base na reprodutibilidade dos fragmentos amplificados e em *Brassica napus* (Foisset, 1996) 89,5% dos *primers*, 89% dos sistemas enzimáticos e 84% das sondas RFLP, avaliados entre os pais foram polimórficos.

Dos 114 *primers* selecionados, 80 (70,2 %) foram utilizados para amplificar o DNA das 92 plantas restantes. Esses 80 *primers* deram origem a 93 marcadores RAPD (1,2 marcadores por *primer*), dos quais 87 (93,5 %) apresentaram segregação 1:1 (P>0,01) (Tabela 1), quatro (4,3 %) segregação 2:1 e dois (2,2 %) segregação 5:1. Para os quatro marcadores que segregaram 2:1, houve excesso de heterozigotos. Excesso de heterozigotos também foi verificado em distorções de segregação em algodão (Shappley et al., 1998) e milho (Schon et al., 1993). Na espécie tetraplóide *Prunus cerasus* L., Wang e

Tabela 1 - Lista de marcadores RAPD segregando na proporção Mendeliana esperada (1:1) e respectivos valores de qui-quadrado e de probabilidade. *Primer* com mais de um produto polimórfico foi identificado com as letras a, b, c.

Marcador	$\chi^2$	P	Marcador	$\chi^2$	P	Marcador	$\chi^2$	P
OPA-01	0,15	0,698	OPN-14	0,43	0,512	OPV-17	0,18	0,671
OPB-02	2,26	0,133	OPO-04	0,47	0,493	OPW-01	0,64	0,424
OPB-20	0,09	0,764	OPO-06a	0,04	0,841	OPW-08a	2,51	0,113
OPC-02	0,20	0,655	OPO-06b	0,16	0,689	OPW-08b	0,63	0,427
OPD-13	0,09	0,764	OPO-15	0,79	0,374	OPW-13a	0,35	0,554
OPD-14	0,11	0,740	OPP-01	0,80	0,371	OPW-13b	0,35	0,554
OPE-19a	0,25	0,617	OPP-06	1,14	0,286	OPX-09	2,5	0,114
OPE-19b	0,25	0,617	OPP-08	1,64	0,200	OPX-10	0,0	1,000
OPF-05	0,96	0,327	OPP-16	1,38	0,240	OPY-01	2,56	0,109
OPG-06a	0,09	0,764	OPP-19	0,16	0,689	OPY-02	2,23	0,135
OPG-06b	0,09	0,764	OPQ-05a	0,01	0,920	OPY-03	0,04	0,841
OPG-11	1,04	0,308	OPQ-05b	0,47	0,493	OPY-17a	0,01	0,920
OPG-13	1,88	0,170	OPQ-06	0,35	0,554	OPY-17b	5,34	0,021
OPG-14	0,48	0,488	OPQ-12	2,46	0,117	OPZ-06	0,48	0,488
OPG-15	0,04	0,841	OPR-09	6,50	0,011	OPZ-08	0,04	0,841
OPH-08	6,19	0,013	OPR-16	3,47	0,062	OPZ-09	0,48	0,488
OPI-20	0,01	0,920	OPR-17	0,40	0,527	OPZ-14	0,64	0,424
OPJ-11a	0,24	0,624	OPS-07a	1,38	0,240	OPZ-15	4,65	0,031
OPJ-11b	0,48	0,488	OPS-07b	0,15	0,698	OPBA-06	0,15	0,698
OPJ-17	0,00	1,000	OPS-09	2,23	0,135	OPBB-09	6,07	0,014
OPK-02	0,01	0,920	OPS-10a	1,38	0,240	OPBB-10	1,57	0,210
OPK-13a	2,80	0,094	OPS-10b	4,65	0,031	OPBC-18	0,35	0,554
OPK-13b	0,09	0,764	OPS-10c	2,46	0,117	OPBD-02	2,46	0,117
OPM-02	3,85	0,050	OPT-06	0,04	0,841	OPBD-05	0,48	0,488
OPL-11	6,07	0,014	OPU-09	2,27	0,132	OPBE-12	2,46	0,177
OPM-06a	3,12	0,077	OPU-14	1,92	0,166	OPBF-18	0,04	0,841
OPM-06b	0,00	1,000	OPV-07	2,86	0,091	OPBG-05	0,55	0,458
OPM-17	0,36	0,540	OPV-08	2,46	0,117	OPBG-19	3,12	0,077
OPM-18	0,04	0,841	OPV-15	0,25	0,617	OPBH-16	1,15	0,283

colaboradores (1998) verificaram que, dos 110 marcadores RFLP com proporção esperada 1:1, 21 (19,1 %) segregaram na proporção 2:1, e três (2,7 %) na proporção 5:1. A segregação 2:1 é considerada uma distorção da segregação 1:1 e, provavelmente, isto ocorre devido à seleção gametofítica ou zigotos letais (Wang et al., 1998). Já a proporção 5:1 pode ser resultante de segregação tetrassômica (Allard, 1971; Sybenga, 1972).

Como *C. arabica* é um alotetraplóide (Krug e Carvalho, 1951; Carvalho, 1952) segmentar (Grassias e Kammacher, 1975; Medina-Filho et al., 1984; Pinto-Maglio e Cruz, 1998), é esperado que ocorram segregações tetrassômicas em adição a segregações dissômicas (Sybenga, 1972). Entretanto, estudos de herança têm demonstrado que *C. arabica* possui um sistema genético exclusivamente dissômico (Krug e Carvalho, 1951; Carvalho, 1952; Lashermes et al., 2000). Estudos citogenéticos, realizados em *C. arabica*, mostraram que apesar da grande semelhança estrutural e morfológica entre cromossomos homeólogos, a formação de tetravalentes é rara, prevalecendo a formação de bivalentes (Pinto-Maglio e Cruz, 1998). Na origem de *C. arabica*, provavelmente, houve duplicação dos genomas das duas espécies genitoras; portanto, deve haver pareamento preferencial dos homólogos, mesmo havendo grande similaridade entre a maioria dos cromossomos homeólogos. Este pareamento preferencial pode ter controle genético, como ocorre em trigo (Riley e Chapman, 1958; Riley et al., 1960; Feldman, 1993), o que é discutido por Pinto-Maglio e Cruz (1998) e Lashermes e colaboradores (2000) como possível explicação da herança dissômica em *C. arabica*.

Pelo exposto acima, não seria esperada segregação 5:1 (tetrassômica) na população RC<sub>1</sub>. Entretanto, como o Híbrido de Timor esteve envolvido, outras considerações deverão ser feitas. O Híbrido de Timor é, provavelmente, resultante de um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, em que um gameta não-reduzido de *C. canephora* tenha combinado com outro normal de *C. arabica* (Bettencourt, 1973). Observações cariológicas, realizadas nesse híbrido, demonstraram que há ocorrência, com maior frequência, de 44 cromossomos os quais não apresentam grandes diferenças morfológicas (Rijo, 1974). Sabe-se que, durante a evolução do gênero *Coffea*, as estruturas

cromossômicas não sofreram grandes alterações (Bouharmont, 1959; Charrier e Berthaud, 1985). Como a espécie *C. canephora* é um possível ancestral de *C. arabica*, a facilidade de pareamento de cromossomos homeólogos das duas espécies seria favorecida semelhantemente ao que acontece em *Hordeum* spp (Schooler, 1963; Liu e Schooler, 1965) e em *Aegilops* spp (Feldman, 1965ab). Nesses casos, este genoma comum atuaria durante a hibridação como um tampão citológico, dando às formas grande estabilidade (Rijjo, 1974). Em estudos de meiose, em híbridos interespecíficos entre *C. arabica* e *C. canephora*, verificou-se a formação de mono, bi, tri e tetravalentes, com predomínio de bivalentes (Kammacher e Capot, 1972; Owuor, 1985; Boaventura e Cruz, 1987). Vale lembrar que tanto a formação de bivalentes com pareamento ao acaso entre quatro cromossomos, quanto a formação de tetravalentes, resultam em segregação tetrassômica.

Lashermes e colaboradores (2000), trabalhando com marcadores RFLP, verificaram que os quatro conjuntos de cromossomos presentes no híbrido Arabusta (híbrido artificial entre *C. arabica* e *C. canephora*) não apresentaram pareamento preferencial, como verificado em *C. arabica*, sendo observados segregação tetrassômica e eventos de dupla redução. No presente trabalho, foi verificada segregação tetrassômica em apenas 2,2% dos casos. Isto pode ser devido: i) à recuperação, em parte, do pareamento preferencial característico da cultivar Mundo Novo (*C. arabica*) utilizada no cruzamento com Híbrido de Timor; ii) a locos ainda em heterozigose na cultivar Mundo Novo; iii) origem das marcas (cultivar Mundo Novo).

A maioria dos locos (93,5 %) apresentou segregação 1:1. Esta proporção de segregação é prevista em população  $RC_1$  tanto para herança dissômica quanto para herança tetrassômica, desde que a planta  $F_1$  tenha apenas um alelo dominante (i.e., Aaaa e Aa). Caso a herança seja tetrassômica, o loco em questão não estaria em homozigose na cultivar Mundo Novo, tendo pelo menos um alelo recessivo (i.e. AAAa, Aaaa e Aaaa).

Para construção do mapa, foram utilizados apenas os 87 marcadores RAPD que segregaram 1:1 (Tabela 1). Destes 87 marcadores, cinco (OPK-02, OPO-04, OPP-16, OPV-07 e OPBA-06) não mostraram-se ligados aos grupos formados. Os outros 82 foram mapeados em oito grupos de ligação cobrindo 540.6 cM (Figura 1). Considerando todos os grupos, a distância média entre

dois marcadores foi 7.3 cM, e dentro de cada grupo a distância média variou de 3.47 cM (Grupo 7) a 18,7 cM (Grupo 8). O maior intervalo entre dois marcadores foi 36.4 cM no Grupo 8, e 94.6 % dos intervalos foram menores do que 20 cM, o que torna este mapa apropriado para o mapeamento de QTLs, cujos modelos admitem intervalos de até de 20 cM entre marcadores. O tamanho dos grupos de ligação teve alta correlação com o número de marcadores ( $r = 0.887$ ), indicando distribuição aleatória dos marcadores nos grupos. A correlação entre o número de marcadores e o tamanho dos grupos de ligação também foi alta ( $r = 0.959$ ) para o mapa de ligação em *C. canephora* (Paillard et al., 1996). Esses autores observaram distância média de 10 cM entre dois marcadores, considerando todos os grupos, e dentro de cada grupo variou de 3.25 a 18.3 cM, sendo que o maior intervalo foi 30.7 cM e 11 intervalos excederam a 25 cM.

O cafeeiro é um tetraplóide com número básico igual a 11 cromossomos ( $x=11$ ), e os estudos de mapeamento devem ser direcionados para a identificação de 22 grupos de ligação ( $n=22$ ) e as relações homeólogas entre esses grupos. O mapa de ligação de *C. arabica*, obtido neste trabalho, foi formado por oito grupos de ligação e cinco marcadores não-ligados, indicando que o genoma da espécie foi apenas parcialmente explorado, e muitas regiões ainda não foram identificadas pelos marcadores.

Outros tipos de marcadores moleculares (isoenzimas, RFLP, AFLP e SSR) poderão ser utilizados para a melhor cobertura do genoma do cafeeiro, ou seja, formação de novos grupos e saturação dos intervalos nos grupos já obtidos. Para a identificação de grupos de ligação de homeólogos, deverão ser utilizados marcadores que identifiquem alelos em diferentes grupos de ligação, como isoenzimas, RFLP e SSR. No presente trabalho, por exemplo, alelos oriundos de quatro cromossomos com pareamento ao acaso e segregação 1:1 podem ter sido mapeados no mesmo grupo, pois, o marcador e o agrupamento aqui utilizados, juntamente com a falta de mapas de espécies diplóides para comparações, não oferecem condições para distingui-los.

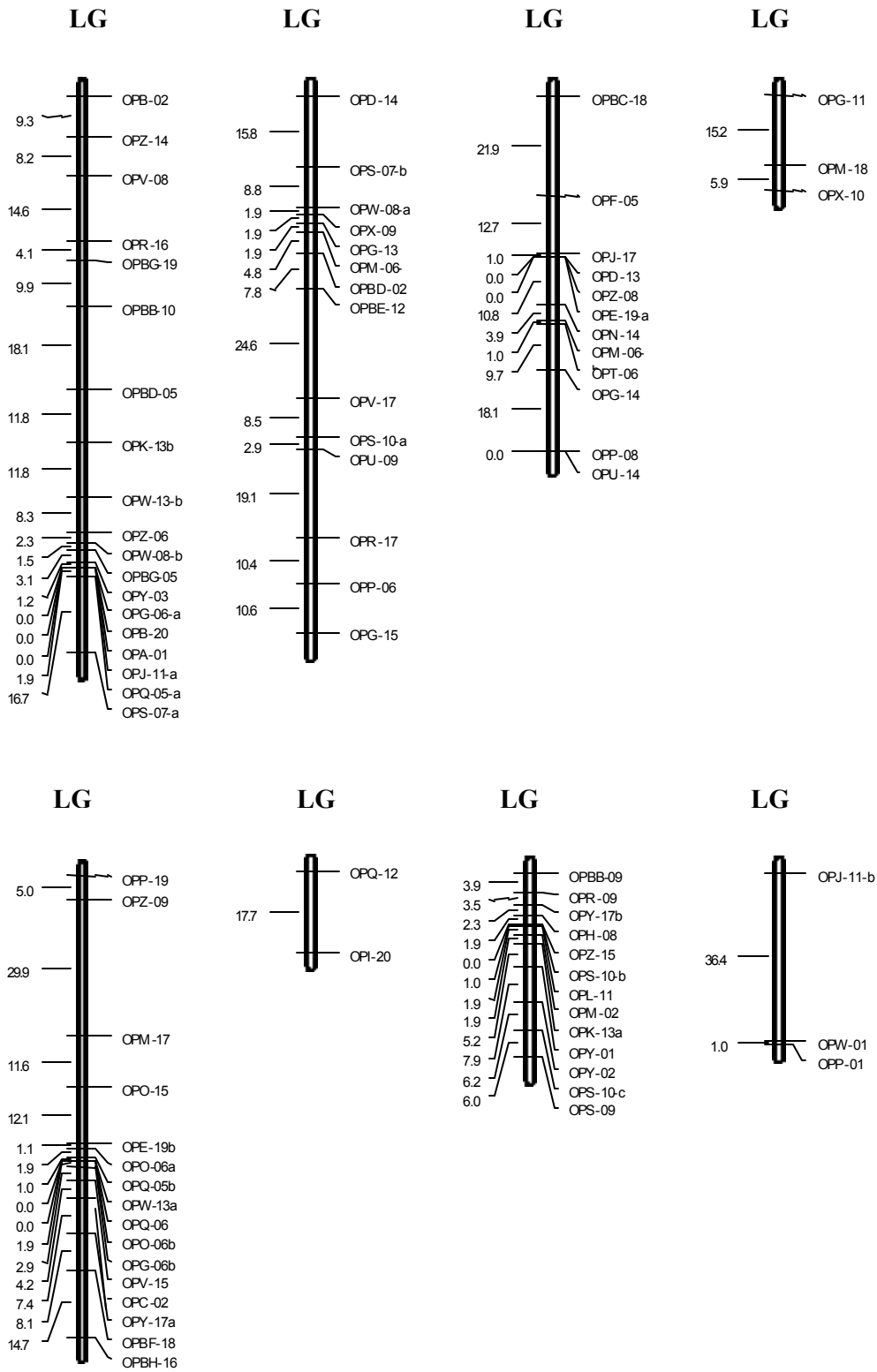


Figura 1 - Mapa parcial de ligação gênica de *Coffea arabica* L. com base em marcadores RAPD. Distâncias de mapa em cM (função de Kosambi) são indicadas à esquerda dos grupos de ligação e os nomes dos locos estão à direita.

A obtenção de mapas de ligação de espécies diplóides do subgênero *Coffea*, de preferência das possíveis espécies ancestrais de *C. arabica*, também é importante para comparações e identificação de grupos homólogos e homeólogos. Na espécie tetraplóide *Prunus cerasus* L. (cereja azeda), das 82 sondas que identificaram fragmentos mapeados, 15 reuniram os critérios necessários para a identificação de grupos homeólogos. Nesse mesmo trabalho, os autores concluíram que quatro grupos de ligação de *Prunus cerasus* L podem ser homólogos a quatro dos oito grupos de ligação identificados em *Prunus persica* (pessegueiro) e *Prunus amygdalus* (amendoeira) (Wang et al., 1998). Estas relações de homeologia também foram identificadas em espécies tetraplóides de algodão (Reinisch et al., 1994) e espécie hexaplóide de aveia (O'Donoghue et al., 1995), utilizando-se marcadores RFLP e isoenzimáticos.

A disponibilidade de um mapa saturado de ligação gênica é, sem dúvida, uma ferramenta útil para o entendimento da genética do cafeeiro. Com a integração de mapas moleculares e informações citológicas, geneticistas e melhoristas estarão aptos a estudar e manipular caracteres complexos e obter valiosas informações sobre o processo de evolução de poliplóides.

## CONCLUSÕES

Oitenta e sete (93,5%) marcadores apresentaram segregação 1:1 ( $P>0,01$ ), quatro (4,4%) segregação 2:1 ( $P>0,05$ ) e dois (2,2%) segregação 5:1 ( $P>0,05$ ).

Foi obtido mapa parcial de ligação para *C. arabica* formado por oito grupos de ligação.

Os marcadores distribuíram aleatoriamente nos grupos ( $r=0,887$ ).

O maior intervalo entre dois marcadores foi 36,4 cM, e 94,5% dos intervalos não excederam a 20 cM.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. 1971. Princípios do melhoramento genético das plantas, Trad. BLUMENSCHNEIN, A. et al., São Paulo, Edgard Blucher Ltda. 381p.
- BECKER, J.; VOS, P.; KUIPER, M.; SALAMINI, F. e HEUN, M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, 249:65-73
- BETTENCOURT, A.J. 1973. Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timor'. Circular n. 23. Instituto Agrônômico. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. 20p.
- BOAVENTURA, Y.M.S. e CRUZ, N.D. 1987. Citogenética do híbrido interespecífico (*Coffea arabica* L. var. Bourbon x *C. canephora* Pierre ex Froehner var. Robusta (Linden Chev.) que originou o café Icatu. *Turriaba*, 37(2):171-178.
- BÖRNER A. e KORZUN V (1998) A consensus linkage map of rye (*Secale cereale* L.) including 374 RFLPs, 24 isozymes and 15 gene loci. *Theor Appl Genet*, 97:1279-1288
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.H. e DAVIS, R.W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Human Genet*, 32:314-331.
- BOUHARMONT, J. 1959. Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre *Coffea*. Bruxelles, Institut Nationale pour l'étude agronomique du Congo Belge, 94p. (séries scientifique n.77).
- CARVALHO, A. 1952. Taxonomia de *Coffea arabica* L. VI Caracteres morfológicos dos haplóides. *Bragantia*, 12(4-6):201-212.

- CAUSSE, M.A.; FULTON, T.M.; CHO, Y.G.; AHN, S.N.; CHUNGWONSE, J.; WU, K.; XIAO, J.; YU, Z.; RONALD, P.C.; HARRINGTON, S.E.; SECOND, G.; MCCOUCH, S.R. e TANKSLEY, S.D. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on a near-isogenic backcross population. *Genetics*, 138:1251-1274
- CHARRIER, A. e BERTHAUD, J. 1985. Botanical classification of coffee. p. 13-47. In: CLIFFORD, M.N. e WILLSON, K.C. *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*. The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, USA, 1985. 457p.
- EMERSON, R.A.; BEADLE, G.W. e FRASER, A.C. 1935. A summary of linkage studies in maize. *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir* 180
- EUJAYL, I.; BAUM, M.; ERSKINE, W.; PEHU, E. e MUEHLBAUER, F.J. 1997. The use of RAPD markers for lentil genetic mapping and the evaluation of distorted F<sub>2</sub> segregation. *Euphytica*, 96:405-412
- EUJAYL, I.; BAUM, M. e POWELL, W. 1998. A genetic linkage map of lentil (*Lens sp.*) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theor Appl Genet*, 97:83-89
- FELDMAN, M. 1965a. Further evidence for natural hybridization between tetraploid species of *Aegilops* section *Pleionathera*. *Evolution*, 19:162-174
- FELDMAN, M. 1965b. Chromosome pairing between differential genomes in hybrids of tetraploid *Aegilops* species. *Evolution*, 19:563-568
- FELDMAN, M. 1993. Cytogenetic activity and mode of action of the pairing homoeologous (*Ph1*) gene of wheat. *Crop Sci*, 33:894-897
- FOISSET, N.; DELOURME, R.; BARRET, P.; HUBERT, N.; LANDRY, B.S. e RENARD, M. 1996. Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled-haploid progeny. *Theor Appl Genet*, 93:1017-1025
- GELDERMANN, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor. Appl. Genet.*, v.46, n.1, p.319-330.
- GRASSIAS, M. E KAMMACHER, P. 1975. Observations sur la conjugaison chromosomique de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé*, XIX (3): 177-190.
- JOUBEUR, T.; VIRUEL M.A.; VICENTE, M.C.; JAUREGUI, B.; BALLESTER, J.; DETTORI, M.T.; VERDE, I.; TRUCO, M.J.; MESSEGUER, R.; BATLLE, I.; QUARTA, R.; DIRLEWANGER, E.; ARÚS, P. 1998. Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using almond x peach F<sub>2</sub> progeny. *Theor Appl Genet*, 97:1034-1041

- KAMMACHER, P. e CAPOT, J. 1972. Sur les relations caryologiques entre *Coffea arabica* et *Coffea canephora*. Café Cacao Thé, XVI(4):289-294
- KOSAMBI DD (1944) The estimation of mapa distances from recombination values. Ann Eugen, 12:172-175
- KRUG, C.A. e CARVALHO, A. 1951. The genetic of *Coffea*. Advanc. Genet. 4:127-158.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BRALOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E. e NEWBURG, L. 1987. MAPMAKER: na interactive computer package for construction primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics, 1:174-181
- LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBES, M.C. e CHARRIER, A. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica, 87:59-64
- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F. e CHARRIER, A. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. Mol Gen Genet, 261:259-266.
- LASHERMES, P.; PACZEK, V.; TROUSLOT, P.; COMBES, M.C.; COUTURON, E. e CHARRIER, A. 2000. Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* x *C. canephora* . The Journal of Heredity. 91(1):81-85.
- LIU, L.C. e SCHOOLER, A.B. 1965. *Hordeum depressum* Rybd x allotetraploid (*H. marinum* Huds x *H. pusillum* Nutt.). Cytologia, 30:201-204
- MACARTHUR, J.W. 1934. Linkage groups in tomato. J Genet, 29:123-133
- MEDINA-FILHO, H.P.; CARVALHO A.; SONDAHL, M.R.; FAZUOLO, L.C. E COSTA, W.M. 1984. Coffee breedind and related evolutionary aspects. In: JANICK, J. (ed) Plant breeding reviews, Westport, AVI, 1984. V.2.p.157-193.
- MULLIS, K. e FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. Methods Enzymolo, 55(2):335-350.
- O'DONOUGHUE, L.S.; KIANIAN, S.F.; RAYAPATI, P.J.; PENNER, G.A.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W.; LEE, M.; FEDAK, G.; MOLNAR, S.J.; HOFFMAN, D.; SALAS, C.A.; WU, B.; AUTRIQUE, E. e DEYNZE, V. 1995. A molecular linkage map of cultivated oat. Genome, 38:368-380.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R. e POWEL, W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor Appl Genet, 87:934-940

- OWUOR; J.B.O. 1985. Interespecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P.ex Fr II. Meiosis in F<sub>1</sub> hybrids and backcrosses to *C. arabica*. *Euphytica*, 34:355-360.
- PAILLARD, M.; DUCHATEAU, N. e PÉTIARD, V. 1993. Diversité génétique de quelques groupes de caféiers: utilisation des outils moléculaires, RFLP et RAPD. ASIC, 15<sup>e</sup> Colloque, Montpellier, pp 33-40
- PAILLARD, M.; LASHERMES, P. e PÉTIARD, V. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theor Appl Genet*, 93:41-47
- PINTO-MAGLIO, C.A.F. e CRUZ, N.D. 1998. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. *Caryologia*, 51(1):19-35
- PLOMION, C.; BAHRMAN, N.; DUREL, C.E. e O'MALLEU, D.M. 1995. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity*, 74:661-668
- REINISCH, A.J.; DONG, J.; BRUBAKER, C.L.; STELLY, D.M.; WENDEL, J.F. e PATERSON, A.H. 1994. A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics*, 138:829-847.
- RIJO, L. 1974. Observações cariológicas no cafeeiro "Híbrido de Timor". *Portugaliae Acta Biologica, Serie A, Vol. XIII, Nº1-2:157-168.*
- RILEY, R. e CHAPMAN, V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behavior of hexaploid wheat. *Nature*, 132:713-715.
- RILEY, R.; CHAPMAN, V. e KIMBER, G. 1960. Position of the gene determining the diploid-like meiotic behaviour of wheat. *Nature*, 186:59-160
- SCHOOLER, A.B. 1963. Wild barley hybrides IV *Hordeum depressum* x Allotetraploid (*H. compressum* x *H. pusillum*). *Jour Hered*, 54:130-132
- SHAPPLEY, Z.W.; JENKINS, J.N.; MEREDITH, W.R. e McCARTY, J.C. 1998. An RFLP linkage map of upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. *Theor Appl Genet*, 97:756-761.
- SCHON, C.C.; LEE, M.; MELCHINGER, A. E.; GUTHRIE, W.D. e WOODMAN, W.L. 1993. Mapping and characterization of quantitative trait loci affecting resistance against second generation European corn borer in maize with the aid of RFLPs. *Heredity*, 70:648-659
- SPADA, A.; CAPORALI, E.; MARZIANI, G.; PORTALUPPI, P.; RESTIVO, F.M.; TASSI, F. e FALAVIGNA, A. 1998. A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. *Theor Appl Genet*, 97:1083-1089

- SYBENGA, J. 1972. General cytogenetics. 359pp. North Holland Publ., Amsterdam.
- TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; DE VICENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W.; BROUN, P.; FULTON, T.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RODER, M.S.; WING, R.A.; WU, W. e YOUNG, N.D. 1992. High-density molecular-linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132:1141-1160.
- VUYSTEKE, M.; MANK, R.; ANTOISE, R.; BASTIAANS, E.; SENIOR, M.L.; STUBER, C.W.; MELCHINGER, A.E.; LUBBERSTEDT, T.; XIA, X.C.; STAM, P.; ZABEAU, M. e KUIPER, M. 1999. Two high-density AFLP® linkage maps *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor Appl Genet* 99:921-935.
- WANG, D.; KARLE, R.; BRETTIN, T.S. E IEZZONI, A.F. 1998. Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers. *Theor Appl Genet* 97:1217-1224
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. e TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.