

*Capítulo 7*

## **MELHORAMENTO DO CAFEIEIRO: ÊNFASE NA APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES**

Eveline Teixeira Caixeta

Kátia Nogueira Pestana

Rosa Karla Nogueira Pestana

O melhoramento genético de plantas constitui em metodologias para a criação, seleção e fixação de plantas contendo fenótipos superiores, visando o desenvolvimento de cultivares melhoradas para as necessidades dos agricultores e consumidores. Dessa forma, o melhoramento de plantas tem sido definido como “a ciência e a arte de modificar as plantas em benefício da sociedade” ou “a ciência, arte e o gerenciamento dos recursos visando o aperfeiçoamento das plantas para o benefício da sociedade”. Como arte, o melhoramento depende da intuição e das experiências passadas que são únicas para cada melhorista, e como ciência, depende dos princípios da agronomia, genética e outras ciências correlatas. No entanto, a tendência é aumentar a “ciência” e depender menos da arte para tornar o processo cada vez mais eficiente. Dessa forma, o programa de melhoramento eficiente é aquele que, além da intuição do melhorista, se baseia no amplo conhecimento da cultura, biologia da planta, genética clássica, genética de populações, biometria e genética quantitativa, citogenética, genética molecular, fisiologia da planta e processo evolutivo da cultura.

Como é um processo multidisciplinar, a obtenção de uma nova cultivar, demanda acúmulo de amplo conhecimento sobre a espécie e sobre as características que nela se deseja melhorar. Além disso, o processo de melhoramento genético consiste em um trabalho de longo prazo e, muitas vezes, quando se desenvolve uma nova cultivar, outros problemas aparecem, fazendo com que se estabeleça um constante desafio aos melhoristas de sempre buscar novas cultivares. Deve-se considerar também que, dependendo da espécie a ser trabalhada, especialmente as perenes, muitas vezes o surgimento de novos problemas agrônômicos é mais

dinâmico do que a capacidade de resposta dos programas de melhoramento. Faz-se então necessário, adicionar novas tecnologias, capazes de incrementar a dinâmica e a capacidade de resposta na obtenção de cultivares melhoradas.

Os avanços da biotecnologia ocorridos nos últimos anos, certamente concorrerão para dinamizar esse processo. O potencial da biotecnologia no melhoramento, especialmente o uso de marcadores moleculares, está, não só na redução do tempo de condução do programa, mas também na base científica sólida que pode explicar a genética e a bioquímica das mudanças que ocorreram ou que poderão ocorrer no processo de melhoramento genético. Por exemplo, o isolamento e a análise de genes que codificam enzimas envolvidas em importantes processos, juntamente com o conhecimento da organização e modo de ação das sequências que regulam os genes podem direcionar as mudanças em algumas características de forma mais planejada. Mesmo não conhecendo todos os componentes genéticos envolvidos em uma característica, marcadores moleculares podem ser importantes para localizar regiões cromossômicas, normalmente chamadas de QTL (*Quantitative Trait Loci*), que afetam a característica. Dessa forma, é possível manipular genes ou blocos gênicos desejáveis com maior precisão e rapidez. Essa tecnologia tem, também, potencial para auxiliar na localização e identificação de genes maiores que podem estar mascarados por outros genes. As novas tecnologias, com destaque ao uso de marcadores moleculares, vêm então associar aos procedimentos de melhoramento denominados tradicionais, dotando os mesmos de maior versatilidade na solução dos mais variados problemas agronômicos.

## **1. MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS**

Os marcadores moleculares constituem ferramentas poderosas, auxiliares, perfeitamente incorporáveis aos procedimentos de melhoramento. Os mesmos podem ser empregados em praticamente todas as etapas de melhoramento de uma espécie. Esses marcadores têm sido rotineiramente usados na manutenção e caracterização de germoplasma, especialmente, na determinação da variabilidade genética disponível, na distância genética entre possíveis genitores e na escolha

de genitores para cruzamentos e para formação de populações.

Outra aplicação dos marcadores de DNA consiste em sua utilização como ferramenta auxiliar nos procedimentos de seleção. A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é baseada no conceito de que é possível inferir a presença de um gene pela presença de uma marca genética que está estreitamente ligada ao gene. O uso de marcadores ligados a genes de interesse é de grande importância na seleção de genótipos, principalmente quando o programa de melhoramento tem como objetivo introduzir dois ou mais genes, quando o fenótipo é de determinação complexa, ou quando o processo de avaliação requer destruição da planta.

A SAM pode ser aplicada em diferentes métodos de melhoramento de plantas. Em programas de retrocruzamento, a aplicação dos marcadores permite a recuperação mais rápida do genoma do parental recorrente, que tem a maioria das características agrônômicas desejáveis, permitindo a incorporação do gene de resistência que estava presente no parental doador. Nesse método, geralmente, recomenda-se de seis a oito gerações para a recuperação do genoma do parental recorrente. Com o uso de marcadores moleculares pode-se reduzir o número de gerações pela metade, além de monitorar a presença do gene de interesse sem a necessidade de fenotipagem.

Os marcadores moleculares podem também ser utilizados em outros métodos de desenvolvimento de segregantes superiores como é o caso da seleção recorrente. Os mesmos podem ser utilizados desde a formação de uma população base, como também, em cada ciclo da seleção recorrente. Por exemplo, após a etapa de avaliação dos genótipos, as distâncias genéticas entre os genótipos selecionados podem ser determinada, permitindo promover a recombinação apenas do conjunto de genótipos mais divergentes, assegurando a preservação da variabilidade genética na população recombinada e, conseqüentemente, propiciando maiores ganhos genéticos nos ciclos futuros. Isto faz com que a seleção recorrente, uma estratégia clássica de melhoramento de elevado potencial de ganhos genéticos, seja ainda mais promissora.

Mesmo após o melhoramento, os marcadores de DNA podem ser utilizados para *fingerprinting* das cultivares desenvolvidas e recomendadas. Muitas vezes, para determinadas espécies, com o incremento do número de cultivares

recomendadas, fica quase impraticável a identificação das mesmas apenas pela diferenciação de atributos fenotípicos morfo-agronômicos. Além do aspecto da identificação per se dos genótipos, o DNA *Fingerprinting* possibilita também um monitoramento da pureza genética das sementes produzidas e distribuídas aos produtores.

Além da aplicação direta no melhoramento, os marcadores têm sido utilizados para geração de conhecimentos que são importantes para aumentar a eficiência das estratégias dos melhoristas. Eles são essenciais para a construção de mapas genéticos, com destaque no mapeamento e análise de herança qualitativa ou de regiões genômicas associadas a caracteres quantitativos, os QTL. Ao analisar os QTLs, ao invés de se conhecer a herança de uma característica, se determina a herança dos componentes genéticos determinantes de tal característica. Essa metodologia permite, para cada QTL, a localização genômica, a quantificação do efeito do mesmo e o conhecimento da ação gênica. É possível, ainda, determinar a existência ou não de epistasias, ou seja, de interações entre os distintos QTLs relacionados com a característica. Após todas estas determinações, seguramente facilita ao melhorista, a tomada de decisão sobre a melhor estratégia a ser empregada no programa.

## 2. MELHORAMENTO GENÉTICO DO CAFEIEIRO

O gênero *Coffea* é representado por mais de 100 espécies, sendo apenas *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre as espécies cultivadas. A espécie *C. arabica* é a mais comercializada mundialmente, devido a sua superioridade na qualidade da bebida. Essa espécie é alotetraplóide ( $2n=4x=44$ ), autógama, adaptada aos locais de altitudes elevadas e clima ameno. Já os cafeeiros da espécie *C. canephora*, também chamados de café Conilon ou Robusta, são diploides ( $2n=2x=22$ ), com autoincompatibilidade genética do tipo gametofítica, reproduzem-se por fecundação cruzada e são adaptados a regiões de altitudes mais baixas e temperaturas mais elevadas. Essa espécie apresenta maiores quantidades de cafeína, sólidos solúveis e oferece corpo à bebida, portanto, tem sido explorada comercialmente em misturas (*blends*) com *C. arabica* nas indústrias de torrado e moído.

Outras espécies do gênero *Coffea*, apesar de não apresentarem valor comercial, representam importantes fontes de variabilidade genética para diferentes características agrônômicas de interesse, que são de grande valia em programas de hibridação e de melhoramento genético. Essas espécies têm importância no melhoramento por servirem de reservatório de genes, os quais não são encontrados em *C. arabica* e *C. canephora*. Como *C. arabica* é a espécie de maior importância econômica, aqui será abordado apenas o melhoramento genético dessa espécie.

Os avanços alcançados pelo melhoramento genético do cafeeiro arábica têm proporcionado a obtenção e recomendação de um grande número de cultivares adaptadas às várias regiões do país. Essas cultivares apresentam importantes características que a elas foram incorporadas pelo processo de melhoramento como: produtividade elevada, estável e com precocidade na primeira colheita; maturação uniforme; tolerância à geada, à seca e ao alumínio tóxico; porte baixo e formato de copa adequado para colheita mecanizada; arquitetura adequada para adensamento; elevado tamanho de grão e qualidade de bebida; e resistência ou tolerância a pragas e doenças (CARVALHO, 2008).

O cafeeiro arábica se reproduz predominantemente por autofecundação e é comercialmente propagado por sementes, sendo assim, as estratégias de melhoramento genético visam o desenvolvimento de cultivares homozigotas para que, por sementes, deem origem a lavouras uniformes. Dessa forma, os métodos mais utilizados são a introdução, seleção de plantas individuais seguida de teste de progênie, método genealógico e retrocruzamento (SAKIYAMA et al., 1999; CARVALHO, 2008). A seleção recorrente recíproca e o método SSD (*Single Seed Descent*) também têm sido utilizados, porém em menor escala. Independente da estratégia utilizada, o melhoramento genético busca melhorar as características de interesse, utilizando a variabilidade pré-existente ou obtendo-a por meio da hibridação de genótipos.

No histórico do melhoramento do cafeeiro no Brasil, os primeiros trabalhos de seleção foram iniciados em 1932 e até a década de 1960 os objetivos eram direcionados ao desenvolvimento de cultivares com alta produção, vigor, longevidade e adaptadas às diferentes regiões do país. Após 1970, com o aparecimento da ferrugem do cafeeiro e sua rápida dispersão nas lavouras

brasileiras, enorme ênfase foi dada ao melhoramento para resistência a essa doença e novos programas de melhoramento foram iniciados em diversas instituições. A partir de então, resistência à ferrugem e outras doenças passou a ser um dos principais objetivos dos programas de melhoramento dessa espécie. Mesmo já tendo sido lançadas e recomendadas diversas cultivares de café com resistência a doenças, tem sido um consenso de que a resistência genética a doenças jamais poderá ser negligenciada, pois a interação planta-patógeno é parte do processo dinâmico normal dos seres vivos. O resultado da interação desses dois organismos tem consequências na durabilidade da resistência das cultivares. Dessa forma, a resistência de muitas cultivares tem sido efetiva por apenas um período curto de tempo devido a emergência de novos genótipos do patógeno, os quais a variedade é suscetível.

As principais doenças do cafeeiro, foco dos programas de melhoramento, são a ferrugem, *Coffee Berry Disease* (CBC) e nematoides. A ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, devastou plantações de café no Sri Lanka, em 1868, levando a substituição desta bebida por chá (MEDINA-FILHO et al., 1984). Essa é considerada a principal doença do cafeeiro e verifica-se sua ocorrência em todas as regiões produtoras de café do mundo (VAN DER VOSSSEN, 2005). Diferentes fontes de resistência para essa doença têm sido identificadas e utilizadas no melhoramento genético do café arábica. Introduções de cafeeiros de *C. arabica* originados da Índia e África são portadores dos genes  $S_H1$ ,  $S_H2$  e  $S_H4$  (BETTENCOURT & NORONHA-WAGNER, 1971). O  $S_H5$  encontra-se em diferentes variedades comerciais. Esses quatro genes já foram suplantados pelos patógenos que ocorrem no Brasil, não sendo, atualmente, mais utilizados como fonte de resistência. Em cafeeiros da espécie *C. canephora* e híbridos interespecíficos (*C. arabica* x *C. canephora*), como Híbrido de Timor e Icatu, estão presentes pelo menos os genes  $S_H6$ ,  $S_H7$ ,  $S_H8$  e  $S_H9$  (BETTENCOURT et al., 1980).  $S_H3$  tem origem em *C. liberica* e foi introduzido em *C. arabica* na Índia (BETTENCOURT & RODRIGUES, 1988). No Brasil, este gene está sendo transferido para cultivares tradicionais. Fontes de resistência em outras espécies como *C. pseudozanguebariar* e *C. salvatrix* já foram identificadas (RODRIGUES JR. et al., 1975), no entanto, são menos utilizadas no melhoramento, devido a maior distância dessas espécies com *C. arabica* e inexistência de híbridos naturais.

A ocorrência de CBD, outra doença de grande importância, ainda se encontra restrita ao continente da África, onde é, juntamente com a ferrugem, um dos principais entraves para a produção sustentável e econômica de café arábica nessa região. Essa doença, causada por *Colletotrichum kahawae*, corresponde a uma antracnose que pode causar perdas graves na safra de café sempre que as condições climáticas são favoráveis ao patógeno (VAN DER GRAAFF, 1978; MASABA & WALLER, 1992). Os danos causados nos países onde ocorre esta doença, tem levado todos os países produtores de café, mesmos os que ainda não apresentam a doença, a buscar cultivares resistentes, em programas de melhoramento preventivo. Já foram identificados até o momento três genes maiores controlando a resistência a essa doença, o gene T encontrado no Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*) e em Catimor, gene R identificado em Rume Sudan e gene k encontrado em Rume Sudan e K7 (VAN DER VOSSSEN & WALYARO, 1980; AGWANDA et al., 1997).

O outro grande problema enfrentado pelos cafeicultores são os nematoides. Os prejuízos causados pelos nematoides, *Meloidogyne spp.*, é observado em muitas regiões produtoras de café no Brasil e no mundo. Das espécies de nematoides que ocorrem no Brasil, as de maior importância são *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaense* (CAMPOS et al., 1990; NOIR et al., 2003). Resistência ao *M. exigua* tem sido encontrada em várias espécies diploides, como *C. bengalis*, *C. congensis*, *C. dewvrei*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. liberica*, *C. racemosa*, *C. salvatrix*, e *C. stenophylla* (MEDINA-FILHO et al., 1984) e em algumas introduções de arábica da Etiópia e cafeeiros do grupo Icatu e Híbrido de Timor. A cultivar Apoatã de *C. canephora* apresenta genes de resistência para *M. incognita* e *M. paranaense*.

O melhoramento para resistência a doenças no cafeeiro tem sido baseado em resistência completa, altamente específica, geralmente controlada por um ou por poucos genes. Este tipo de resistência parece muito atraente para os produtores, uma vez que geralmente confere imunidade contra as raças predominantes no ecossistema que foram desenvolvidos. No entanto, este tipo de resistência, na maioria das vezes, apresenta menor durabilidade, devido à evolução da virulência do fungo. Atualmente, novos métodos têm sido propostos visando incorporar, também, a resistência incompleta ou quantitativa.

Um dos métodos de melhoramento propostos para obtenção de cultivares de cafeeiros resistentes, e talvez o mais antigo, é a introdução. Como o cafeeiro é uma espécie de origem exótica, seu cultivo no Brasil iniciou por meio de introdução em 1727. Outras introduções foram realizadas com o objetivo de melhorar a cultura ou aumentar a variabilidade (DECHEN & POMMER, 2007). Nesse sentido, foram recebidos diferentes materiais vegetais resistentes à ferrugem da Índia e África, bem como híbridos ou derivados de híbridos interespecíficos contendo genes de resistência a essa e outras doenças como o CBD e nematoides. Nesse método, os cafeeiros introduzidos, contendo genes de resistência, simples ou principalmente associados, foram avaliados visando à seleção de café produtivo e resistente.

Apesar de a introdução ser um método utilizado, a maioria das cultivares de café resistentes a doenças foram obtidas por uma ou várias hibridações seguidas ou alternada por autofecundações e seleções genealógicas (método genealógico).

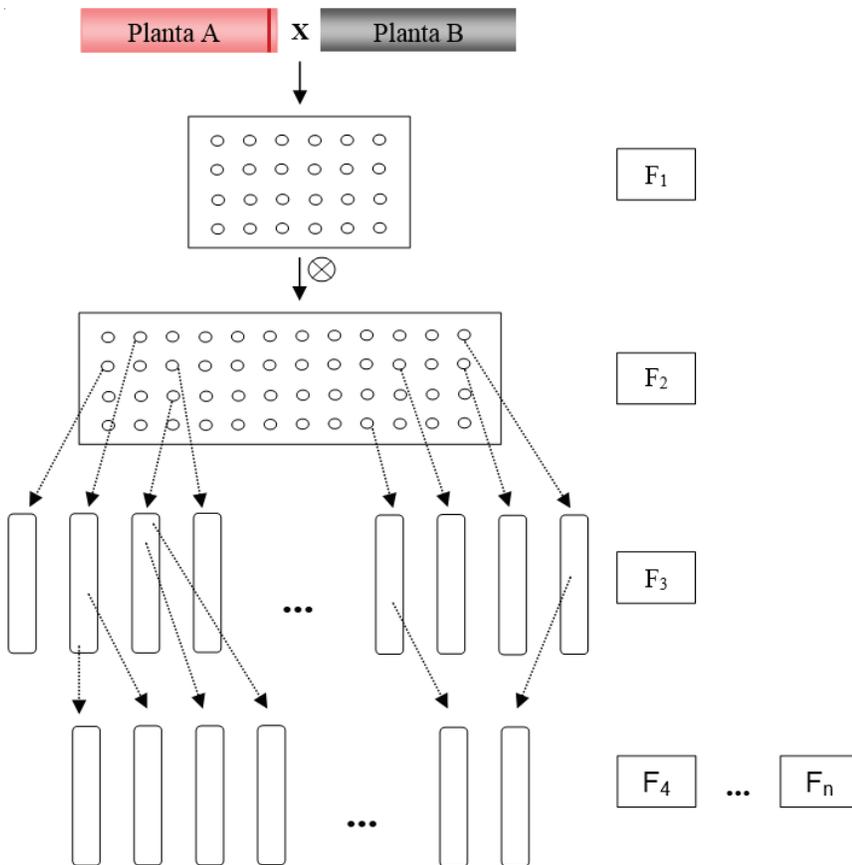
O método genealógico está esquematizado na Figura 1. Se inicia pela hibridação entre cafeeiros, podendo ser intra ou inter específicas ou ainda simples, duplas ou múltiplas. A seleção pode ser iniciada na geração  $F_1$ , caso as plantas apresentem variabilidade, ou mais comumente realizada na  $F_2$ . Em cada geração, as melhores plantas são selecionadas e suas progênies são avaliadas, selecionando as melhores progênies e as melhores plantas dentro das melhores progênies. As plantas assim selecionadas dão origem a progênies para novo ciclo de seleção genealógica.

É frequente também o uso do método de retrocruzamento conduzido ou não com autofecundações entre os retrocruzamentos. Esta estratégia é utilizada quando se deseja transferir um ou poucos genes de genótipos não adaptados ou de espécies selvagens para genótipos elite. Esse método deve ser utilizado, por exemplo, quando se tem uma cultivar muito plantada em uma região, mas que, no entanto, apresenta suscetibilidade a um patógeno importante, e que pode colocar em risco o seu plantio. Nesse caso, o genótipo resistente ao patógeno é denominado de parental doador e o genótipo elite, de parental recorrente.

O processo de retrocruzamento inicia-se com o cruzamento entre o parental doador e o recorrente, obtendo-se o híbrido  $F_1$ . Indivíduos que possuem a resistência do parental doador são repetidamente cruzados (retrocruzado) com o parental recorrente (Figura 2). Após vários ciclos, espera-se que a planta resultante

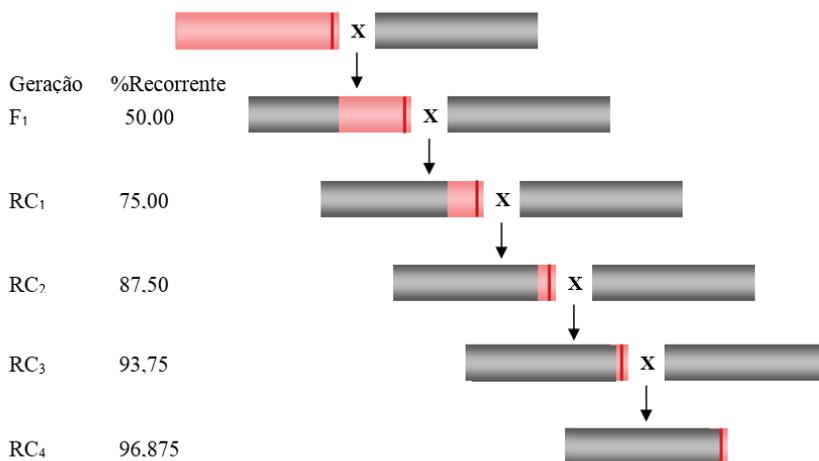
contenha as características desejáveis do genótipo elite e a resistência do doador.

A cada geração de retrocruzamento, a proporção do genoma do doador é reduzida, em média, pela metade (Figura 2). O termo média foi utilizado porque a progênie formada em cada geração de retrocruzamento é variável, tendo indivíduos com maior proporção do recorrente e outros com menor. Outro aspecto importante é que na progênie de cada retrocruzamento, existem indivíduos contendo o gene de resistência e outros que não apresentam o gene. Portanto, deve-se fazer seleção em todas as gerações, de forma a utilizar nos cruzamentos apenas os indivíduos contendo o gene, para formar a próxima geração.



**Figura 1.** Esquema do método genealógico.

O programa de melhoramento genético é sempre dinâmico, e parte da população que está sendo conduzida por um método, pode ser continuada por outro, tornando, por isso, às vezes, difícil de se denominar o método utilizado.



**Figura 2.** Esquema do método de retrocruzamento. A barra vermelha representa o gene de resistência que se deseja transferir.

### 3. MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DO CAFEIEIRO

Diversas pesquisas têm mostrado que a diversidade genética de café arábica é baixa devido à sua estreita base genética associada a autogamia, história evolutiva, domesticação e processo de melhoramento. Trabalhando com coeficiente de parentesco em *C. arabica*, Setotaw et al. (2013) observaram que apenas sete ancestrais contribuíram com 97,55% da base genética das principais variedades recomendadas no Brasil. Bourbon Vermelho contribui com 52,76%, seguido de Sumatra (19,05%), Híbrido de Timor (11,59%), Amarelo de Botucatu (4,49%), Villa Sarchi (4,09%), *C. canephora* tetraploide (3,52 %) e Catimor (2,04%).

Esta estreita base genética tem se refletido em diferentes formas, que

incluem a falta de genótipos resistentes a várias pragas e doenças. A incorporação de resistência a pragas e doenças em *C. arabica* tem sido possível por meio de cruzamentos com outras espécies de café. No entanto, *C. arabica* é a única espécie cafeeira tetraploide, as demais são diploides. O aproveitamento de espécies diploides no desenvolvimento de novas cultivares de arábica não é, portanto, tarefa fácil. Aneuploidia, autoincompatibilidade, maturação tardia, grãos defeituosos, sabores estranhos e outras características indesejáveis estão comumente associadas quando se faz a introgressão de genes de outras espécies silvestres. Essas dificuldades aliadas ao ciclo longo do cafeeiro, às dificuldades inerentes a avaliação de características qualitativas e quantitativas e ao desconhecimento das complexas interações genéticas dificultam em muito a execução dos programas de melhoramento. No entanto, as novas tecnologias como os marcadores moleculares poderão efetivamente, se bem empregadas, minimizar e acelerar tais programas.

Dessa forma, o uso de marcadores moleculares tem sido utilizado como estratégia auxiliar em várias etapas do programa de melhoramento do cafeeiro.

### 3.1. Filogenia e evolução

Devido a necessidade de uso de diferentes espécies no melhoramento do cafeeiro arábica, os melhoristas buscam conhecer e estudar as demais espécies de *Coffea*. Foi realizado um estudo de filogenia molecular em *Coffea*, usando-se marcadores para detectar variação na sequência da região ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) e do DNA do cloroplasto (cpDNA), indicando as espécies mais próximas e as mais distantes geneticamente de *C. arabica*. Foi também sugerido que o baixo nível de variação de cpDNA exibido por espécies de café está provavelmente relacionada com a origem recente do gênero *Coffea* (LASHERMES et al., 1996; CROS et al., 1998).

A constituição do genoma e a origem de *C. arabica* também têm sido objetos de extensiva investigação. Estudos utilizando marcadores RFLP (*Restriction Fragment length polymorphism*), FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) e GISH (*Genomic in situ Hybridization*) demonstraram que *C. arabica* é um alotetraploide, resultante da hibridação natural de *C. eugenioides* com *C. congensis* (RAINA et al., 1998) ou com *C. canephora* (LASHERMES

et al., 1999). Além disso, trabalhos com marcadores RFLP sugeriram que, na meiose, os cromossomos homeólogos de *C. arabica* não pareiam, não devido à diferenciação estrutural, mas sim a fatores de regulação de pareamento (LASHERMES et al., 2000). Essas informações geradas são essenciais para o melhoramento dessa espécie.

### **3.2. Caracterização de Banco de Germoplasma**

Bancos de germoplasma constituem-se em fontes de genes essenciais aos programas de melhoramento, por reunirem constituições genéticas de diferentes origens e diferentes níveis de melhoramento (VIEIRA et al., 2008). Nesse sentido, são considerados repositórios de material genético e representam a variabilidade genética disponível de uma determinada espécie de interesse. Para que essa variabilidade presente nos bancos, seja utilizada com frequência e eficiência nos programas de melhoramento, torna-se necessário à caracterização do germoplasma disponível.

De modo geral, caracterizar um germoplasma significa basicamente identificar diferenças entre os acessos da coleção e estimular a utilização desses acessos em programas de melhoramento (FERREIRA et al., 2007). Desse modo, a caracterização busca avaliar a diversidade genética do germoplasma disponível, sendo uma ferramenta poderosa para acessar esse conhecimento. Entre as formas para avaliar essa diversidade, destaca-se a caracterização molecular, a qual oferece técnicas capazes de amostrar a diversidade genética diretamente no genoma, sem influência do ambiente, gerando informações precisas sobre a variabilidade genética.

A caracterização molecular tem sido utilizada para revelar a diversidade genética dos acessos de café, fornecendo novas ferramentas para a conservação e a utilização mais eficiente dos recursos genéticos pelos melhoristas. Os dados moleculares são úteis na avaliação da redundância e de deficiências das coleções de germoplasma, gerando informações sobre a eficiência do processo de coleta, manutenção e ampliação de um banco de germoplasma. Além disso, o estudo da diversidade molecular fornece informações fundamentais para auxiliar os melhoristas na escolha de genitores, que poderão integrar esquemas de

cruzamentos, bem como no direcionamento do enriquecimento da base genética durante o andamento de um programa de melhoramento.

Marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) foram utilizados para a caracterização e estimação de distâncias genéticas entre acessos do banco de germoplasma de diferentes programas de melhoramento do cafeeiro do Brasil. Teixeira-Cabral et al. (2002) estimaram que a reprodutibilidade dos marcadores RAPD foi de 76,88% e recomendaram a utilização de dados replicados para distinguir genótipos geneticamente próximos. Costa et al. (2002) compararam a eficiência dos marcadores morfológicos e moleculares para caracterização de acessos de cafeeiros aparentados. Dados de agrupamento com base em distâncias genéticas entre 23 linhagens de Catimor, medidas com marcadores RAPD, foram coerentes com os dados de genealogia dessas linhagens, mostrando que estes marcadores foram mais eficientes para diferenciar grupos de linhagens de Catimor do que descritores morfológicos comumente utilizados.

Devido a algumas desvantagens inerentes a técnica de RAPD, atualmente, outros marcadores têm sido usados para acessar com mais eficiência a variabilidade genética de acessos de *Coffea*. Nesse sentido, muitas informações de grande utilidade para o melhoramento estão sendo geradas com marcadores ISSR (*Inter-simple Sequence Repeat*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Missio et al. (2009) comprovaram a eficiência do uso de marcadores SSR para estimar a distância genética de acessos e cultivares aparentadas de *C. arabica* e híbridos interespecíficos como Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*). Nesse trabalho, foram identificados os acessos de Híbrido de Timor mais distantes de *C. arabica*, propondo usá-los para ampliar a base genética nos programas de melhoramento. O Híbrido de Timor CIFC 1343/269, resistente à ferrugem, se mostrou mais próximo geneticamente dos cafés arábica, podendo ser útil no melhoramento para incorporar um ou mais de seus genes de resistência que são oriundos de *C. canephora*, mantendo as demais características desejadas de *C. arabica*. Um conjunto maior de acessos de Híbrido de Timor foram analisados por Setotaw et al. (2010), usando marcadores RAPD, SSR e AFLP. O germoplasma analisado corresponde a 48 cafeeiros desse grupo que são largamente utilizados nos programas de melhoramento por constituírem fontes de resistência a diferentes pragas e doenças. Foi encontrada

alta diversidade genética entre os acessos, sendo determinada a estrutura genética dos mesmos. A organização da variabilidade desse germoplasma foi realizada de forma a permitir ao melhorista a escolha de genitores de acordo com o objetivo de seu programa de melhoramento. Os resultados obtidos podem ser usados, também, para a manutenção do germoplasma. Um pequeno número de cafeeiros de cada agrupamento formado pode representar o germoplasma de Híbrido de Timor, se uma sub-coleção for necessária, com a vantagem de preservar a variabilidade original com menor custo e trabalho.

Germoplasma da Nicarágua foi analisado por Geleta et al. (2012), por meio de marcadores SSR. Eles verificaram maior diversidade genética de cafeeiros do grupo Catimor. Analisando a variância de 260 plantas individuais de 26 populações, observaram que cerca de 87% da variação genética total foi encontrada dentro das populações sendo que a variação entre populações também foi significativa. Esse resultado demonstra a utilidade de incorporação de cafeeiro do grupo Catimor em programas de melhoramento.

Diversidade entre e dentro de acessos de diferentes espécies de *Coffea* e híbridos interespecíficos foram explorados por Missio et al. (2010). Verificaram que os maiores polimorfismos foram encontrados para *C. canephora* (PIC = 0,46), enquanto os menores foram para *C. arabica* (PIC = 0,22) e acessos triploides (PIC = 0,22). O baixo polimorfismo encontrado para *C. arabica* está de acordo com Baruah et al. (2003), que com marcadores SSR encontraram valores de PIC variando de 0-0,6, 0-0,78 e 0,67-0,90 para os genótipos de *C. arabica*, genótipos de *C. canephora* e cafeeiros de outras espécies, respectivamente.

Para cultivares de *C. arabica*, análises de similaridade obtidas a partir de marcadores RAPD e SSR revelaram a ocorrência de dois grupos. Um grupo incluiu a maioria das cultivares de *C. arabica* e o segundo grupo as cultivares derivadas de cruzamentos interespecíficos. Apesar de todas as técnicas moleculares empregadas permitirem a identificação de polimorfismos entre as cultivares, nenhuma delas foi capaz de estabelecer um padrão de amplificação para cada genótipo avaliado (MALUF et al., 2005). No entanto, Missio et al. (2011), trabalhando com marcadores gSSR (SSR oriundo de região genômica) e EST-SSR (SSR oriundos de sequências expressas), conseguiram diferenciar todos os genótipos estudados incluindo acessos de café arábica geneticamente relacionados. Eles identificaram

alelos exclusivos indicando-os para discriminação de acessos e *fingerprinting* de variedades de café. Determinaram ainda alelos que diferenciam acessos de *C. arabica*, de *C. canephora*, de cultivares de origem interespecífica e de híbridos interespecíficos, sendo esses locos os de maior importância para análises de discriminação de cafeeiros, e, portanto, os mais úteis para estudos de diversidade.

### 3.3. Mapa de ligação

Uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares no melhoramento de plantas é o desenvolvimento de mapas genéticos. Uma das várias vantagens de se obter o mapa de ligação de uma espécie é a disponibilidade de um referencial para nele e, por meio dele, serem localizados os genes de interesse agrônômico e elucidar as relações de ligação de tais genes. As ligações ou a independência dos genes detectadas por meio do mapa irão refletir nas estratégias de melhoramento. Além da utilidade para o melhoramento genético convencional, os mapas genéticos saturados são também úteis para posicionar e clonar precisamente um gene de interesse entre duas marcas proximamente ligadas.

A obtenção de mapeamento genético em café consiste em um grande desafio, devido ao ciclo longo da cultura, dificuldade em manter grandes populações no campo, baixo nível de polimorfismo, complicações advindas da poliploidia em *C. arabica* e ausência de grande quantidade de marcadores de DNA e sequências genômicas. Os primeiros mapas genéticos de café foram construídos em espécies diploides. Um mapa parcial de ligação foi obtido a partir de uma população de duplo-haplóides de *C. canephora*, com marcadores RFLP, formando 15 grupos de ligação e comprimento total de 1402 cM (PAILLARD et al., 1996). Posteriormente, um mapa completo para *C. canephora* foi construído com 11 grupos de ligação, cobrindo 1041 cM do genoma, usando marcadores RFLP, RAPD, AFLP, SSR e STS (*Sequence Tagged Sites*), (LASHERMES et al., 2001). Um mapa parcial também foi obtido a partir do cruzamento interespecífico entre as espécies diploides *C. pseudozanguebarie* x *C. liberica* (KY et al., 2000).

Para a espécie *C. arabica* foi construído inicialmente um mapa parcial usando marcadores AFLP em populações de pseudo-F<sub>2</sub> derivada do cruzamento

entre as cultivares ‘Tall Mokka’ e ‘Catimor’ (PEARL et al., 2004). Este mapa consistiu de 31 grupos de ligação com o número de marcadores variando de 2 a 21. O comprimento total do mapa foi de 1802,8 cM com uma distância média de 10,2 cM entre marcadores adjacentes. Outros dois mapas parciais foram construídos com marcadores RAPD. Um deles foi construído a partir de uma população de retrocruzamento derivada do Híbrido de Timor CIFIC 2570 e Mundo Novo IAC 464-18. Foram mapeados 82 marcadores RAPD em oito grupos de ligação, cobrindo uma distância de 560,6 cM do genoma (TEIXEIRA-CABRAL et al., 2004). Outro mapa também obtido de população de retrocruzamento, originado do cruzamento de outro Híbrido de Timor (UFV 445-46) com Catuaí Amarelo IAC 30, resultou em 11 grupos de ligação, com 117 marcadores RAPD, cobrindo 803,2 cM (OLIVEIRA et al., 2007). Ainda na tentativa de construir um mapa mais saturado para essa espécie, Pestana (2010) trabalhou com 110 marcadores AFLP, SSR e RAPD. Foi obtido um mapa com 94 marcadores distribuídos em 11 grupos de ligação e cobrindo 964,31 cM.

Apesar dos esforços, até o momento não se dispõe de um mapa completo para *C. arabica*, devido às dificuldades de polimorfismo e poliploidia citadas anteriormente. Visando minimizar tais dificuldades, Caixeta et al. (2012) propuseram a construção de mapas parciais usando diferentes populações e classes de marcadores de DNA e subsequente integração dos mapas. Para desenvolver, adaptar e verificar a eficiência dessa estratégia, foi construído um mapa integrado a partir de duas populações  $F_2$ . O mapa integrado ficou composto por 14 grupos de ligação com 188 marcadores moleculares do tipo RAPD, SSR e AFLP, cobrindo 1973,35 cM do genoma. A distância média entre marcadores obtida foi de 11,34 cM, sendo que apenas 18,97% dos intervalos excederam 20 cM. A eficiência da metodologia proposta foi comprovada, sendo demonstrado o aumento da resolução genética quando comparado o mapa integrado com os dois mapas parciais. Dessa forma, foi proposta a utilização dessa estratégia para pesquisas genômicas futuras como identificação de QTL, clonagem posicional e seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento do cafeeiro.

### 3.4. Seleção assistida por marcadores (SAM)

Para incorporar a SAM no melhoramento, inicialmente, são identificados marcadores moleculares ligados ao(s) gene(s) de interesse e por meio desses marcadores, a herança e a introgressão do(s) gene(s) podem ser analisadas nos programas.

Alguns marcadores moleculares ligados a genes controlando características qualitativas foram identificados em café, como resistência ao CBD, resistência à ferrugem, porte da planta e resistência a *Meloidogine exigua*.

Três marcadores RAPD ligados ao gene T que confere resistência ao CBD foram identificados por Agwanda et al. (1997). No entanto, o problema de repetibilidade desse tipo de marcador limitou seu uso na seleção assistida. Mais recentemente, Gichuru et al. (2008) identificaram e mapearam oito marcadores AFLP e dois SSR, ligados ao fenótipo de resistência a CBD. A fonte de resistência utilizada no trabalho foi o Catimor e, portanto, o gene presente provavelmente é sinônimo do gene T previamente caracterizado. Esses marcadores, principalmente os SSR, estão disponibilizados e podem ser prontamente utilizados para SAM.

Para resistência ao nematoide *M. exigua* também já foram disponibilizados marcadores que podem ser usados na seleção. Noir et al. (2003) mapearam o gene maior *Mex-1* que confere tolerância a esse nematoide com 14 marcadores AFLP ligados dentro do intervalo de 8,2 cM. A introgressão do gene *Mex-1* em linhagens de café arábica foram efetuadas por alguns programas de melhoramento genético do cafeeiro. Para confirmar a introgressão deste gene, Diniz et al. (2005), analisaram 21 progênies de Icatu e compararam com dois genótipos resistentes (Iapar 59 e Híbrido de Timor) e a cultivar suscetível Catuaí. Entre os marcadores AFLP utilizados, cinco confirmaram a presença dos fragmentos introgrididos associada à resistência ao *Mex-1*, mostrando que estes marcadores podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores moleculares.

Para a ferrugem, poucos foram os trabalhos que mapearam marcadores moleculares ligados aos genes de resistência. Dos nove genes maiores que conferem resistência a essa doença até hoje identificados, apenas dois foram mapeados, o  $S_H3$  proveniente de *C. liberica* e  $S_H?$  proveniente do Híbrido de Timor. Inicialmente, foram identificados 21 marcadores do tipo AFLP ligados

ao gene  $S_H3$  (PRAKASH et al., 2004). Quatro desses marcadores AFLP foram transformados em SCAR e juntamente com outros três marcadores SCAR proveniente de extremidade de BAC e três SSR formaram dois pequenos grupos de ligação (5,7 cM e 5,9 cM) contendo o gene de resistência (MAHÉ et al., 2008). Dois desses marcadores foram utilizados por Prakash et al. (2011) para o monitoramento do gene  $S_H3$  em populações que deram origem a cultivar S.795 lançada na Índia como resistente e que apresenta resistência durável. Os mesmos marcadores foram também utilizados para piramidação de genes.

Brito et al. (2010) e Diola et al. (2011) identificaram marcadores ligados ao gene  $S_H?$ , presente em um acesso de Híbrido de Timor, que confere resistência a outras raças de *H. vastatrix*. Foi desenvolvido um mapa genético de alta densidade, primeiramente com AFLP (BRITO et al., 2010) e, posteriormente, com seis marcadores SCAR delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM e flanqueando o gene  $S_H?$  em 0,7 e 0,9 cM (DIOLA et al., 2011). Esses marcadores moleculares, por estarem proximamente ligados ao gene de resistência, podem ser utilizados para identificar esse gene  $S_H$  em populações de melhoramento que visam resistência a ferrugem por meio da SAM.

Alkimim (2013) utilizou os marcadores previamente identificados como ligados aos genes de resistência à ferrugem e à CBD, visando a identificação de genitores e seleção assistida por marcadores moleculares. Neste estudo, tais marcadores moleculares foram validados e posteriormente analisados em 160 genótipos de cafeeiro. Os dados de genotipagem permitiram identificar genótipos resistentes homozigotos para o gene  $S_H3$ , o qual confere resistência a diferentes raças de *H. vastatrix*. Também foram identificados cafeeiros que além de serem portadores do gene  $S_H3$  em homozigose, apresentaram o gene  $S_H?$  que também confere resistência à ferrugem. Para o gene *Ck-1* que confere resistência a CBD, observou-se que apenas um genótipo apresentou-se homozigoto resistente quando analisado com os dois marcadores, apesar de não apresentar bandas ligadas aos genes  $S_H3$  e  $S_H?$ . Estes resultados demonstram que os cafeeiros identificados como portadores dos diferentes genes de resistência à ferrugem e à CBD poderão ser utilizados em cruzamentos visando à introdução desses genes em genótipos de interesse nos programas de melhoramento. Além disso, a utilização de marcadores moleculares validados será imprescindível para monitoramento dos genes nas

diferentes gerações e cruzamentos, nos programas de melhoramento do cafeeiro.

Os marcadores ligados aos genes de resistências podem ser usados para selecionar plantas resistentes em diferentes métodos de melhoramento. Os marcadores moleculares possibilitam a seleção de vários caracteres ao mesmo tempo, permitem a identificação rápida de plantas geneticamente superiores em cada geração e reduzem o tamanho da população a ser conduzida em cada geração, minimizando esforços e recursos nas avaliações.

No retrocruzamento, além desses marcadores poderem ser usados para monitorar a incorporação do gene de resistência, outros marcadores distribuídos em todo o genoma podem ser usados para auxiliar na recuperação do parental recorrente. Foram feitas simulações em computador, visando medir a eficiência da SAM em *C. arabica*. A SAM foi utilizada para a escolha de 2% dos genótipos mais semelhantes geneticamente ao parental recorrente, para integrar o próximo ciclo de retrocruzamentos. Observou-se que, com apenas dois retrocruzamentos assistidos, foi possível recuperar a mesma proporção do recorrente que seria alcançada na quinta geração, na ausência da seleção assistida (FERNANDEZ & LASHERMES, 2002).

Oliveira et al. (2007) utilizaram 134 marcadores RAPD para estudar uma população de 59 plantas RC<sub>1</sub> oriundas do cruzamento entre uma linhagem do Híbrido de Timor e a cultivar Catuaí Amarelo, este utilizado como recorrente. Foi constatado que 15 plantas apresentaram mais do que 81% de recuperação do genoma do Catuaí, tendo, dessas plantas, duas exibido 92% de recuperação, com apenas um retrocruzamento.

### **3.5. Caracterização de cultivares melhoradas**

Em virtude da baixa diversidade genética observada entre cultivares de *C. arabica*, descritores morfo-agronômicos não têm sido, na maioria das vezes, eficientes para identificar as cultivares e permitir a diferenciação entre elas. Portanto, a inclusão dos padrões moleculares pode auxiliar a caracterização das cultivares de *C. arabica*, auxiliando não só no registro, mas também na proteção desses materiais genéticos. Com esse propósito, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), marcadores RAPD foram utilizados para estimar as distâncias genéticas

entre 16 linhagens comerciais de *C. arabica* e, apesar da pequena variabilidade total, verificaram-se locos polimórficos mesmo entre linhagens bastante aparentadas. Caracterização da variabilidade genética de linhagens comerciais de *Coffea* desenvolvidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) foi, também, realizada utilizando marcadores RAPD, SSR e AFLP (SILVESTRINI et al., 2000).

Estudos realizados por Sousa (2013) objetivou caracterizar molecularmente (*fingerprinting*) 34 cultivares de café arábica portadoras de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.), utilizando marcadores SSR. Foram analisadas seis plantas por cultivar, o que permitiu verificar a possível ocorrência de variabilidade genética entre e dentro dos materiais genéticos avaliados. Um total de trinta e um *primers* microssatélites foram testados, destes, 27 amplificaram e 20 mostraram-se polimórficos. A partir da genotipagem com 16 marcadores polimórficos selecionados, foi construído um dendograma e o perfil molecular das cultivares foi estabelecido de duas maneiras distintas. As informações obtidas a partir da análise de *fingerprinting* permitiram definir 29 perfis moleculares únicos e a análise de agrupamento permitiu diferenciar 29 das 34 cultivares avaliadas.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGWANDA, C. O.; LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; COMBES, M. C.; CHARRIER, A. Identification of RAPD markers for resistance to Coffee Berry Disease, *Colletotrichum kahawae* in Arabica coffee. **Euphytica**, v.97, p.241–248, 1997.

ALKIMIM, E. R. **Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência múltipla à ferrugem e à antracnose dos frutos do cafeeiro**. 2013. 40f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2013.

BARUAH, A.; NAIK, V.; HENDRE, P. S.; RAJKUMAR, R.; RAJENDRAKUMAR, P.; AGGARWAL, R. K. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. **Molecular Ecology Notes**, v.3, n.4, p.647-650, 2003.

BETTENCOURT, A. J.; NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. **Agronomia Lusitana**, v. 31, p. 285-292, 1971.

BETTENCOURT, A. J.; NORONHA-WAGNER, M.; LOPES, J. Factor genetic 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 and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. In: Clarke RJ, Macrae R (Eds) **Coffee. Agronomy**, v.4. 1988, London. Elsevier Applied Science, London, p.199-234p.

BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; GALLINA, A. P.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M. E. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, v.173, n.2, p.255-264, 2010.

CAMPOS, V. P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N. C. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**, p. 387-430, 1990.

CAIXETA, E.T.; PESTANA, K. N.; SALGADO, C. C.; CAPUCHO, A. S.; QUEIROZ, T. F. N.; PORTO, B. N.; COSME, D.; MACIEL-AMBOLIM, E.; SAKIYAMA, N. S. Integration of genetic linkage maps for *Coffea arabica*. In: 24th International Conference on Coffee Science - ASIC 2012, San José - Costa Rica. **ASIC**, 2012. v. CDROM.

CARVALHO, C.HS de. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Embrapa, Brasília-DF, Brasil, 2008.

COSTA, L.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A. Diferenciação entre linhagens do café Catimor derivadas do Híbrido HW 26-5, com base em marcadores RAPD1. **Revista Ceres** v.285, n.49, p.523-531, 2002.

CROS, J.; COMBES, M. C.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; HAMON, S.; CHARRIER, A.; LASHERMES, P. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.9, p.109-117, 1998.

DECHEN, S. F.; POMMER, C. V. **O Agrônômico**. Boletim Técnico-Informativo do Instituto Agrônômico. v.56, n.1 - 2007. Série Técnica Apta.

DINIZ, L. E.; SAKIYAMA, N. S., LASHERMES, P., CAIXETA, E. T., OLIVEIRA, A. C. B., ZAMBOLIM, E. M., LOUREIRO, M. E., PEREIRA, A. A.,

ZAMBOLIM, L. Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, n.4, p.387-393, 2005.

DIOLA, V.; BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; SAKIYAMA, N. S.; LOUREIRO, M. E. High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. **Tree Genetics & Genomes**, v.7, n.6, p.1199-1208, 2011.

FERNANDEZ, D.; LASHERMES, P. Molecular tools for improving coffee (*Coffea arabica* L.) resistance to parasites. In: **Molecular techniques in crop improvement**. S Mohan Jain, DS Brar & BS Ahloowalia eds. Agritech Publications, Kluwer Academic, USA, 2002, p. 327-345.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 377-420, 2007.

GELETA, M.; HERRERA, I.; MONZÓN, A.; BRYNGELSSON, T. Genetic diversity of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as estimated by simple sequence repeat markers. **The Scientific World Journal**, p.1-11, 2012.

GICHURU, E. K.; AGWANDA, C. O.; COMBES, M. C.; MUTITU, E. W.; NGUGI, E. C. K.; BERTRAND, B.; LASHERME, P. Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, v.57, n.6, p.1117-1124, 2008.

KY, C. L.; BARRE, P.; LORIEUX, M.; TROUSLOT, P.; AKAFFOU, S.; LOUARN, J.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, n.4, p.669-676, 2000.

LASHERMES, P.; COUTURON, E.; MOREAU, N.; PAILLARD, M.; LOUARN, J. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, n.3, p.458-462, 1996.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, v.261, p.259-266, 1999.

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*. **Journal of Heredity**, v.91, p.81-85, 2000.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; PRAKASH, N. S.; TROUSLOT, P.; LORIEUX, M.; CHARRIER, A. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. **Genome**, v.44, n.4, p.589-595, 2001.

MAHÉ, L.; COMBES, M. C.; VÁRZEA, V. M. P.; GUILHAUMON, C.; LASHERMES, P. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). **Molecular Breeding**, v. 21, n. 1, p. 105-113, 2008.

MALUF, M. P.; SILVESTRINI, M.; RUGGIERO, L. M. C.; GUERREIRO FILHO, O.; COLOMBO, C. A. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. **Scientia Agricola**, v.62, n.4, p.366-373. 2005.

MASABA, D.; WALLER, J. M. Coffee berry disease: the current status. In: **Colletotrichum: biology, pathology and control**, p. 237-249, 1992.

MEDINA-FILHO, H. P.; CARVALHO, A.; SONDAHL, M. R.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. Coffee breeding and related evolutionary aspects. **Plant Breeding Reviews**, v.2, p. 157-193, 1984.

MISSIO, R. F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; PENA, G. F.; RIBEIRO, A. P.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N. S. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. **Bragantia**, v.68, n.3, p.573-581, 2009.

MISSIO, R. F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ, C. D.; SAKIYAMA, N. S. Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, n.1, p.89-94, 2010.

MISSIO, R. F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; PENA, G.F.; ZAMBOLIM, L.; DIAS, L. A.; SAKIYAMA, N. S. Genetic characterization of an elite coffee germplasm assessed by gSSR and EST-SSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p. 2366-2381, 2011.

NOIR, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, v. 52, n. 1, p. 97-103, 2003.

OLIVEIRA, A. C. B.; SAKIYAMA, N. S.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; RUFINO, R. J. N.; ZAMBOLIM, L. Partial map of *Coffea arabica* L. and recovery of the recurrent parent in backcross progênies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.7, p196-203, 2007

PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PÉTIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, n.1-2, p. 41-47, 1996.

PEARL, H. M.; NAGAI, C.; MOORE, P.H.; STEIGER, D.L.; OSGOOD, R. V.; MING, R. Construction of a genetic map for arabica coffee. **Theoretical and applied genetics**, v.108, n.5, p.829-835, 2004.

PESTANA, K.N. **Caracterização Fenotípica e Molecular da Resistência do Cafeeiro Híbrido de Timor a *Hemileia vastatrix***. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2010.

PRAKASH, N. S.; MARQUES, D. V.; VARZEA, V. M.; SILVA, M. C.; COMBES, M. C.; LASHERMES, P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, n.6, p.1311-1317, 2004.

PRAKASH, N. S.; MUNISWAMY, B.; HANUMANATHA, B.T.; SREENATH, H. L.; SUNDARESHA, K. D.; SURESH, N.; SANTHOSH, P.; SOUMYA, P. R.; BHATASHA, M.; BHAT, S. S.; JAYARAMA. Marker assisted selection and breeding for leaf rust resistance in coffee (*Coffea arabica* L.)-some recent leads. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.71, n.2, p.185-189, 2011.

RAINA, S.N.; MUKAI Y.; YAMAMOTO, M. *In situ* hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.1204-1209.

RODRIGUES JR, C. J.; BETTENCOURT, A. J.; RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology**, v.13, n.1, p. 49-70, 1975.

SAKIYAMA, N.S.; PEREIRA, A.A.; ZAMBOLIM, L. Melhoramento do café arábica. In: Borém, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa. Editora UFV. 1999. p.189-204.

SETOTAW, T. A.; DIAS, L. A. S.; MISSIO, R. F. Genetic divergence among barley accessions from Ethiopia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, n.2, p.116-123, 2010.

SETOTAW, T. A. CAIXETA, E. T.; PEREIRA, A. A.; OLIVEIRA, A. C. B.; CRUZ, C. D.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Coefficient of parentage in *Coffea arabica* L. cultivars grown in Brazil. **Crop Science**, v.53, p.1237-1247, 2013.

SILVESTRINI, M.; MALUF, M. P.; RUGGIERO, L. M. D. C.; GUERREIRO, O.; COLOMBO, C. A. Caracterização de linhagens comerciais de café através de marcadores moleculares. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1, 2000, Poços de Caldas. Resumos expandidos... Brasília: Embrapa Café, 2000. 389p.

SOUSA, T. V. **Caracterização Molecular de Cultivares de Café Resistência à Ferrugem**. 2013. 47 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2013.

TEIXEIRA-CABRAL T. A.; SAKIYAMA N. S.; ZAMBOLIM L.; PEREIRA A. A.; BARROS, E. G.; SAKIYAMA, C. C. H. Reproducibility of RAPD marker and its efficiency for coffee tree grouping analysis. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p.121-129, 2002.

TEIXEIRA-CABRAL, T. A.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A.; SCHUSTER, I. Single-locus inheritance and partial linkage map of *Coffea arabica* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.416-421, 2004.

VAN DER GRAAFF, N.A. Selection for resistance to coffee berry disease in arabica coffee in Ethiopia. Evaluation of selection methods. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.84, n.6, p.205-215, 1978.

VAN DER VOSSSEN, H.A.M.; WALYARO, D.J. Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance of the resistance. **Euphytica**, v.29, n.3, p.777-791, 1980.

VAN DER VOSSSEN, H.A.M. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: ZAMBOLIM,

---

L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V.M.P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa: UFV, 2005. p.1-30.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; SILVA, M. S.; FUKUDA, W. M. G.; FALEIRO, F. G. Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.1, p.56 - 67, 2008.