

TIAGO VIEIRA SOUSA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CULTIVARES DE
CAFÉ RESISTENTES À FERRUGEM

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S725c Sousa, Tiago Vieira, 1985-
2013 Caracterização molecular de cultivares de café resistentes à
ferrugem / Tiago Vieira Sousa. - Viçosa, MG, 2013.
viii, 47f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eveline Teixeira Caixeta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Café - Melhoramento genético. 2. Marcadores genéticos. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa
de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.732

TIAGO VIEIRA SOUSA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CULTIVARES DE
CAFÉ RESISTENTES À FERRUGEM

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2013.

Antonio Alves Pereira

Ney Sussumu Sakiyama

Cosme Damião Cruz
(Coorientador)

Eveline Teixeira Caixeta
(Orientadora)

*“Seja a mudança que você
deseja ver no mundo.”*

Mahatma Gandhi

Dedico a Deus, sem Ele nada seria. Aos meus pais pelo amor e dedicação. E a minha amada esposa, ajudadora e doce companheira.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida. Por tudo o quanto tem me proporcionado.

Agradeço a Universidade Federal De Viçosa (UFV) e ao Curso de Pós-Graduação em Genética e melhoramento pela oportunidade e pelo ensino de excelência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

À Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pela orientação, por toda paciência, ajuda e conhecimentos transmitidos.

Aos meus coorientadores Dr. Antônio Carlos Baião de Oliveira e Dr. Cosme Damião Cruz pelos conhecimentos e sugestões valiosas.

Ao Dr. Antonio Alves Pereira e ao Dr. Ney Sussumu Sakiyama pelas importantes sugestões no trabalho.

À Dra. Eunize Maciel Zambolim e ao Dr. Laercio Zambolim, pelo auxílio na condução dos trabalhos e pela amizade.

Agradeço aos meus pais, Jair e Vilma, de todo o coração, pelo carinho, apoio, confiança, por terem acreditado em mim, sei que não teria chegado até aqui sem vocês.

Aos meus amados irmãos e família por todo amor, carinho e amizade.

À minha esposa Emilly, por ser uma pessoa especial em minha vida. Uma companheira, ajudadora, que sempre me motiva e mas faz querer algo a mais. Por todo amor e paciência.

Aos colegas e amigos do Laboratório BioCafé, pela eterna amizade, pelos conselhos e por dividir comigo grandes momentos.

BIOGRAFIA

TIAGO VIEIRA SOUSA, filho de Jair Vieira Sousa e Vilma da Consolação Sousa, nasceu no dia 03 de outubro de 1985, em Itamarandiba, Estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino médio em 2005, na Escola Estadual São João Batista em Itamarandiba-MG.

Em 2007, ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES). Em dezembro de 2011 diplomou-se em Agronomia na referida instituição de ensino. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Fisiologia Vegetal, sob orientação do Dr. Carlos Eduardo Corsato, no Laboratório de Biotecnologia da Epamig, sob orientação da Dra. Ana Cristina Pinto Juhász e no Laboratório de Biotecnologia da UNIMONTES, sob orientação da Dra. Márcia Regina Costa.

Em março de 2012, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração Genética Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob orientação da Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pesquisadora da Embrapa Café.

Atualmente está aprovado no curso de doutorado deste mesmo Programa de Pós Graduação.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
<i>3.1. Aspectos econômicos da cafeicultura</i>	4
<i>3.2. Melhoramento Genético de Coffea arabica</i>	5
<i>3.3. Cultivares de Coffea arabica.....</i>	7
<i>3.3.1. Cultivares suscetíveis à ferrugem do cafeeiro (H. vastatrix).....</i>	7
<i>3.3.2. Cultivares portadoras de resistência à ferrugem do cafeeiro (H. vastatrix)</i>	8
<i>3.4. Marcadores moleculares</i>	13
<i>3.5. Registro e proteção de cultivares - Uso de marcadores microssatélites nos testes DHE</i>	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
<i>4.1. Material genético.....</i>	19
<i>4.2. Extração do DNA</i>	22
<i>4.3. Amplificação com marcadores microssatélites</i>	23
<i>4.4 Análise estatística</i>	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

SOUSA, Tiago Vieira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Caracterização molecular de cultivares de café resistentes à ferrugem.** Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta. Coorientadores: Antonio Carlos Baião de Oliveira e Cosme Damiano Cruz.

Os ganhos alcançados com o melhoramento genético do cafeeiro no Brasil resultaram na obtenção de cultivares com potencial produtivo muito superior ao das cultivares tradicionais. Atualmente, 123 cultivares de *Coffea arabica* estão registradas no Registro Nacional de Cultivares RNC/MAPA; destas, oito são protegidas. Para que uma cultivar possa ser registrada e ou protegida é obrigatório que ela seja distinta, homogênea e estável (DHE). Na comprovação de DHE de uma cultivar os descritores morfológicos tem sido os mais utilizados. No entanto, as cultivares comerciais são cada vez mais próximas fenotipicamente. Isso dificulta a discriminação precisa desses materiais por meio desses descritores. Assim sendo, uma alternativa que venha auxiliar nos testes de DHE é de extrema necessidade e proporcionará grandes benefícios. Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares pode discriminar com maior precisão e segurança as cultivares as quais se deseja o registro e ou a proteção. Dentre os vários tipos de marcadores moleculares, os microssatélites tem sido os mais utilizados por serem codominantes, multialélicos, altamente polimórfico e loco específico. O presente trabalho objetivou estabelecer um conjunto de marcadores microssatélite para a caracterização molecular (*fingerprinting*) de cultivares de café portadoras de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). Foram analisadas 34 cultivares/progênes de *C. arabica*. Para cada cultivar/progênie foram analisadas seis plantas, constituindo um total de 204 indivíduos. Dessa forma, pôde-se verificar a possível ocorrência de variabilidade genética entre e dentro dos materiais genéticos avaliados. Trinta e um *primers* microssatélites foram testados, 27 amplificaram, sendo 20 polimórficos. A partir dos dados de 16 marcadores polimórficos selecionados foi construído um dendrograma e de duas maneiras distintas, foi estabelecido o perfil molecular das cultivares. Pela análise do dendrograma foi possível distinguir 29 das 34 cultivares/progênes avaliadas. Pela análise de *fingerprinting* foi definido 31 perfis moleculares únicos.

ABSTRACT

SOUSA, Tiago Vieira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Molecular characterization of coffee cultivars resistant to rust.** Advisor: Eveline Teixeira Caixeta. Co-advisors: Antonio Carlos Baião de Oliveira and Cosme Damião Cruz.

Coffee breeding in Brazil promoted the development of cultivars with much higher productive potential, compared to traditional cultivars. Currently, 123 cultivars of *Coffea arabica* are registered in the National Register of Cultivars RNC/MAPA, of which eight are protected. Cultivars can only be registered if they are distinct, uniform and stable (DUS). Morphological descriptors have been generally used for DUS examination of a cultivar. However, commercial cultivars are increasingly coming phenotypically closer. This hinders a precise discrimination of these materials by such descriptors. Therefore, it is extremely important to develop an alternative to assist in DUS testing, because it will provide great benefits. The use of molecular markers can discriminate more accurately and safely cultivars candidates to registration and/or protection. Among the various types of molecular markers, microsatellites have been the most widely used because they are codominant, multi-allelic, highly polymorphic and locus-specific. This study aimed to establish a set of microsatellite markers for molecular characterization (fingerprinting) of coffee cultivars carrying rust resistance (*Hemileia vastratrix* Berk. Et Br). Thirty-four cultivars/progenies of *C. arabica* were assessed. For each cultivar/progeny, six plants were analyzed, which totaled 204 individuals. Thus, it was possible to verify the occurrence of genetic variability within and among the genetic materials evaluated. Thirty-one microsatellite primers were tested; 27 amplified, of which 20 were polymorphic. Based on the data of 16 polymorphic markers selected, a dendrogram was constructed, and a molecular profile of the cultivars was established in two distinct ways. The analysis of the dendrogram allowed distinguishing 29 of the 34 cultivars/progenies assessed. Fingerprinting analysis allowed defining 31 unique molecular profiles.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* é representado por 103 espécies no subgênero *Coffea* e por sete espécies no subgênero *Baracoffea* (DAVIS *et al.*, 2006). Das espécies cultivadas, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre são as de maior importância econômica, embora outras espécies tenham uma valiosa reserva de genes que podem atender as diferentes propostas do melhoramento genético. A espécie *C. arabica* é a mais comercializada mundialmente, devido a sua superioridade na qualidade da bebida (SONDAHL e LAURITIS, 1992; NEBESNY e BUDRYN, 2006). No Brasil, a produção de café arábica em 2012 foi de 38,34 milhões de sacas, correspondendo a 75,74 % da produção brasileira (CONAB, 2013).

Pesquisas na área de melhoramento genético do cafeeiro arábica no Brasil resultaram na obtenção de cultivares com potencial produtivo muito superior ao das cultivares inicialmente introduzidas. Como exemplo, houve um acréscimo de cerca de quatro vezes na produtividade da cultivar Mundo Novo em relação à variedade Typica (CARVALHO, 1981). Entretanto, segundo Setotaw *et al.* (2013) as cultivares registradas de *C. arabica* no Brasil foram obtidas a partir de poucos genitores, resultando em baixa variabilidade entre as mesmas.

Além de poucas plantas terem originado o material genético cultivado (CARVALHO, 1945) outros fatores contribuíram para reduzir ainda mais a variabilidade genética de cafeeiros cultivados. Um dos fatores está relacionado ao próprio tipo de reprodução de *C. arabica*, pois essa é uma espécie autógama (LASHERMES *et al.*, 2000). Além disso, a seleção praticada pelo melhorista em busca dos melhores genótipos favorece o aumento de genótipos aparentados, por buscarem plantas com as mesmas características que são as de interesse agrônomico e comercial. No caso de se realizarem cruzamentos dirigidos, o melhorista normalmente procura cruzar plantas que tenham características agrônomicas complementares e que sejam mais divergentes geneticamente. Todavia, isso é dificultado quando as plantas disponíveis não apresentam grande variabilidade. Vários trabalhos já comprovaram a baixa variabilidade das cultivares de café arábica plantadas comercialmente (LASHERMES *et al.*, 1996; ANTHONY *et al.*, 2001; MALUF *et al.*, 2005; SETOTAW *et al.*, 2013).

Essa baixa variabilidade observada no cafeeiro arábica pode dificultar a distinção das cultivares. A discriminação das cultivares deve ser estabelecida por

meio de distâncias mínimas dos caracteres que as diferenciam. Isso normalmente é fornecido por descritores morfológicos e fisiológicos, como tipo de fruto, formato de folha, altura da planta, resistência a enfermidades, cor da flor, etc (CAIXETA *et al.*, 2007). A diferenciação de genótipos por meio dos descritores morfológicos pode, muitas vezes, apresentar dificuldades inerentes ao seu número limitado e à interferência do ambiente na expressão destes. Essas dificuldades tendem a aumentar na medida em que as cultivares de uma mesma espécie são geneticamente aparentadas e, portanto, fenotipicamente semelhantes. Como resultado, as distâncias mínimas necessárias para se estabelecer uma distinção entre elas são cada vez menores.

Conforme recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), responsável pelo registro de cultivares, os melhoristas têm utilizado para registrar e proteger uma nova cultivar, apenas características morfológicas objetivando estabelecer a distinção, uniformidade e estabilidade, o DHE referido na lei de proteção de cultivares de nº 9.456, de 25 de abril de 1997 (LOMBARD *et al.*, 1999; PRIOLLI *et al.*, 2002). Embora apresentem algumas limitações, esses marcadores têm papel fundamental na divulgação das características agronômicas, sendo decisivos na escolha da nova cultivar pelo produtor.

A distinção de cultivares, realizada por características morfológicas, apresenta como desvantagem a necessidade de grande número de descritores que são identificados em plantas inteiras ou adultas, sendo necessário mais tempo e recursos financeiro e físico. Além disso, marcadores morfológicos podem ser influenciados pelo ambiente (PADILHA *et al.*, 2002), são complexos na sua expressão (LOMBARD *et al.*, 1999), podem ser modulados pelo efeito de um determinado patógeno, fase fenológica da planta e pelo clima (NARVÁEZ *et al.*, 2001). Também são influenciados por interações intra e inter-locos, resultando em dados poucos confiáveis (STAUB *et al.*, 1996) e apresentam problemas de identificação, principalmente em plantas aparentadas e de base genética estreita (PRIOLLI *et al.*, 2002) como ocorre em *C. arabica*.

Esses fatores tendem a se agravar com o crescente lançamento de genótipos mais produtivos, aparentados e resistentes a doenças pelos programas de melhoramento, exigindo das empresas a correta identificação de cada material genético lançado a fim de evitar problemas com proteção de cultivar. Assim, a busca

por descritores que permita, de forma racional e prática, classificar as diversas cultivares de café arábica terá grandes utilidades e aceitação nos programas de melhoramento dessa espécie. Uma alternativa que pode complementar os descritores morfológicos é o uso dos marcadores moleculares que tem permitido identificar com precisão as variações genéticas presentes no DNA de um organismo (CAIXETA *et al.*, 2009). Dessa forma, os marcadores moleculares permitem estabelecer o padrão molecular das cultivares, auxiliando no registro e na proteção das mesmas. Os descritores de DNA, baseados no genótipo do indivíduo, tem recebido maior atenção, especialmente pelo seu potencial de distinção, uma vez que são mais abundantes que os morfológicos, não serem influenciados pelo ambiente (UDE *et al.*, 2002) e serem ideais para distinção de genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados (BEYENE *et al.*, 2005).

Tendo em vista essas necessidades, o presente trabalho visou obter um conjunto de marcadores moleculares do tipo microssatélite para a caracterização molecular (*fingerprinting*) de cultivares de café arábica portadoras de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). A utilização desse recurso biotecnológico é cada vez mais recorrente e tem se tornado uma ferramenta importante tanto para apoio à continuidade dos programas de melhoramento, quanto para garantir a propriedade intelectual do produto final da seleção genética, assegurando aos agricultores ou usuários o acesso à informação necessária à implantação de uma cafeicultura moderna e competitiva.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo utilizar marcadores microssatélites para a caracterização molecular (*fingerprinting*) de cultivares de café arábica portadoras de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.), visando dar suporte ao registro e a proteção de cultivares.

De forma específica, tem-se os seguintes objetivos:

- a) Avaliar e descrever o padrão de segregação de marcadores moleculares codominantes em cultivares de café.
- b) Determinar a eficácia do conjunto de marcadores utilizados em diferenciar as cultivares em estudo.

c) Determinar um conjunto mínimo de marcadores para discriminar as cultivares em estudo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos econômicos da cafeicultura

O Brasil é o maior produtor mundial de café e os principais estados produtores, atualmente, são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná, Rondônia e Goiás, que juntos correspondem a 98,6% da produção nacional (CONAB, 2013).

Segundo a primeira estimativa de produção brasileira de café (arábica e conilon) para a safra 2013 (CONAB, 2013), o país deverá colher entre 46,98 e 50,16 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado. Caso essa estimativa se confirme, ocorrerá redução entre 7,6% e 1,3%, quando comparada com a produção obtida na safra anterior. Esse resultado pode ser explicado pelo ano de baixa produtividade do cafeeiro (bienalidade).

Levantamentos realizados pela Conab (2013) demonstraram que a produção do café arábica (*C. arabica*) representa 74,71% da produção do país, e tem como principal estado produtor Minas Gerais, com 67,93% de café beneficiado. O *C. canephora* participa da produção nacional com 25,29% de café beneficiado. O estado com maior produção desta espécie é o Espírito Santo com 77,30%.

Pelo histórico de produção de café nos últimos anos, observa-se que as diferenças de produtividade entre as safras de alta e baixa produção (bienalidade) vem diminuindo. Este comportamento é explicado por diversos fatores dentre os quais destacam: tratos culturais mais adequados, crescente aumento na utilização de irrigação, manejo de podas nos cafeeiros, em especial os esqueletamentos, adensamento das lavouras, plantio de variedades mais produtivas e melhores adaptadas, e por fim, a renovação constante dos cafezais (MATIELLO *et al.*, 2002).

A área plantada em 2013, com as espécies *C. arabica* e *C. canephora* no país, aumentou 1,99% em relação ao ano anterior, saindo de 2.329,36 e passando para 2.375,79 mil hectares, ou seja, foram acrescentados 46.428,8 hectares. Em Minas Gerais está concentrada a maior área com 1.241,12 mil hectares, predominando a espécie arábica com 97,7%. A área total estadual representa 52,49%

da área cultivada com café no país, e conseqüentemente o primeiro do ranking nacional. No Espírito Santo está a segunda maior área plantada com café, totalizando 496,76 mil hectares, sendo 308,08 mil hectares com a espécie *C. canephora* e 188,68 mil hectares com a *C. arabica* (CONAB, 2013).

3.2. Melhoramento Genético de *Coffea arabica*

Os ganhos alcançados pelo melhoramento genético do café tem proporcionado o lançamento de cultivares mais adaptadas e produtivas. Os trabalhos de melhoramento nessa cultura teve seu início no Brasil em 1932 (KRUG, 1936) na Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), estando em andamento até o presente momento. Esta continuidade de pesquisa tem sido um fator preponderante na seleção e evolução das cultivares de café recomendadas para o plantio comercial. A partir da década de 70, com o aparecimento da ferrugem no Brasil, outras instituições iniciaram trabalhos com o melhoramento do cafeeiro (MALAVOLTA *et al.*, 1986). Atualmente, além do IAC, os programas de melhoramento são desenvolvidos no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) juntamente com a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Embrapa Café, no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) (PEREIRA, 1995) e Embrapa Rondônia. Esses programas estão voltados para o desenvolvimento de materiais genéticos que combinem alta produtividade com resistência a estresses bióticos e abióticos e boa qualidade de bebida.

Nos programas de melhoramento do cafeeiro arábica os principais métodos de melhoramento genético utilizados são: introdução, seleção de plantas individuais seguida de teste de progênie e método genealógico (SAKIYAMA *et al.*, 2005). Atualmente, 123 cultivares de *C. arabica* estão registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2013a) estando disponíveis para plantio e, destas, oito são protegidas (BRASIL, 2013c). Essas cultivares apresentam boa produtividade e qualidade de bebida, sendo recomendadas para diferentes condições edafoclimáticas em território brasileiro.

Com o surgimento da ferrugem no Brasil, o foco principal dos programas de melhoramento dessa espécie passou a ser resistência a essa doença. Como resultado, entre as cultivares de café arábica registradas no MAPA, 71 apresentam

algum tipo de resistência à ferrugem. Apesar de estar disponível um número considerável de cultivares portadoras de resistência a essa doença, os programas de melhoramento continuam a incorporar outros genes de resistência e lançarem novas cultivares resistentes à ferrugem. Isso se deve ao fato do patógeno, *Hemileia vastatrix*, possuir alta variabilidade genética, dificultando a previsão da durabilidade da resistência das cultivares atuais (FONSECA *et al.*, 2008). Por essa razão, os trabalhos de melhoramento visando resistência à ferrugem devem ser contínuos para tentar superar as novas raças de ferrugem que estão surgindo ou vão aparecer.

Já foram caracterizadas 49 raças deste patógeno (GICHURU *et al.*, 2012; VÁRZEA e MARQUES, 2005). No Brasil, a raça II ocorre com maior frequência (ZAMBOLIM *et al.*, 2005). Contudo, em nosso território, já foram identificadas 16 raças fisiológicas do fungo (CAPUCHO *et al.*, 2012; CABRAL *et al.*, 2009; ZAMBOLIM *et al.*, 2005).

Em cafeeiro, a resistência às diversas raças de *H. vastatrix* tem sido atribuída a nove genes (S_{H1} a S_{H9}) (MAYNE, 1936; NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT e NORONHA-WAGNER, 1971; BETTENCOURT *et al.*, 1980; BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988). Em *C. arabica*, quatro genes dominantes (S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5}) simples ou associados, condicionam o espectro de resistência dos grupos fisiológicos de café a algumas raças fisiológicas do patógeno (NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT e NORONHA-WAGNER, 1971). Entretanto a resistência proporcionada pelos genes do *C. arabica* já foram suplantadas pelas raças de *H. vastatrix* (CARDOSO *et al.*, 1988). Assim fica evidente a necessidade de introgressões de genes de outras espécies para o desenvolvimento de novas cultivares.

Nesse sentido, nas últimas décadas têm sido explorado com sucesso os genes de *C. canephora*. Como *C. canephora* é diploide e *C. arabica* tetraploide, para a introgressão desses genes em arábica tem sido utilizado híbridos interespecíficos tetraploides (*C. arabica* e *C. canephora*) obtidos de forma artificial, como o Icatu, ou natural como o Híbrido de Timor. O Híbrido de Timor tem sido considerado uma das principais fontes de resistência no melhoramento por apresentar não só resistência à ferrugem, mas também a outras doenças e pragas (BETTENCOURT e LOPES, 1976; BETTENCOURT, 1981; PEREIRA, 1995). Além disso, esses híbridos possuem fenótipo de *C. arabica*, são autoférteis (RIJO, 1974; CARVALHO *et al.*, 1989) e se

cruzam facilmente com as cultivares de *C. arabica*, favorecendo, assim, a transferência de sua resistência (CARVALHO *et al.*, 1989). Outra fonte de resistência utilizada são os materiais possuidores do fator S_H3 originário de *Coffea liberica* (FONSECA *et al.*, 2008). Dessa forma, as cultivares resistentes à ferrugem registradas são originadas de um desses híbridos interespecíficos.

3.3. Cultivares de *Coffea arabica*

As informações sobre as características das principais cultivares de *C. arabica* registradas estão descritas a seguir (CARVALHO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2010).

3.3.1. Cultivares suscetíveis à ferrugem do cafeeiro (*H. vastatrix*)

Catuaí Vermelho IAC 144 e Catuaí Vermelho IAC 15

Essas cultivares são originadas a partir do cruzamento entre as cultivares Caturra Amarelo IAC 476-11 e Mundo Novo IAC 374-19. Desse cruzamento foram obtidas três plantas. E a partir de uma dessas (H 2077-2), foram selecionadas as linhagens atuais de Catuaí, como a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 e Catuaí Vermelho IAC 15 (MENDES *et al.*, 2008). Essas cultivares são de porte baixo e mais tolerantes à ferrugem do cafeeiro, em relação a cultivar Mundo novo.

Aproximadamente 75% do café plantado no Brasil é arábica. Desse total, cerca de 45% são plantados com cultivar do grupo Catuaí.

Bourbon Amarelo UFV 535

Acredita-se que a Bourbon Amarelo se originou a partir de uma mutação de Bourbon Vermelho ou de cruzamento natural entre Bourbon Vermelho e Amarelo de Botucatu. Sua arquitetura é aberta, com menor diâmetro de copa que Mundo Novo. Os frutos são de tamanho médio, de maturação precoce a média; brotação terminal de coloração verde-claro. Essa cultivar apresenta capacidade produtiva 30% a 50% menor que a Mundo Novo. É altamente suscetível à ferrugem e à cercosporiose. Apresenta como característica de destaque, a excelente qualidade de bebida.

3.3.2. Cultivares portadoras de resistência à ferrugem do cafeeiro (*H. vastatrix*)

Cultivares do grupo Catucaí

O nome Catucaí é devido à origem das cultivares desse grupo serem obtidas a partir de cruzamento natural entre Icatu e Catuaí, daí o nome Catucaí. Esse cruzamento ocorreu nos experimentos do Instituto Brasileiro do Café (IBC). O método de melhoramento utilizado foi o genealógico, selecionando plantas altamente produtivas, vegetativamente vigorosas e com resistência moderada à ferrugem do cafeeiro.

- **Catucaí Amarelo 2SL**

Porte baixo a médio, crescimento vegetativo vigoroso, plantas bastante uniformes, frutos amarelos de maturação média e sementes de tamanho médio. Resistência à ferrugem e resistência moderada à Phoma e à Ascochita. Apresenta boa tolerância à seca.

- **Catucaiam 24137**

Porte baixo, frutos amarelos de maturação média e sementes de tamanho médio, plantas uniformes.

- **Catucaiam 2015479**

Porte baixo, crescimento vegetativo vigoroso, frutos amarelos de maturação média e sementes de tamanho médio.

- **Catucaí 785-15**

Porte baixo, folhas com bordas onduladas e folhas novas de cor bronze, frutos vermelhos de maturação muito precoce e sementes de tamanho médio, plantas uniformes. Recomendada para plantios irrigados com menores espaçamento entre plantas.

- **Catucaí Vermelho 20/15**

Porte baixo, frutos vermelhos de maturação precoce e sementes de tamanho médio, plantas uniformes.

Sabiá tardio

Originada a partir do cruzamento entre Catimor UFV 386 e Acaiá. Resistente à ferrugem. Porte baixo, copa com pequeno diâmetro, maturação tardia, boa tolerância à seca, apresentando folhas cor verde escura mesmo em períodos de estiagem.

IBC-Palma-2

Originada de cruzamento entre Catuaí Vermelho IAC 81 e Catimor UFV 353. Porte baixo, copa de formato cilíndrico e com pequeno diâmetro. Resistência moderada à ferrugem, brotos de cor bronze, sementes de tamanho médio com maturação tardia, apresentando alta produtividade.

Acauã

Originada do cruzamento entre Mundo Novo IAC 388-17 e Sarchimor IAC 1668. Apresenta resistência à ferrugem e maturação tardia.

Tupi Amarelo IAC 5162

Provavelmente se originou do cruzamento natural entre as cultivares Tupi IAC 1669-33 de frutos vermelhos e Catuaí Amarelo. Resistente a moderadamente resistente à ferrugem do cafeeiro. Porte baixo, frutos amarelos, arredondados com maturação precoce. Apresenta alta produtividade e boa qualidade de bebida.

Tupi IAC 1669-33

Cultivar originada a partir do híbrido H 3661/4 (Villa Sarchi CIFC 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2). Possui porte baixo, resistente à ferrugem. É preferencialmente indicada para plantios adensados. Apresentam altas produções e grande rusticidade. O plantio dessa cultivar tem-se expandido rapidamente.

IAC 125 RN

A cultivar IAC 125 RN de café tipo arábica possui alta produtividade, porte baixo, maturação precoce e qualidade da bebida considerada excelente. É resistente ao nematóide *Meloidogyne exigua*, o que permite que seja plantada em regiões onde há problemas com o nematóide. Também é resistente à principal doença do café, a ferrugem. Essa cultivar originou-se a partir do híbrido H 3661/4.

Obatã IAC 1669-20

Cultivar de porte baixo, resistente à ferrugem, originada a partir do híbrido H 3661/4. É preferencialmente indicada para plantios adensados. Apresentam altas produções e grande rusticidade. O plantio dessa cultivar tem-se expandido rapidamente.

Obatã Amarelo 4932

Originou-se de um provável cruzamento natural entre Obatã 1669-20 com Catuaí Amarelo. Apresenta resistência à ferrugem do cafeeiro. Porte baixo, frutos amarelos e grandes com maturação tardia. Apresenta alta produtividade e qualidade de bebida muito boa.

Iapar 59

É proveniente de cruzamento entre as cultivares Villa Sarchi CIFIC 971/10 e o Híbrido de Timor CIFIC 832/2. Resistência completa à ferrugem do cafeeiro, porte baixo, frutos vermelhos com maturação medianamente precoce. Possui brotos de cor predominantemente bronze, com pequeno percentual de brotos verdes. É altamente produtiva.

IPR 98

É proveniente de cruzamento entre as cultivares Villa Sarchi CIFIC 971/10 e o Híbrido de Timor CIFIC 832/2. Resistência completa à ferrugem do cafeeiro, copa com formato cilíndrico cônico. Pequeno porte, frutos vermelhos com maturação mediana. Apresenta alta produtividade e boa qualidade de bebida.

IPR 99

Essa cultivar é resultante de cruzamentos entre o *C. arabica* Villa Sarchi CIFIC 971/10 e o Híbrido de Timor CIFIC 832/2. Apresentam resistência à ferrugem do cafeeiro.

IPR 100

Essa é a primeira cultivar de café arábica resistente ao nematoide *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita*. MATA *et al.* (2000) em área altamente

infestada com *M. paranaensis* identificaram e selecionaram um genótipo de Catuaí (IAPAR Vit. 83), por meio desse genótipo a cultivar IPR-100 foi desenvolvida, originando 100% das plantas resistentes. Apresenta alta qualidade de bebida e fatores de resistência à ferrugem do cafeeiro (CAPUCHO *et al.*, 2007).

IPR 103

Originou-se do cruzamento entre Icatu e Catuaí (Catuaí Amarelo IAC 66 x Catuaí Vermelho IAC 99). Resistência moderada à ferrugem do cafeeiro, copa com formato cilíndrico. Porte médio, frutos vermelhos com maturação mais tardia do que os da Catuaí. Apresenta alta produtividade e boa qualidade de bebida. Adaptada ao calor e a solos pobres.

IPR 104

Desenvolvida pelo programa de melhoramento Genético de Café do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Foi derivada de diferentes fontes de resistência a ferrugem, como o Icatu, Híbrido de Timor CIFC 832/2 e Catuaí S_H2, S_H3.

Oeiras MG 6851

Originou-se de um cruzamento entre Caturra Vermelho (CIFC 19/1) e Híbrido de Timor (CIFC 832/1). Moderadamente resistente as raças de *Hemileia vastatrix* Berk et Br. que predominam no estado de Minas Gerais. Porte baixo, frutos vermelhos, graúdos e alongados com maturação precoce e uniforme. Apresenta alta produtividade e boa qualidade de bebida.

Catiguá MG1, Catiguá MG2 e MGS Catiguá 3

Essas cultivares foram originadas a partir do cruzamento artificial entre a cultivar Catuaí Amarelo IAC 86 e o Híbrido de Timor UFV 440-10. As cultivares Catiguá MG1 e Catiguá MG2 foram obtidas pelas progênies das plantas H 514-7-14-2 e H 514-7-16-3, respectivamente. Da progênie da planta H 514-11-5-5-1-1 foi selecionada a cultivar MGS Catiguá 3. As três cultivares são resistentes às raças prevalentes de *H. vastatrix*. Porte baixo, copa com formato cônico. Os frutos são vermelhos, graúdos. Catiguá MG1 e MGS Catiguá 3 apresentam as folhas novas de cor bronze, enquanto Catiguá MG2 são bronze-claro. Além da resistência à

ferrugem, a cultivar MGS Catiguá 3, apresenta resistência ao nematoide das galhas (*Meloidogyne exigua*).

Sacramento MG1

Oriunda da hibridação artificial entre a cultivar Catuaí Vermelho IAC 81 e Híbrido de Timor UFV 438-52. Elevado nível de resistente à ferrugem do cafeeiro. Porte baixo, frutos vermelhos, arredondados com maturação média. As folhas novas são predominantemente verdes. Apresenta alta produtividade e boa qualidade de bebida. Destaca-se pelo seu exuberante crescimento vegetativo e pela sua alta capacidade de produção inicial.

Araponga MG1

Originada do cruzamento artificial entre a cultivar Catuaí Amarelo IAC 86 e o Híbrido de Timor UFV 446-08. Resistente às raças de *H. vastatrix* predominantes. Porte baixo, frutos vermelhos e copa de formato cônico. Apresenta alta produtividade.

Pau-Brasil MG1

A cultivar Pau-Brasil MG1 é originada da hibridação artificial entre a cultivar Catuaí Vermelho IAC 141 e o Híbrido de Timor UFV 442-34. Cultivar resistente à ferrugem. Apresenta porte baixo e copa de formato cônico. Destaca-se pelo alto vigor vegetativo, boa arquitetura e alta produtividade.

Paraíso MG H 419-1

Originada pelo cruzamento artificial entre a cultivar Catuaí Amarelo IAC 30 e a seleção de Híbrido de Timor UFV 445-46. Altamente resistente à ferrugem do cafeeiro. Porte baixo, inferior ao da cultivar Catuaí. Frutos amarelos, oblongos com maturação média. Apresenta alta produtividade e boa qualidade de bebida.

H 419-3-3-7-16-4-1, H-419-10-6-2-5-1, H-419-10-6-2-10-1, H-419-10-6-2-12-1

Progênes elite oriundas do cruzamento entre cultivares Catuaí Amarelo IAC 30 e Híbrido de Timor UFV 445-46. Essas progênes fazem parte do Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro desenvolvido pela Epamig e Instituições parceiras.

3.4. Marcadores moleculares

Aumentar o conhecimento e caracterização do germoplasma, bem como a eficiência de seleção, maximizando os ganhos genéticos, tem sido a meta dos melhoristas de plantas em todo mundo. Alcançar esses objetivos justifica o interesse em tecnologias como as de marcadores moleculares ou de DNA. O uso dos marcadores moleculares surgiu com a necessidade de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA e têm sido considerado instrumentos importantes e fundamentais em estudos relacionados com a estrutura de populações de plantas (MILLACH, 1998), bem como no melhoramento genético.

Diversidade molecular estimada com marcadores moleculares fornece uma estimativa rápida e precisa de ancestralidade entre acessos, permitindo otimizar os esforços de melhoramento na constituição de populações e planejamento de cruzamentos visando maximizar a segregação e recuperação de genótipos superiores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos de várias espécies, vegetais e animais. Os tipos de marcadores moleculares disponíveis, atualmente, diferenciam-se pelo método utilizado para revelar polimorfismo de DNA, variando quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso e repetibilidade de resultados (LOPES *et al.*, 2002).

Os marcadores moleculares podem se comportar como característica dominante ou codominante. Quando se é possível distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos, o marcador é dito codominante. Os dominantes não permitem essa distinção (LOPES *et al.*, 2002). Atualmente estão disponíveis inúmeros tipos de marcadores e a escolha do mais adequado para o estudo genético ou melhoramento deve ser realizado com base na facilidade de execução da técnica, somada à eficiência da avaliação, interpretação e análise de dados. Deve-se ainda considerar a facilidade de desenvolvimento do ensaio e os objetivos do projeto (CAIXETA *et al.*, 2012). Dentro desse contexto, destaca-se os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) que têm sido largamente utilizados na distinção de cultivares (MCGREGOR *et al.*, 2000; NORERO *et al.*, 2002; GHISLAIN *et al.*, 2004; MOISAN-THIERY *et al.*, 2005; BALDONI *et al.*, 2006; REID e KERR, 2007; MATHIAS *et al.*, 2007; CHARAFI *et al.*, 2008; REKIK *et al.*, 2008; MUZZALUPO *et al.*, 2009).

Os marcadores microssatélites são codominantes e altamente polimórficos, essas características são importante na caracterização e identificação de genótipos (*fingerprinting*) de espécies com base genética estreita (BORÉM e MIRANDA, 2009) como é o caso do *Coffea arabica* L.

Diferentes trabalhos têm demonstrado a importância dos marcadores microssatélites na diferenciação de materiais genéticos melhorados. Creste *et al.* (2003) conseguiram, com uso de marcadores microssatélites em bananeira, identificar marcas específicas para o genoma B e identificou genótipos de difícil caracterização morfológica. Bonamico *et al.* (2004) conseguiram diferenciar híbridos simples de milho de três fontes diferentes, utilizando 17 marcadores microssatélite sugerindo ser essa técnica importante para aqueles que desejam proteger ou identificar a pureza varietal dos híbridos plantados. Em tomate, os marcadores microssatélites têm sido utilizados na identificação de cultivares (HOKANSON *et al.*, 1998; SMULDERS *et al.*, 1997; HE *et al.*, 2003; RAJPUT *et al.*, 2006; PRITESH *et al.*, 2010).

Para o cafeeiro, são poucos os trabalhos relatando o uso de marcadores moleculares, sendo grande parte destes, estudo da diversidade genética do gênero *Coffea* (BERTHAUD, 1986; LASHERMES *et al.*, 1993; DUSSERT *et al.*, 1999; COMBES *et al.*, 2000; ANTHONY *et al.*, 2002; PRAKASH *et al.*, 2005; MALUF *et al.*; 2005; SILVESTRINI, 2008). A identificação de marcadores para seleção assistida também tem sido alvo de pesquisas (NOIR *et al.*, 2003; PRAKASH *et al.*, 2004; MAHÉ *et al.*, 2008, DINIZ *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2010; DIOLA *et al.*, 2011). A construção de mapas genéticos é outra ferramenta que tem sido proposta para auxiliar no melhoramento de características de interesse nas principais espécies do gênero *Coffea* (KY *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2007; CUBRY, 2009).

Sendo assim, as metodologias de marcadores moleculares, nos fornecem valiosas informações para a caracterização das espécies as quais pretendemos estudar. O uso de marcadores moleculares possibilita a detecção de polimorfismo diretamente do DNA, não sofrendo influência do ambiente ou estágio fisiológico em que se encontram as plantas, permitindo o seu uso em associação a estudos de identificação de espécies, estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes espécies ou populações, construção de mapas genéticos de interesse econômico e a determinação de padrões de bandas específicos de cada variedade.

3.5. Registro e proteção de cultivares - Uso de marcadores microssatélites nos testes DHE

Registro de cultivar e proteção de cultivar são termos distintos. O registro é conferido por meio da inscrição da nova cultivar desenvolvida no Registro Nacional de Cultivares (RNC). Esse documento é obrigatório para a permissão de produção, beneficiamento e comercialização de sementes e mudas de qualquer cultivar (BRASIL, 2004). A proteção é conferida pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), assegurando ao obtentor direitos de propriedade sobre a cultivar desenvolvida, permitindo receber *royalties* sobre a comercialização do material protegido. Dessa forma, o registro habilita as cultivares à comercialização, enquanto a proteção estabelece a propriedade intelectual sobre a cultivar. São, portanto, ações independentes com finalidades distintas (BRASIL, 2011).

Para fins de inscrição no RNC, a cultivar a qual se pretende registrar, deve ter o seu Valor de Cultivo e Uso (VCU) determinado. O VCU, expressa o valor intrínseco de combinação das características agrônômicas da cultivar com as suas propriedades de uso em atividades agrícolas, industriais, comerciais e/ou de consumo in natura. O MAPA deve ser, a priori, informado sobre a instalação dos ensaios de VCU, a respectiva data de início e o local de instalação dos mesmos, para fins de fiscalização e supervisão (BRASIL, 2013b).

O RNC é regido pela Lei nº 10.711, de 05 de agosto de 2003, e regulamentado pelo Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004 (BRASIL, 2013b). Enquanto a Lei de Proteção de Cultivares (LPC) é regida pela Lei n. 9.456 que está vigente em nosso território desde 25 de abril de 1997. Com ela, o país passou a contar com um novo mecanismo legal para proteger as cultivares de plantas (SAMPAIO, 1998).

Independente de registrar ou proteger uma cultivar no Brasil, ela deve ser distinta, homogênea e estável (DHE). Assim como em nosso país, esses critérios são utilizados internacionalmente (BAYLE, 1983; VASCONCELOS NETO *et al.*, 1999). Para ser distinta, a cultivar deve apresentar qualquer característica perfeitamente identificável, seja de ordem morfológica, fisiológica, bioquímica ou outras suficientes para sua identificação. Para detectar a distinguibilidade da cultivar são usados os descritores mínimos. A LPC define descritor como sendo “a característica morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular que seja herdada geneticamente, utilizada na identificação de cultivar” (BRASIL, 2011).

Os descritores estabelecidos e usados para as várias espécies vegetais nos testes de DHE de cultivares sujeitas ao registro e à proteção são normalmente características morfológicas e agronômicas. Embora os descritores morfológicos tem sido os mais utilizados, estes apresentam algumas limitações. Em espécie perene como *C. arabica*, é longo o tempo gasto para que todas as características dos descritores recomendados na diferenciação das cultivares sejam expressas. As avaliações são subjetivas e podem ser influenciadas pelo efeito do ambiente (PADILHA *et al.*, 2002). Além disso, com o melhoramento das espécies, ocorre o estreitamento da base genética das cultivares e os padrões fenotípicos vão se aproximando cada vez mais (PRIOLLI *et al.*, 2002). Portanto, ainda que a caracterização de cultivares feita por meio de descritores morfológicos continue sendo predominante e importante, as limitações deste tipo de descritor têm gerado a necessidade de busca de alternativas.

Em cafeeiro, até o momento são utilizados descritores morfológicos na distinção das cultivares. A relação desses descritores foram elaboradas por um conjunto de pesquisadores de várias instituições brasileiras. Também foram definidas as instruções para execução dos ensaios de cultivares dessa cultura. A relação de descritores e as instruções para execução dos ensaios de cultivares foram publicadas no Diário Oficial de União, pela portaria nº 2 de 17 de novembro de 2000 (GUERREIRO-FILHO *et al.*, 2001). No entanto, devido às limitações apresentadas pelos descritores morfológicos e pelo fato das cultivares da espécie *C. arabica* apresentarem base genética estreita torna-se importante a busca de outros descritores, como os marcadores moleculares, para auxiliar no processo de distinção das cultivares. Trabalhando com a espécie *C. arabica*, Aguiar *et al.* (2004) recomendaram o uso de marcadores moleculares para auxiliar na identificação de diferenças entre cultivares fenotipicamente semelhantes as quais se pretende obter o registro ou a proteção.

Nesse sentido, ainda que não tenham caráter decisivo, os perfis genéticos (*fingerprinting*) das cultivares, obtidos por meio de marcadores moleculares, podem ser anexados ao pedido de proteção e ou registro pelos obtentores para fins de caracterização e diferenciação de cultivares de café. “*Fingerprinting* de DNA” tem sido utilizado para descrever o padrão molecular de um genótipo. Em eucalipto, nos testes de DHE, que devido ao uso de clonagem para propagação dos materiais comerciais, são utilizados 25 microssatélites internacionalmente referendados, os

quais informam com alta precisão o perfil genético das cultivares ou clones (BRASIL, 2011).

Segundo Brasil (2011), para o uso de marcadores moleculares nos testes de DHE de cultivares é imprescindível à realização de ensaios em rede para validação da técnica molecular a ser utilizada e assegurar nível mínimo aceitável de reprodutibilidade dos resultados. Assim como em todos os marcadores moleculares, para validação e padronização das técnicas a serem utilizadas pelos marcadores microssatélites é necessário à escolha de um conjunto de cultivares e que estas apresentem um conjunto de alelos referência. Esses alelos de referência são necessários porque os marcadores moleculares se comportam de formas diferentes nos sistemas de detecção disponíveis. Os *primers* utilizados nos estudos devem ser sintetizados, de preferência, por um único fornecedor e que este seja confiável, reduzindo a possibilidade de influência destes nos perfis de DNA divergentes. Outros critérios que devem ser atentados são: a qualidade do DNA; a enzima polimerase empregada nas metodologias baseadas em PCR; a quantidade ou concentração de reagentes de cada componente da reação de PCR; e as condições do programa do termociclador.

O uso de marcadores microssatélites já vem sendo utilizado desde 2009 pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) em cultivares de espécies como soja, arroz, algodão e eucalipto para manejo dos ensaios de DHE e como um dos itens de conformidade de cultivares candidatas à proteção. Nesse caso foi definido o padrão molecular das cultivares protegidas. Quando novas cultivares são protegidas, o perfil molecular destas é incluído no banco de dados existente (BRASIL, 2011).

Outro aspecto importante é o número mínimo de indivíduos que deve ser analisado antes que o padrão molecular de uma cultivar seja estabelecido. Isto porque, normalmente é verificada variabilidade dentro da cultivar mesmo em espécies que se reproduzem por autofecundação. Cultivares de *C. arabica* é esperado polimorfismo entre e dentro das cultivares. Esse polimorfismo é devido à espécie ser alotetraplóide, $2n=4X=44$ cromossomos, autógena e com taxa variada de fecundação cruzada (LASHERMES *et al.*, 2000). Além disso, essa espécie é perene com período juvenil longo (SERA, 2001) fato este que prolonga o avanço das gerações nos programas de melhoramento, sendo, portanto, as variedades lançadas em gerações menos avançadas.

O número exato de indivíduos deve ser amostrado por cultivar ainda não foi definido. Millach (1999) sugeriu a mistura de DNA de pelo menos 10 indivíduos para que a caracterização inicial seja feita, amostrando os alelos presentes no cultivar. Por outro lado, é importante que esses indivíduos sejam em algum momento testados separadamente, pelo menos para uma parte dos marcadores, para que seja estabelecido o nível de variabilidade existente entre os indivíduos que compõem a cultivar. Silva *et al.* (2001), em estudo comparativo entre marcador molecular RAPD e descritores morfológico, utilizaram DNA em *bulk* de cada progênie, sendo este constituído pela mistura do DNA de quatro plantas por progênie. Garcia *et al.* (2007) utilizaram *bulk* de DNA de 10 plantas de cada cultivar e 69 marcadores microssatélites para identificação de cultivares de soja. El-Awady *et al.* (2012) utilizaram *bulk* compostos por 10 plantas de cada cultivar para avaliar a diversidade genética e estudar o DNA *fingerprinting* em tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivado no Egito, por meio de marcadores microssatélites. Ribeiro *et al.* (2013), na caracterização molecular de cultivares de soja, trabalharam com *bulk* de DNA extraído de 50 sementes utilizando marcadores microssatélites.

Segundo Millach (1999), a variação genética dentro da cultivar existe e caberá ao pesquisador estudar e definir o número ideal de indivíduos a serem amostrados. Em cultivares de origem clonal o número poderá ser reduzido. Por outro lado, é maior quando o cultivar é uma população composta por indivíduos geneticamente distintos que se reproduzem por fecundação cruzada. No caso de cultivares sintéticas provenientes da mistura de indivíduos de constituição genética fixa, o pesquisador terá que estabelecer o padrão molecular das linhas originais que compõem o sintético.

Uma vez que os padrões moleculares das cultivares sejam caracterizados, a adição desses descritores pode facilitar a distinção dos materiais genéticos nos testes de DHE. Essa estratégia auxiliará o processo de registro e proteção de cultivares. O cultivar protegido, assegura direitos ao seu obtentor e caso haja algum tipo de uso indevido, o padrão molecular bem estabelecido, seria documento comprobatório de fraudes ou do uso sem devida autorização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material genético

Neste estudo, foram utilizadas cultivares de café portadoras de fatores de resistência à ferrugem mantidas em área experimental do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Essas cultivares foram escolhidas e utilizadas para o estudo devido sua importância e por serem de difícil discriminação por meio dos descritores morfológicos, os quais atualmente são recomendados para *C. arabica*. A dificuldade na discriminação é resultante da base genética estreita inerente a essa espécie e por serem oriundas de mesmas fontes de resistência ou fontes muito aparentadas. Os progenitores resistentes utilizados nos vários programas de melhoramento de *C. arabica* no Brasil são derivados do Híbrido de Timor ou de Icatu.

Dessa forma, foram estudadas 26 cultivares e cinco progênies elites resistentes à ferrugem e três cultivares suscetíveis a essa doença. As três cultivares suscetíveis foram escolhidas, pois duas destas, pertencem ao grupo Catuaí, cultivar comercial a mais plantada no Brasil, e uma, faz parte do grupo Bourbon, que são cultivares que, reconhecidamente, apresentam excelente qualidade de bebida.

Tabela 1. Cafeeiros utilizados na análise dos marcadores moleculares.

Nº	Cultivar ou Progênie	Instituição de Origem	Número RNC	Reação de resistência à ferrugem ¹	Fonte de resistência	Observações
1	Catuaí Vermelho IAC 144	IAC	02934	S	-	Cultivar comercial do Brasil
2	Catuaí Vermelho IAC 15	IAC	02927	S	-	Cultivar comercial do Brasil
3	Bourbon Amarelo UFV 535	UFV	-	S	-	Cultivar com padrão de qualidade de bebida
4	Catuaí Amarelo 2SL	MAPA/Fundação Procafé	04915	MR	Icatu	
5	Catucaiam 24137	MAPA/Fundação Procafé	28888	MR	Icatu	
6	Catucaiam 2015479	MAPA/Fundação Procafé	28885	MR	Icatu	
7	Catuaí 785-15	MAPA/Fundação Procafé	04996	MR	Icatu	Resistência a <i>M. exigua</i>
8	Catuaí Vermelho 20/15	MAPA/Fundação Procafé	04910	MR	Icatu	
9	Sabiá tardio	MAPA/Fundação Procafé	04992	MR	CIFC 832/1	
10	IBC-Palma-2	MAPA/Fundação Procafé	04998	MR	CIFC 832/1	
11	Acauã	MAPA/Fundação Procafé	04995	R	CIFC 832/2	
12	Tupi Amarelo IAC 5162	IAC	-	R	CIFC 832/2	Progênie elite do programa IAC
13	Tupi IAC 1669-33	IAC	02957	R	CIFC 832/2	
14	IAC 125 RN	IAC	28587	R	CIFC 832/2	Resistência a <i>M. exigua</i>
15	Obatã IAC 1669-20	IAC	02956	R	CIFC 832/2	
16	Obatã Amarelo IAC 4932	IAC	-	MR	CIFC 832/2	Progênie elite do programa IAC
17	Iapar 59	IAPAR	02324	R	CIFC 832/2	

¹S = Suscetível; MR = Moderadamente resistente; R = Resistente.

Tabela 1. Continuação.

Nº	Cultivar ou Progênie	Instituição de Origem	Número RNC	Reação de resistência à ferrugem ¹	Fonte de resistência	Observações
18	IPR 98	IAPAR	09950	R	CIFC 832/2	
19	IPR 99	IAPAR	09949	MR	CIFC 832/2	
20	IPR 100	IAPAR	09948	MR	BA-10	
21	IPR 103	IAPAR	09945	MR	Icatu	Resistência aos nematoides <i>M. paranaensis</i> e <i>M. incognita</i>
22	IPR 104	IAPAR	09944	R	CIFC 832/2	
23	Oeiras MG 6851	EPAMIG/UFV	04755	MR	CIFC 832/1	
24	Catiguá MG1	EPAMIG/UFV	18632	R	UFV440-10	
25	Catiguá MG2	EPAMIG/UFV	18633	R	UFV440-10	
26	MGS Catiguá 3	EPAMIG/UFV	22098	R	UFV440-10	Resistência a <i>M. exigua</i> e <i>Coffea Berry Disease</i>
27	Sacramento MG1	EPAMIG/UFV	18631	R	UFV438-52	
28	Araponga MG1	EPAMIG/UFV	18635	R	UFV446-08	
29	Pau Brasil MG1	EPAMIG/UFV	18634	R	UFV442-34	
30	Paraíso MG H 419-1	EPAMIG/UFV	15981	R	UFV445-46	
31	H 419-3-3-7-16-4-1	EPAMIG/UFV	-	R	UFV445-46	
32	H 419-10-6-2-5-1	EPAMIG/UFV	-	R	UFV445-46	Progênie elite Programa Epamig/UFV
33	H 419-10-6-2-10-1	EPAMIG/UFV	-	R	UFV445-46	Progênie elite Programa Epamig/UFV
34	H 419-10-6-2-12-1	EPAMIG/UFV	-	R	UFV445-46	Progênie elite Programa Epamig/UFV

¹S = Suscetível; MR = Moderadamente resistente; R = Resistente.

Essas 34 cultivares/progênes (Tabela 1) compõem o Ensaio Nacional de Cultivares, instalado nas principais regiões produtoras de café no território brasileiro. O mesmo encontra-se em andamento e justifica a importância desses materiais genéticos em nosso território. Para cada cultivar/progênie foram analisadas seis plantas, constituindo um total de 204 indivíduos. Dessa forma, pôde-se verificar a possível ocorrência de variabilidade genética entre e dentro dos materiais genéticos avaliados.

Atualmente, oito cultivares de *C. arabica* são protegidas pelo Serviço Nacional de Proteção de cultivares (BRASIL, 2013c). Dessas, seis cultivares (Araponga MG 1, Catiguá MG 1, Catiguá MG 2, IPR 98, Pau Brasil MG 1 e Sacramento MG 1) foram avaliadas nesse trabalho.

4.2. Extração do DNA

Para cada genótipo, foram coletadas folhas saudáveis, com coloração verde claro, jovens, mas totalmente expandidas. As folhas foram destacadas da planta pelo pecíolo de forma a permanecerem com limbo foliar intacto. O material foi envolvido em papel jornal umedecido e identificado, em seguida acondicionado em caixa de isopor e conduzido ao laboratório BioCafé/UFV.

No laboratório, as folhas foram lavadas em água corrente, secadas com auxílio de folhas de papel toalha, acondicionadas em tubos Falcon previamente identificado e, em seguida, armazenadas em freezer a temperatura de -80°C por 12 horas. De posse das amostras congeladas, as mesmas foram liofilizadas, maceradas em cadinhos com auxílio de pistilo e armazenadas em microtubos de 2,0 mL.

O DNA genômico das folhas maceradas foi extraído utilizando-se o método proposto por Diniz *et al.* (2005), com adaptações. Em microtubos de 2,0 mL, previamente identificados, foi adicionado 50 mg de tecido vegetal macerado de cada amostra. Dois tampões foram preparados, o primeiro denominado tampão de lise (Sorbitol 0,35 M, Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, EDTA 5 mM) e o segundo de extração (NaCl 2 M, CTAB 2%, Tris-HCl 0,2 M, EDTA 0,05 M). Os dois tampões foram misturados e acrescidos de sarcosil (5%), bissulfito de sódio (1%), carvão ativo (0,1%) e PVP-40 (2%). Após esse preparo, 1,5 mL da solução de extração, pré-aquecida a 65°C, foi adicionada em cada microtubo de 2,0 mL contendo 50 mg de tecido vegetal macerado de cada amostra.

A seguir, os tubos foram deixados em banho-maria a 65°C por 40 min. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante transferido para novos tubos, com a adição de 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados até completa homogeneização e centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm. Foi transferido 800 µL do sobrenadante para outro microtubo contendo 600 µL de isopropanol e mantido por 2 horas a -20°C. Após este período o material foi centrifugado por 20 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70% e 95%. O DNA foi ressuspensionado em 200 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 80 µg/µL e incubado em *thermomixer* a 37°C por 30 minutos. O DNA foi precipitado com 40 µL de NaCl 5M, mais 500 µL de isopropanol 100%, incubado por 2 horas a -20°C, recolhido por centrifugação por 20 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e após tratamento com etanol 70% e 95%, foi ressuspensionado em 200 µL de água ultra autoclavada. A qualidade e quantidade do DNA foram avaliados em *NanoDrop 2000*. O DNA foi diluído para a concentração de 25 ng/µL e armazenado a -20°C até o uso.

4.3. Amplificação com marcadores microssatélites

Foram utilizados *primers* microssatélites, sendo parte disponibilizados na literatura, alguns desenvolvidos a partir de dados do Projeto Brasileiro do Genoma Café e outros de biblioteca genômica enriquecida, estes dois últimos desenvolvidos no Laboratório BioCafé/UFV.

A amplificação por PCR foi realizada com um volume final de 20 µL, contendo: 50 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X da enzima, 1 mM de MgCl₂, 150 µM de cada dNTP e 0,1 µM de cada *primer*, completando o volume para 20 µL com água milli-Q estéril. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*). Após desnaturação inicial a 94°C por 2 min, foram realizados 10 ciclos de touchdown PCR, a 94°C por 30 seg, temperatura de anelamento decrescendo 1°C a cada ciclo (de 66°C até 57°C), durante 30 seg, e extensão a 72°C por 30 seg, seguidos por mais 30 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 57°C e extensão a 72°C, com 30 seg cada etapa. A extensão final foi realizada a 72°C, por 8 min.

Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Brito *et al.* (2010).

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram codificados como codominantes. Dessa forma, quando o loco apresentou quatro alelos, ele recebeu os códigos 11, 22, 33 e 44 para as formas homozigotas e 12, 13, 14, 23, 24 e 34 para as heterozigotas.

Todos os marcadores utilizados foram avaliados nos 204 cafeeiros, ou seja, nas seis plantas de cada cultivar/progênie analisada. Entretanto, na construção do dendrograma e análise de *fingerprinting* foi utilizado o *bulk* dos dados de cada cultivar. Assim, se uma banda aparecesse em apenas um dos seis indivíduos, esta seria contabilizada no perfil molecular da cultivar. A análise de *fingerprinting* também foi realizada com os dados de cada indivíduo que compõem cada cultivar/progênie.

Todas as análises foram realizadas pelo programa computacional GENES (CRUZ, 2013). Um dendrograma foi construído, utilizando a técnica de agrupamento UPGMA, a partir dos valores da matriz de distância gerada pelo complemento aritmético do índice não ponderado. Para o cálculo da distância apenas os locos polimórficos foram considerados na análise.

Também foi definido um conjunto de marcadores a serem utilizados na discriminação das cultivares/progênies utilizadas nesse estudo, estabelecendo o padrão de marcas para cada cultivar (*Fingerprinting*). Apenas *primers* polimórficos foram considerados nas análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada cultivar/progênie foram analisadas seis plantas. Um total de 31 *primers* microssatélites foram analisados nas 34 cultivares/progênies avaliadas, em que quatro deles não apresentaram bandas nítidas e, portanto, foram descartados. Do restante, 20 marcadores foram polimórficos (Tabela 2). Em todos os marcadores polimórficos, foi observada segregação entre e dentro das cultivares/progênies.

A segregação dentro das cultivares de *C. arabica* é esperada uma vez que esta espécie é tetraploide e, embora seja autógama, apresenta cerca de 10% de fecundação cruzada (LASHERMES *et al.*, 2000). Dessa forma, é necessário maior número de gerações de autofecundação para que a cultivar aumente a frequência de genes em homozigose. Além disso, essa espécie é perene com longo período juvenil, fato este que prolonga o avanço de gerações. No entanto, para viabilidade dos programas de melhoramento e a necessidade de lançamento de novas cultivares para atender o mercado, os melhoristas registram cultivares de *C. arabica* que, mesmo em geração F₆ ou mais avançadas, ainda podem segregar, ou que não estavam segregando, mas que devido a ploidia da espécie *C. arabica*, apresentam segregação tardia.

Tabela 2. Marcadores SSR analisados nas cultivares em estudo, números de alelos amplificados por cada loco e cultivares distintas por *primer*.

Nº	<i>Primer</i>	Alelos/ Loco	Cultivares/progênes distintas por <i>primer</i> ¹
1	EST-SSR 001	2	11, 13, 17, 22, 27, 32, 33 ²
2	EST-SSR 002	3	3, 10, 11 , 12, 13 , 15, 16, 17, 18, 19 , 24, 27, 28, 29, 32, 33, 34
3	EST-SSR 006	3	12, 13, 14, 17, 22, 24
4	EST-SSR 023	2	6, 8
5	EST-SSR 025	2	12, 13, 14
6	EST-SSR 029	2	7, 10, 19 , 27
7	EST-SSR 030	2	10, 11 , 16, 17, 18 , 22, 23, 29
8	EST-SSR 031	2	10
9	EST-SSR 032	3	7, 11 , 12, 14 , 17, 18, 19, 20, 21, 22 , 24, 25, 26 , 27, 29, 32, 33, 34
10	EST-SSR 035	2	2, 24, 25, 26, 27 , 29, 30, 32, 33, 34
11	EST-SSR 046	2	12, 13, 14, 17 , 18, 22, 24, 25, 29, 30, 32, 33, 34
12	EST-SSR 054	Monomórfico	-
13	EST-SSR 061	2	13, 14 , 17, 18, 22, 24, 25 , 29, 30, 32, 33, 34
14	EST-SSR 062	2	24, 25, 26 , 32, 33, 34
15	EST-SSR 063	Monomórfico	-
16	EST-SSR 069	3	4, 5, 6, 12, 13, 14 , 24, 30, 32, 33, 34
17	EST-SSR 074	2	25, 26 , 32, 33, 34

¹Cultivares descritas na Tabela 1; ²Números em negrito corresponde a cultivar/progênie cujo loco não segregou em todos os indivíduos que a constitui.

Tabela 2. Continuação.

Nº	Primer	Alelos/ Loco	Cultivares/progênes distintas por primer ¹
18	EST-SSR 077	2	24, 25 , 26 , 32, 33 , 34
19	EST-SSR 096	4	24, 25 , 26 , 32, 33, 34
20	SSR 16	2	1 , 2 , 3 , 6, 9 , 10, 12, 16 , 17, 22, 23, 24 , 26, 27, 28 , 29, 31 , 32 , 33, 34
21	SSR 95	3	4, 5, 7 , 9 , 11, 17, 20, 23 , 28, 30
22	SSR-08	Monomórfico	-
23	SSRCa 04	Monomórfico	-
24	SSRCa 11	Monomórfico	-
25	SSRCa 15	Monomórfico	-
26	SSRCa 18	Não amplificou	-
27	SSRCa 19	Não amplificou	-
28	SSRCa 23	Não amplificou	-
29	SSRCa 40	Monomórfico	-
30	SSRCa 46	Não amplificou	-
31	SSRCa 52	4	10 , 24, 25, 27, 29, 32 , 33 , 34

¹Cultivares descritas na Tabela 1; ²Números em negrito corresponde a cultivar/progênie cujo loco não segregou em todos os indivíduos que a constitui.

Ao analisar os 20 marcadores microsatélites polimórficos, 47 bandas foram amplificadas. Foi observada média de 2,35 bandas por *primer*, variando entre duas a quatro bandas. A percentagem de *primers* polimórficos foi de 74,04%. No entanto, isso não indica alta variabilidade entre as cultivares/progênes avaliadas, uma vez que os *primers* utilizados nesse estudo foram selecionados por serem polimórficos em outros estudos. Em testes desses *primers* microsatélites, realizados em cafeeiros, tem sido verificado que cerca de 10% dos marcadores são polimórficos em *C. arabica*. Capucho (2008), em trabalho com população F₂ resultante do cruzamento entre Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) e Híbrido de Timor UFV 443-03, obteve 7,34% de polimorfismo em 286 *primers* SSR. Número reduzido de locos SSR polimórficos para *C. arabica* também foi observado por Vieira *et al.* (2010).

A média de bandas obtida por *primer* (2,35) indicou haver estreita base genética entre as cultivares/progênes avaliadas. Isso pode ser explicado pelo baixo número de plantas que foram introduzidas no Brasil (TEIXEIRA *et al.*, 1999) sendo

estas, a base genética das cultivares atuais. Segundo Setotaw *et al.* (2013), a base genética de 121 cultivares lançadas no Brasil, entre 1939 e 2009, é devida a apenas 13 diferentes genitores. Esses autores ainda verificaram que sete genitores contribuíram com 97,55% da base genética das cultivares de *C. arabica* do Brasil. Além disso, outro fator importante são os genitores utilizados como fonte de resistência à ferrugem do cafeeiro nos vários programas de melhoramento genético de *C. arabica* no Brasil. Esses são derivados basicamente do Híbrido de Timor ou de Icatu. Nesse trabalho apenas três cultivares são suscetíveis à ferrugem, enquanto as demais são portadoras de resistência a essa doença e são derivadas dos genitores citados acima, exceto a cultivar IPR 100, cujo genitor utilizado como fonte de resistência à ferrugem foi BA-10. Este é um germoplasma de origem indiana portador dos genes S_{H2} e S_{H3} de resistência a *Hemileia vastratrix*.

Analisando o padrão de bandas obtido em cada marcador molecular nas diferentes plantas das cultivares/progênes, foram descartadas as plantas 07-B2-P2 (IBC-Palma-2), 16-B3-P1 (Tupi IAC 1669-33), 30-B2-P4 (IAC 125 RN), 32-B1-P6 (Catuaí Vermelho IAC 15). Essas plantas apresentaram padrão atípico, diferente do padrão da cultivar em vários locos analisados, indicando que correspondem a mistura e não a cultivar analisada. Esse resultado foi comprovado pelas características morfológicas. No campo, foi verificado que a planta 32-B1-P6 da cultivar Catuaí Vermelho IAC 15 apresenta frutos amarelos, diferindo da cor dos frutos da cultivar, que são vermelhos. Também foi verificado que a cultivar Tupi IAC 1669-33 apresenta variação em relação à resistência a ferrugem. A planta excluída dessa cultivar é suscetível a tal enfermidade. Foi verificado que a planta 30-B2-P4 da cultivar IAC 125 RN é bem mais vigorosa que as demais plantas dessa cultivar.

A análise do padrão de bandas obtido com os diferentes marcadores moleculares permitiu observar segregação dentro e entre as cultivares. Na Figura 1 encontra-se um exemplo, onde observou-se polimorfismo dentro das cultivares Catiguá MG1 e Sacramento MG1 e entre as cultivares Catiguá MG2 e Araponga MG1. Nesse exemplo, os indivíduos homocigotos portadores do alelo “b” foram codificados como 22, indivíduos homocigotos portadores do alelo “a” e heterocigoto “ab”, ficaram com 11 e 12, respectivamente.

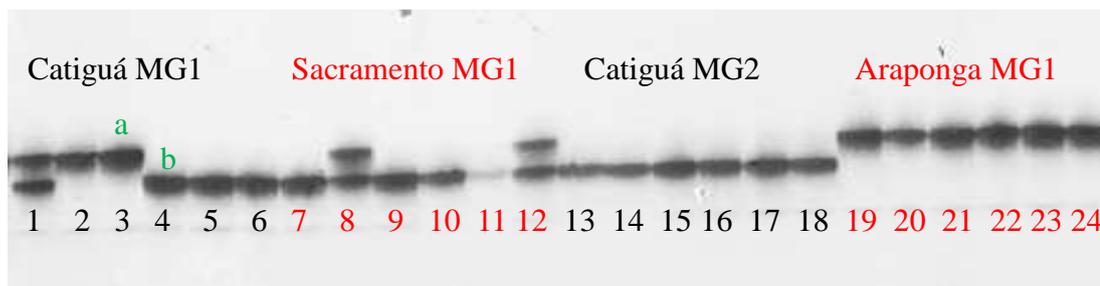


Figura 1. Marcador microssatélite EST-SSR 032 avaliado em quatro cultivares de *C. arabica*.

Com os marcadores microssatélites avaliados observou-se polimorfismo entre todas as cultivares/progênes estudadas. Entretanto, assim como demonstrado na Figura 1, o polimorfismo nem sempre foi observado em todas as plantas constituintes de uma cultivar/progênie.

Oito cultivares/progênie (Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Vermelho IAC 15, Bourbon Amarelo UFV535, Catucaí Vermelho 20/15, Sabiá tardio, Obatã IAC 1669-20, IPR 103 e H 419-3-3-7-16-4-1) não apresentaram segregação entre os indivíduos que as constituem em nenhum dos 20 locos polimórficos analisados. Esse fato demonstra que, provavelmente, essas cultivares/progênes possuem elevados níveis de homozigose. Em quatro cultivares/progênes (IAC 125 RN, IPR 99, IPR 100 e MGS Catiguá 3) foi observado polimorfismo dentro de um único loco (5%). Embora a quantidade de loco polimórfico seja a mesma, o número de indivíduos que apresentaram diferentes bandas dentro de cada cultivar/progênie variou. Na cultivar IAC 125 RN, um único indivíduo apresentou-se segregante. O mesmo foi verificado em dois indivíduos da cultivar MGS Catiguá 3, ao passo que nas cultivares IPR 99 e IPR 100 foi observada segregação em três, dos seis indivíduos que às constituem.

Dentro de dez cultivares/progênie (Catucaí Amarelo 2SL, Catucaiam 24137, Catucaí 785-15, IBC-Palma-2, Acauã, Tupi IAC 1669-33, Obatã Amarelo 4932, Oeiras MG 6851, Araçonga MG1 e H 419-10-6-2-10-1) foi observado polimorfismo em dois locos (10%). Em duas cultivares (Catucaiam 2015479 e Catiguá MG2) ocorreu polimorfismo dentro desses genótipos em três locos (15%). Em duas cultivares/progênes (IPR 98 e 3 H 419-10-6-2-12-14) foi observado polimorfismo dentro de quatro locos (20%). Dentro da cultivar Paraíso MG H 419-1 foi observado polimorfismo em cinco locos (25%). Em duas cultivares (IPR 104 e Sacramento MG1) ocorreu polimorfismo dentro de seis locos (30%). Nas cultivares Tupi Amarelo IAC 5162 e Iapar 59, foi observado polimorfismo dentro de sete locos

(35%). Na cultivar Pau Brasil MG1, foi observado polimorfismo em oito locos (40%). A progênie H 419-10-6-2-5-1 apresentou polimorfismo em nove locos (45%). A cultivar Catiguá MG1 apresentou segregação em onze locos (55%).

Para a construção do dendrograma e estabelecimento do padrão molecular (*fingerprinting*) das cultivares, foram considerados apenas os marcadores microssatélites polimórficos e que se comportaram como diploides e codominantes. Dessa forma, dos 20 marcadores polimórficos analisados, 16 foram selecionados. Eliminou-se os EST-SSR 006, EST-SSR 069, EST-SSR 096, SSRCa 52, que amplificaram três ou quatro bandas por indivíduo.

Pela análise do dendrograma e efetuando-se um corte a 40% da dissimilaridade máxima verificada no último nível de fusão (0,41), observou-se a formação de 14 grupos (Figura 2). Nove cultivares/progênie (IBC-Palma-2, Acauã, IPR 99, Catiguá MG1, Catiguá MG2, MGS Catiguá 3, Sacramento MG1, Paraíso MG H 419-1, H 419-10-6-2-5-1) formaram grupos unitários, sendo separadas das demais. Formaram-se três grupos composto por duas cultivares/progênie cada. O primeiro grupo compreendeu as cultivares Iapar 59 e IPR 104. Essas cultivares foram desenvolvidas pelo programa de melhoramento do IAPAR e também apresentam a mesma origem genética, ou seja, ambas são derivadas do germoplasma Sarchimor (Villa Sarchi x Híbrido de Timor). O segundo grupo agrupou as cultivares Tupi IAC 1669-33 e IAC 125 RN, enquanto o terceiro grupo foi formado pelas progênie H 419-10-6-2-10-1 e H 419-10-6-2-12-1. Os três grupos alocaram materiais de mesma instituição de origem, IAPAR, IAC e EPAMIG/UFV, respectivamente. As cultivares Tupi IAC 1669-33 e IAC 125 RN foram selecionadas a partir de sementes de um mesmo híbrido (CIFC H361/4). O mesmo ocorreu com as progênie H 419-10-6-2-10-1 e H 419-10-6-2-12-1, justificando o fato desses genótipos terem ficado em um mesmo grupo.

Um grupo foi formado por três cultivares Tupi Amarelo IAC 5162, IPR 98 e Pau Brasil MG1. Um último grupo foi formado pelas demais cultivares. Este pode ser dividido em dois subgrupos. Um destes, constituído pelas cultivares/progênie Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Vermelho IAC 15, Bourbon Amarelo UFV535, Catucaiam 2015479, Sabiá tardio, Obatã IAC 1669-20, Obatã Amarelo 4932, Araponga MG1, H 419-3-3-7-16-4-1 e o outro pelas cultivares Catuaí Amarelo 2SL, Catucaiam 24137, Catuaí 785-15, Catuaí Vermelho 20/15, IPR 100, IPR 103, Oeiras MG 6851. No primeiro subgrupo, as cultivares Catuaí

Vermelho IAC 144, Catuaí Vermelho IAC 15 e a progênie Bourbon Amarelo UFV 535, são suscetíveis à ferrugem. Além disso, duas dessas são cultivares do grupo Catuaí. Dessa forma é esperada alta similaridade entre as mesmas. A cultivar Catucaiam 2015479 foi originada a partir de cruzamento, em que um dos genitores era uma cultivar Catuaí. O mesmo ocorreu com a origem da cultivar Obatã IAC 1669-20. A cultivar Obatã Amarelo IAC 4932 originou-se de um provável cruzamento natural entre Obatã 1669-20 com Catuaí Amarelo. A cultivar Araponga MG1 é resultado do cruzamento artificial entre a cultivar Catuaí Amarelo IAC 86 e o Híbrido de Timor UFV 446-08. A progênie H 419-3-3-7-16-4-1 é resultante do cruzamento de Catuaí Amarelo IAC 30 com o acesso de Híbrido de Timor UFV 445-46. Todas essas cultivares têm a cultivar Catuaí Amarelo em suas constituições genéticas.

Foi possível distinguir individualmente 29, das 34 cultivares/progênies avaliadas. Não foi possível distinguir as cultivares Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Vermelho IAC 15 e a progênie H 419-3-3-7-16-4-1, pois a distância entre elas foi zero. A similaridade (100%) entre as cultivares Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Vermelho IAC 15, pode ser explicada pelo fato que essas, são derivadas de uma mesma planta na geração F_1 (H 2077-2). Características fenotípicas da progênie H 419-3-3-7-16-4-1 demonstram a proximidade desta em relação às cultivares Catuaí, corroborando com a alta similaridade verificada entre esses materiais nesse estudo. A distância entre as cultivares Catucaí Amarelo 2SL e Catucaiam 24137 também foi zero, sendo estas as menores distâncias observadas entre as cultivares/progênies analisadas. As cultivares do grupo Catucaí são derivadas do cruzamento natural entre o germoplasma Icatu e Catuaí, ou seja, possível razão pela qual foi observada a similaridade de 100%. Além disso, ambas apresentam grande semelhança nas características fenotípicas.

A dissimilaridade obtida no último nível de fusão foi de 0,41. A dissimilaridade máxima foi verificada entre as cultivares Catucaí Amarelo 2SL e MGS Catiguá 3, sendo igual a 0,65625. A mesma distância ocorreu entre as cultivares Catucaí 785-15 e MGS Catiguá 3. Esse valor de dissimilaridade pode ser devido aos genitores utilizados como fonte de resistência à ferrugem. Nas cultivares Catucaí, um dos genitores é o germoplasma Icatu. Em contraste, a cultivar MGS Catiguá 3, o genitor que forneceu alelos de resistência à ferrugem é o Híbrido de

Timor UFV 440-10, contudo ambos têm no genoma genes oriundos da espécie *Coffea canephora*.

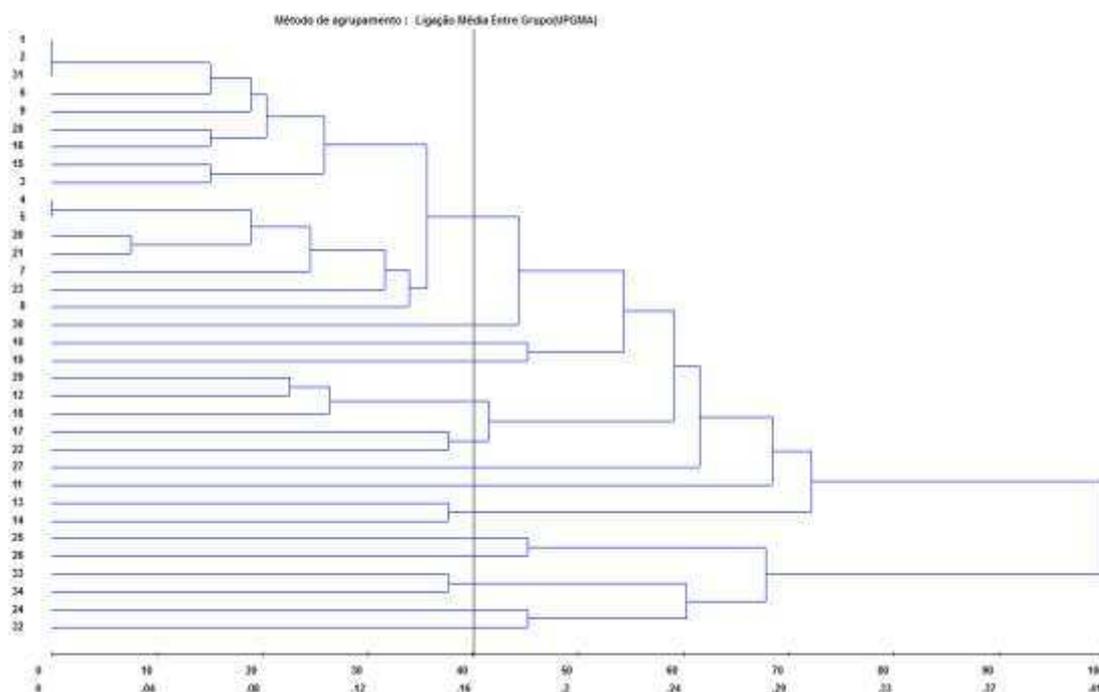


Figura 2. Dendrograma baseado na análise de marcadores microssatélites em 34 cultivares/progênes de *Coffea arabica*, obtido pela técnica UPGMA e com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice não ponderado.

Foi realizada a análise de *fingerprinting* das cultivares/progênes avaliadas. Essa análise foi realizada de duas maneiras distintas. Determinou-se o *fingerprinting* utilizando os dados obtidos a partir do *bulk* dos indivíduos de uma cultivar/progênie. Este também foi determinado por meio dos dados dos indivíduos das cultivares/progênes.

Foram obtidos 31 perfis moleculares distintos (Tabela 3) por meio do *bulk* dos dados dos indivíduos de uma cultivar/progênie. Um único perfil molecular foi obtido para as cultivares Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Vermelho IAC 15 e a progênie H 419-3-3-7-16-4-1. Dessa forma, assim como no dendrograma, essas cultivares/progênie não foram discriminadas. O mesmo ocorreu para as cultivares Catucaí Amarelo 2SL e Catucaiam 24137. Os indivíduos de genótipos homozigotos 11, 22 e 33, foram representados por 1, 2 e 3, respectivamente. Cada genótipo recebeu uma cor distinta.

Tabela 3. Perfil molecular das cultivares/progênes obtidos pelo *bulk* dos dados dos indivíduos das cultivares/progênes de café arábica.

Cultivar/progênie	Marcadores microsatélites															
	EST ¹ -SSR ²															SSR ²
	01	02	23	25	29	30	31	32	35	46	61	62	74	77	16	95
1 Catuaí Vermelho IAC 144	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1	1
2 Catuaí Vermelho IAC 15	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1	1
3 Bourbon Amarelo UFV535	2	2	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1	1
4 Catucaí Amarelo 2SL	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	2	13
5 Catucaiam 24137	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	2	13
6 Catucaiam 2015479	2	3	12	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	12	1
7 Catucaí 785-15	2	3	2	12	12	2	12	12	2	1	1	2	2	1	2	3
8 Catucaí Vermelho 20/15	2	3	1	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	2	1
9 Sabiá tardio	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1	2
10 IBC-Palma-2	2	2	2	12	12	1	2	1	2	1	1	2	2	1	12	1
11 Acauã	12	1	2	12	2	1	12	3	2	1	1	2	2	1	2	12
12 Tupi Amarelo IAC 5162	2	23	2	12	2	2	12	13	2	12	1	2	2	1	12	1
13 Tupi IAC 1669-33	12	2	2	1	2	2	12	1	2	2	2	2	2	1	2	1
14 IAC 125 RN	2	3	2	1	2	2	12	3	2	2	2	2	2	1	2	1
15 Obatã IAC 1669-20	2	2	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	2	1
16 Obatã Amarelo 4932	2	23	2	12	2	12	12	1	2	1	1	2	2	1	1	1
17 Iapar 59	12	23	2	12	2	1	12	13	2	2	12	2	2	1	12	13
18 IPR 98	2	23	2	12	2	1	12	13	2	12	12	2	2	1	2	1
19 IPR 99	2	2	2	12	1	2	12	13	2	1	1	2	2	1	2	1
20 IPR 100	2	3	2	12	2	2	12	2	2	1	1	2	2	1	2	13
21 IPR 103	2	3	2	12	2	2	12	2	2	1	1	2	2	1	2	1
22 IPR 104	12	3	2	12	2	1	12	3	2	12	12	2	2	1	1	1
23 Oeiras MG 6851	2	3	2	12	2	12	12	1	2	1	1	2	2	1	12	3
24 Catiguá MG1	2	13	2	12	2	2	12	13	12	12	12	12	2	12	1	1
25 Catiguá MG2	2	3	2	12	2	2	12	3	12	12	2	1	1	12	2	1
26 MGS Catiguá 3	2	3	2	12	2	2	12	3	1	1	1	1	1	2	12	1
27 Sacramento MG1	12	13	2	12	12	2	12	13	1	1	1	2	2	1	12	1
28 Araçonga MG1	2	23	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1	13
29 Pau Brasil MG1	2	23	2	12	2	12	12	13	12	12	12	2	2	1	12	1
30 Paraíso MG H 419-1	2	3	2	12	2	2	12	1	12	12	12	2	2	1	2	13
31 H 419-3-3-7-16-4-1	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1	1
32 H 419-10-6-2-5-1	1	13	2	12	2	2	12	13	1	12	12	12	12	2	1	1
33 H 419-10-6-2-10-1	1	1	2	12	2	2	12	3	1	2	2	12	1	2	12	1
34 H 419-10-6-2-12-1	2	1	2	12	2	2	12	3	1	2	2	12	12	12	1	1

¹EST = Expressed Sequence Tags; ²SSR = Simple Sequence Repeats

Foram obtidos também, os perfis moleculares das cultivares/progênes através dos dados individuais dos genótipos que as constituem (Tabela 4). Nesse caso, todos genótipos observados nos indivíduos de uma cultivar/progênie, em cada marcador, foram anotados. Observou-se, em cada marcador, de um à três genótipos por cultivar/progênie.

Tabela 4. Perfil molecular das cultivares/progênes obtidos através dos dados individuais dos genótipos que constituem as cultivares/progênes de café arábica.

Cultivar/ Progênie	Marcadores Microsatélites															
	EST ¹ -SSR ²														SSR ²	
	001	002	023	025	029	030	031	032	035	046	061	062	074	077	16	95
Catuai Vermelho IAC 144	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1	1
Catuai Vermelho IAC 15	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	1 2	2	1	1	1
Bourbon Amarelo UFV535	2	2	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1	1
Catucái Amarelo 2SL	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	2	1 13 3
Catucaiam 24137	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	2	13 3
Catucaiam 2015479	2	3	1 2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1 2	1
Catucái 785-15	2	3	2	12	1 2	2	12	1 2	2	1	1	2	2	1	2	3
Catucái Vermelho 20/15	2	3	1	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	2	1
Sabiá tardio	2	3	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	1	2
IBC-Palma-2	2	2	2	12	1 2	1	2	1	2	1	1	2	2	1	1 2	1
Acauã	1 2	1	2	12	2	1	12	3	2	1	1	2	2	1	2	1 12 2
Tupi Amarelo IAC 5162	2	2 3	2	1 12	2	2	12	1 13 3	2	1 12	1	2	2	1	1 2	1
Tupi IAC 1669-33	1 2	2	2	1	2	2	12	1	2	2	2	2	2	1	2	1
IAC 125 RN	2	3	2	1	2	2	12	3	2	2	2	2	2	1	2	1
Obatã IAC 1669-20	2	2	2	12	2	2	12	1	2	1	1	2	2	1	2	1
Obatã Amarelo 4932	2	13 3	2	12	2	1 12	12	1	2	1	1	2	2	1	1	1
Iapar 59	12 2	2 23	2	12	2	1	12	13 3	2	2	12 2	2	2	1	1 12 2	1 3

¹EST = Expressed Sequence Tags; ²SSR = Simple Sequence Repeats

Tabela 4. Continuação.

Cultivar/ Progênie	Marcadores Microsatélites																
	EST ¹ -SSR ²															SSR ²	
	001	002	023	025	029	030	031	032	035	046	061	062	074	077	16	95	
IPR 98	2	2 23 3	2	12	2	1	12 1 3	2	1 12 2	1 12 2	2	2	1	2	1		
IPR 99	2	2	2	12	1	2	12 1 3	2	1	1	2	2	1	2	1		
IPR 100	2	3	2	12	2	2	12 2	2	1	1	2	2	1	2	1 13 3		
IPR 103	2	3	2	12	2	2	12 2	2	1	1	2	2	1	2	1		
IPR 104	1 2	3	2	12	2	1 12	12 3	2	1 2	1 2	2	2	1	1	1		
Oeiras MG 6851	2	3	2	12	2	1 12 2	12 1	2	1	1	2	2	1	1 2	3		
Catiguá MG1	2	1 13 3	2	12	2	2	12 1 13 3	1 12 2	1 12	1 12 2	1 12 2	2	1 12	1	1		
Catiguá MG2	2	3	2	12	2	2	12 3	1 12 2	1 2	2	1	1	12	1	1		
MGS Catiguá 3	2	3	2	12	2	2	12 3	1	1	1	1	1	2	1 2	1		
Sacramento MG1	1 12 2	1 13 3	2	12	1 2	2	12 13 3	1	1	1	2	2	1	1 2	1		
Araponga MG1	2	2 23 3	2	12	2	2	12 1	2	1	1	2	2	1	1	1 13		
Pau Brasil MG1	2	2 23 3	2	12	2	1 12 2	12 1 3	12 2	1 12	1 12	2	2	1	1 2	1		
Paraíso MG H 419-1	2	3	2	12	2	2	12 1	1 12	12 2	12 2	2	2	1	2	1 13		
H 419-3-3-7-16-4-1	2	3	2	12	2	2	12 1	2	1	1	2	2	1	1	1		
H 419-10-6-2-5-1	1	1 13 3	2	12	2	2	12 13 3	1	12 2	12 2	12 2	12 2	1 12 2	1	1		
H 419-10-6-2-10-1	1	1	2	12	2	2	12 3	1	2	2	1 12	1	2	1 2	1		
H 419-10-6-2-12-1	2	1	2	12	2	2	12 3	1	2	2	1 12 2	1 12 2	1 12 2	1	1		

¹EST = Expressed Sequence Tags; ²SSR = Simple Sequence Repeats

Como pode-se observar, algumas cultivares/progênes apresentam mais de um genótipo por loco. Nesse caso, na construção do perfil molecular das cultivares/progênes, todos os diferentes genótipos apresentados por uma cultivar/progênie podem ser considerado. Assim, por exemplo, a cultivar Acauã, quando avaliada pelo marcador EST-SSR 001 apresentou indivíduos de genótipos 1 e 2. Caso se tenha o interesse de saber se determinado indivíduo pertence a tal cultivar, esse pode apresentar qualquer um dos dois genótipos citados e ainda assim pertencer à cultivar Acauã. Como já citado, em *C. arabica* podem ocorrer segregação dentro das cultivares. Assim, esse tipo de análise, em que se avalia a segregação dentro de cada cultivar/progênie é de suma importância. Ao se construir o perfil molecular baseado exclusivamente no *bulk* dos dados dos indivíduos, pode-se mascarar os diferentes genótipos que podem ocorrer.

Uma vez obtido, o perfil molecular único de uma cultivar facilitará a distinção de genótipos aparentados e que apresentam características fenotípicas altamente semelhantes. Nesse sentido, o *fingerprinting* constitui-se em uma ferramenta auxiliar aos descritores recomendados para a espécie, sendo extremamente útil nos testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade, exigidos no processo de registro e proteção de determinada cultivar. O fato de algumas cultivares não terem sido discriminadas evidencia a necessidade de dar continuidade ao trabalho incorporando outros marcadores moleculares polimórficos na análise, o que permitiria caracterizar individualmente maior número de genótipos, mesmo aqueles de base genética muito estreita.

6. CONCLUSÕES

1 - Apesar do cafeeiro arábica ser uma espécie autógama foi constatado segregação dentro de algumas cultivares, dificultando a discriminação das cultivares.

2 - Foram construídos dois perfis moleculares para as cultivares em estudo, um que deve ser usado quando se pretende fazer fingerprinting de cultivares fazendo-se bulk de sementes e outro quando se analisa plantas individualmente.

3 - As cultivares/progênie Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Vermelho IAC 15 e H 419-3-3-7-16-4-1 apresentaram o mesmo perfil molecular. O mesmo ocorreu com as cultivares Catucaí Amarelo 2SL e Catucaiam 24137. Para essas cultivares, outros marcadores, além dos estudados, devem ser investigados de forma a permitir distingui-las.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. T. E.; GUERREIRO-FILHO, O.; MALUF, M. P.; GALLO, P. B.; FAZUOLI, L. C. Caracterização de cultivares de *Coffea arabica* mediante utilização de descritores mínimos. **Bragantia** [online]. 2004, vol.63, n.2, pp. 179-192. ISSN 1678-4499.

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

ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; Charrier, A. Genetic diversity of wild coffee *Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, 118:53-65, 2001.

BALDONI, L.; TOSTI, N.; RICCIOLINI, C.; BELAJ, A.; ARCIONI, S.; PANNELLI, G., GERMANÀ, M. A.; MULAS, M.; PORCEDDU, A. Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. **Annals of Botany**, v.98, p.935-942, 2006.

BAYLE, D. C. Isozymic variation and plant breeders rights. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**. pp.425-440. Elsevier, Amsterdam, 1983.

BERTHAUD, J. **Les ressources génétique pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes. Evaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application.** 1986. 379f. Tese (Doutorado em Agronomia) – ORSTOM, Paris.

BETTENCOURT, A. J. **Melhoramento genético do cafeeiro: transferência de fatores de resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica*.** 1981. 93 f. Tese (Doutorado) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1981.

BETTENCOURT, A. J.; LOPES, J. Transferência de fatores de resistência a *Hemileia vastatrix* do Híbrido de Timor para o cultivar Caturra Vermelho de *Coffea arabica*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1976. p. 287-294.

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 J. R., C. J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R., (Eds.) **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1988. v.4, p.199-234.

BEYENE, Y.; BOTHA, A. M.; MYBURG, A. A. A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional thioopian highland maize. **African Journal of Biotechnology**.v. 4, n.7, p. 586-595, July 2005.

BONAMICO, N.; AIASSA, J.; IBAÑEZ, M.; DI RENZO, M.; DÍAZ, D.; SALERNO, J. Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. **RIA**, Argentina, v.33, n.2, p.129-144. Agosto 2004.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 5.ed. Viçosa: UFV, 2009. 529p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cultivarweb, gerenciamento de informações. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php?txt_ordem=&postado=1&acao=pesquisar&first=C>. Acesso em: 02 jul. 2013a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cultivarweb, gerenciamento de informações. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php?acao=pesquisar&cs=1&postado=1&first=C>. Acesso em: 23 jul. 2013c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Informações ao Usuário. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registro-nacional-cultivares/informacoesusuarios>>. Acesso em: 28 jun. 2013b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei n. 10.711, 5 ago. 2003. Decreto n. 5.153, 23 jul. 2004, Legislação brasileira sobre sementes e mudas. Brasília, 2004. 121p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Brasília: MAPA/ACS, p.202, 2011.

BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; GALLINA, A. P.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; 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, p. 255-264, 2010.

CABRAL, P. G. C., ZAMBOLIM, E. M., ZAMBOLIM, L., LELIS, T. P., CAPUCHO, A. S., CAIXETA, E. T. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes** 4:129-130.

CAIXETA, E. T., FERRÃO, L. F. V., MACIEL-ZAMBOLIM, E. (2012). Marcadores Moleculares. In: Borem, A.; Fristsche-Neto, R. (eds.). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: DFT/UFV, 2009. p.11-93.

CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Características rastreáveis das cultivares de café. In: Zambolim, L. (ed.). **Rastreabilidade para a cadeia produtiva do café**. Viçosa: UFV, DFP, cap. 9, p. 248, 2007.

CAPUCHO, A. S. **Herança e mapeamento de QTLs da resistência do Híbrido de Timor à ferrugem do cafeeiro**. 2008. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

CAPUCHO, A. S., ZAMBOLIM, E. M., FREITAS, R. L., HADDAD, F., CAIXETA, E. T., ZAMBOLIM, L. 2012. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes** 7:1-3.

CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; CAIXETA, E. T.; FRANCHINI, E. A.; PEREIRA, A. A. Avaliação da resistência de cultivares de café à raça II de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. **Anais... Águas de Lindóia – SP**, 2007.

CARDOSO, R. M. L, ZAMBOLIM L, CHAVES G. M. Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* coletada do germoplasma de *Coffea arabica* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatol Bras** 13:4:343-346, 1998.

CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie Arábica. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, 21:174-180, 1945.

CARVALHO, A. Novas variedades mais produtivas. **Agricultura Hoje**, São Paulo, v.6, n.68, p.32-34, 1981.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. Melhoramento do cafeeiro: XLI. Produtividade do Híbrido Timor, de seus derivados e outras fontes de resistência a *Hemileia vastatrix*. **Bragantia**, Campinas, v. 48, n. 1, p. 73-86, 1989.

CARVALHO, C. H. S. (2008). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. 01. ed. EMBRAPA CAFÉ. Brasília-DF 332 p.

CARVALHO, C. H. S. DE; FAZUOLI, L. C.; CARVALHO, G. R.; GUERREIRO-FILHO, O.; PEREIRA, A. A.; ALMEIDA, S. R. de.; *et al.* Cultivares de café arábica de porte baixo. In: Carvalho, C. H. S. de. (Ed.). **Cultivares de café: Origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, p. 157-224, 2008.

CHARAFI. J.; EL MEZIANE. A.; MOUKHLI. A.; BOULOUHA. B.; EL MODAFAR. C.; KHADARI. B. Menara gardens: a Moroccan olive germplasm collection identified by SSR locusbased genetic study. **Genetic Resource Crop Evolution**, v.55, p.893-900, 2008.

COMBES, M. C.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; ROVELLI, P.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. Characterization of microsatellites locos in *Coffea arabica* and related coffee species. **Molecular Ecology**, 9:1171-1193, 2000.

CONAB 2013. Acompanhamento da safra brasileira – Safra 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 04 abril 2013.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; SILVA, S. O.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, n. 132, p. 259-268, 2003.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CUBRY, P. **Structuration de la diversité génétique et analyse des patrons de déséquilibre de liaison de l'espèce *Coffea canephora* Pierre ex. Froehner**. 2009. 249f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Université Montpellier II, Montpellier. 2009.

DAVIS, A. P., GOVAERTS, R., BRIDSON, D. M., STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 152, 465-512, 2006.

DINIZ, L. E. C.; SAKIYAMA, N. S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; LOUREIRO, M. E.; PEREIRA, A. A.; AMBOLIM, L. Analysis of AFLP markers associated to the *Mex-1* resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5:387-393, 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**, 7:1-10, 2011.

DUSSERT, S.; LASHERMES, P.; ANTHONY, F.; MONTAGNON, C.; TROUSLOT, P.; COMBES, M. C.; BERTHAUD, J.; NOIROT, M.; HAMON, S. Le caféier, *Coffea canephora*. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC. **Diversité génétique des plantes tropicales cultivées**. Montpellier: CIRAD, p.175-194, 1999.

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

FONSECA, I. C. B., SERA, T., PETEK, M. R. Predição de valores genéticos aditivos na eleição visando obter cultivares de café mais resistentes à ferrugem. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.1, p.133-140, 2008.

GARCIA, A. F.; ALBERINI, J. L.; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P. de. Microsatellite molecular markers in the cultivar identification of Brazilian soybean for human consumption. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.7, p.155-164, 2007.

GHISLAIN, M.; SPOONER, D. M.; RODRÍGUEZ, F.; VILLAMÓN, F.; NÚÑEZ, J.; VÁSQUEZ, C.; WAUGH, R.; BONIERBALE, M. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.881-890, 2004.

GICHURU, E. K., ITHIRU, J. M., SILVA, M. C., PEREIRA, A. P., VÁRZEA, V. M. P. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. **Tropical Plant Pathology** 37:424-427, 2012.

GUERREIRO-FILHO, O., MOURA, W. M, FAZUOLI, L. C., EIRA, M. T. S. Cafeeiro: nova espécie vegetal passível de proteção no Brasil. **O Agrônomo**, v.53, n.2, p.38-39, 2001.

HOKANSON, S. C.; SZEWC-MCFADDEN, W. F.; LAMBOY, M. J. R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and

relationships in a *Malus domestica* borkh. core subset collection. **Theor. Appl. Genet.** 97:671-683, 1998.

KRUG, C. A. Plano de Estudos em execução no Departamento de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas. Campinas: Instituto Agrônomo, 1936. 39p. (Boletim Técnico n. 26)

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**, 101:669–676, 2000.

LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B. *et al.* Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v.100, p.139-146, 2000.

LASHERMES, P.; CROS, J.; MARMEY, P.; CHARRIER, A. Use of random amplified DNA markers to analyze genetic variability and relationships of *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 40:91-93, 1993.

LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; A. CHARRIER. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, 87: 59-64, 1996.

LOMBARD, V.; BARI, C. P.; DUBREUIL, P.; BLOUET, F.; ZHANG, D. **Potential use of AFLP markers for the distinction of rapeseed cultivars.** In: XX INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, Canberra, Australia, 1999. Disponível em: <<http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/587.htm>>. Acessado em: 09 abril 2013.

LOPES, R. *et al.* Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP): Aspectos Técnicos e Interpretação Genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.5, 2002.

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**, 21:105-113, 2008.

MALAVOLTA, E., RENA, A. B., ROCHA, M., YAMADA, T. Cultura do Cafeeiro – fatores que afetam a produtividade. Piracicaba SP. 1986.

MALUF, M. P.; OLIVEIRO, G. F.; FAZUOLI, L. E. Biotecnologia: aporte tecnológico ao melhoramento do cafeeiro no IAC. **O Agrônômico**, Campinas, v. 53, n. 2, 2001.

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

MATA, J. S. da; SERA, T.; AZEVEDO, J. A.; ALTÉIA, M. Z.; COLOMBO, L. A.; SANCHES, R. S.; PETEK, M. R.; FADELLI, S. Seleção para resistência ao nematóide *Meloidogyne paranaenses* EMN-95001: IAPARLN 94066 de “Catuaí x Icatu” em área altamente infestada. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1, 2000, Poços de Caldas. Resumos expandidos. Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 515 – 518.

MATHIAS, M. R.; SAGRADO, B. D.; KALAZICH, J. B. Use of SSR markers to identify potato germplasm in INIA Chile breeding program. **Agricultura Técnica**, v.67, p.3-15, 2007.

MATIELLO, J. B., SANTINATO, R., GARCIA, A. W. R., ALMEIDA, S. R., FERNANDES, D. R. **Cultura do café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: MAPA, 2002, 387p.

MAYNE, W. W. **Annual report of the coffee scientific officer**. [S.l.]: Mysore Coffee Experimental Station, 1936. 21 p. (Bulletin 14).

MCGREGOR, C.E.; LAMBERT, C.A.; GREYLING, M.M.; LOUW, J.H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, v.113, p.135-144, 2000.

MENDES, A. N. G.; CARVALHO, G. R.; BOTELHO, C. E.; FAZUOLI, L. C.; SILVAROLLA, M. B. História das primeiras cultivares de café planadas no Brasil. In: CARVALHO, C. H. S. (Orgs.). **Cultivares de café: Origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008, v.1, p 57-64.

MILLACH, S. C. K. **Marcadores de DNA**. Aplicações no melhoramento de plantas. 1998. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio05/marcadoresdna.pdf>>. Acesso: 04 abril 2013.

MILLACH, Sandra. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste**

Brasileiro. (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/marcadormolecular.pdf>>. Acessado 08 abril 2013.

MOISAN-THIERY, M.; MARHADOUR, S.; KERLAN, M. C.; DESSENNE, N.; PERRAMANT, M.; GOKELALRE, T.; LE HINGRAT, Y. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). **Potato Research**, v.48, p.191-200, 2005.

MUZZALUPO, I.; STEFANIZZI, F.; PERRI, E. Evaluation of olives cultivated in Southern Italy by SSR Markers. **HortScience**. v.44, p.582-588, 2009.

NARVÁEZ, C. H.; CASTRO, M. H. P.; VALENZUELA, J. B.; HINRICHSEN, P. R. Patrones genéticos de los cultivares de vides de vinificación más comúnmente usados en Chile basados en marcadores de microsatélites. **Agricultura Técnica**, Chile, v.61, n.3, p.249-261, julho / setembro, 2001.

NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Evaluation of sensory attributes of coffee brews from robusta coffee roasted under different conditions. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 224, n. 2, p. 159-165, 2006.

NIZIO, D. A. de C. *et al.* Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular co-dominante ligado ao gene *Ty-1*. **Pesq. agropec. bras.** [online]. 2008, vol.43, n.12, pp. 1699-1705. ISSN 0100-204X.

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

NORERO, N.; MALLEVILLE, J.; HUARTE, M.; FEINGOLD, S. Cost efficient potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar identification by microsatellite amplification. **Potato Research**, v.45, p.131-138, 2002.

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.

OLIVEIRA, A. C. B.; SAKIYAMA, N. S.; CAIXETA, E. T.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; RUFINO, R. J. N.; ZAMBOLIM, L. Partial map of *Coffea arabica* L. and recovery of the recurrent parent in backcross progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 7:196-203, 2007.

PADILHA, L.; GUIMARÃES, C. T.; VIEIRA, M. G. G. C.; CRESTE, I. R. P.; PARENTONI, S. N.; PACHECO, C. A. P.; SANTOS, M. X.; GAMA, E. E. G.; PAIVA, E. Microssatélites fluorescentes na diferenciação de linhagens de milho. In: XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo. **Anais....**Florianópolis – SC, 2002, p-1-5.

PEREIRA, A. A. **Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor.** 1995. 66 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

PEREIRA, A. A.; CARVALHO, G. R.; MOURA, W. M.; BOTELHO, E. C.; REZENDE, J. C.; OLIVEIRA, A. C. B. DE; SILVA, F. L. Cultivares: Origem e suas Características. In: Reis, P. R.; Cunha, R. L. (Eds.). **Café arábica do plantio à colheita.** Lavras: EPAMIG, p. 167-221, 2010.

PRAKASH, N. S.; COMBES, M.; DUSSERT, S.; NAVEEN, S.; PHILIPPE LASHERMES, L. Analysis of genetic diversity in Indian robusta coffee genepool (*Coffea canephora*) in comparison with a representative core collection using SSRs and AFLPs. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 52:333–343, 2005.

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

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.2, p.185-193, 2002.

PRITESH, P.; VISHAL, P.; OZA, V.; CHAUHAN, A. D.; PATEL, K. B.; KATHIRIA, S. R. B. Genetic Diversity and DNA Fingerprint Study of Tomato Discerned by SSR Markers. **Int. J. Biotechnol, Biochem.** 6(5):657-666, 2010.

RAJPUT, S. G.; WABLE, K. J.; SHARMA, K. M.; KUBDE, P. D.; MULAY, S. A. Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in Tomato. **Afr. J. Biotechnol** 5(2):108-112, 2006.

REID, A.; KERR, E. M. A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v.5, p.7-13, 2007.

REIS, P. R.; CUNHA, R. L. da. (Eds.) **Café arábica do plantio à colheita.** Lavras, MG. EPAMIG. v.1, 2010. 896p.

REKIK, I.; SALIMONTI, A.; GRATI KAMOUN, N.; MUZZALUPO, I.; PERRI, E.; REBAI, A. Characterisation and identification of Tunisian olive tree varieties by microsatellite markers. **HortScience**, v.43, p.1371-1376, 2008.

RIBEIRO, C. A. G.; TANURE, J. P. M.; MACIEL, T. E. F.; BARROS, E. G. de. Molecular characterization of soybean cultivars by microsatellite markers with universal tail sequence. **Pesq. agropec. bras.**, v.48, p.270-279, 2013.

RIJO, L. Observações cariológicas no cafeeiro Híbrido do Timor. **Portugaliae Acta Biológica**, v. 13, p. 157-168, 1974.

SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; MOURA, W. M., ZAMBOLIM, L. Melhoria do café arábica. In: Borém, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. p. 203-223, 2005.

SAMPAIO, M. J. A. Propriedade intelectual de plantas: a nova Lei de Proteção de Cultivares e suas decorrências imediatas. In: BORÉM, A. *et al.* (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p. 145-158.

SERA, T. Coffee genetic breeding at Iapar. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.1, n.2, p.179-200. 2001.

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 Sci.** 53:1237–1247 (2013).

SILVA, L. C.; SAKIYAMA, N. S.; OLIVEIRA, A. C. B. de. Avaliação da variabilidade genética entre acessos de café e identificação de linhagens melhoradas. Trabalho apresentado no Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (2. : 2001 : Vitória, ES). **Resumos**. Brasília, D.F.: Embrapa Café, 2001. 181p.:il. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/715/155585_Art037f.pdf?sequence=1>. Acessado 08 abril 2013.

SILVESTRINI, M.; MALUF, M. P.; SILVAROLLA, M. B.; GUERREIRO-FILHO, O.; MEDINA-FILHO, H. P.; VANINI, M. M. T.; OLIVEIRA, A. S.; GASPARIPEZZOPANE, C.; FAZUOLI, L. C. Genetic diversity of a *Coffea* germplasm collection assessed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 55:901-910, 2008.

SMULDERS, M. J. M.; BREDEMEIJER, G.; RUS-KORTEKAAS W.; AREN P. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms

among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. **Theor. Appl. Genet.** 97:264-272, 1997.

SONDAHL, M. R.; LAURITIS, J. A. Coffee. In: Hammerschlag, F. A. and Litz, R. E. (eds.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge, UK. C.A.B. International. p.401-420, 1992.

STAUB, J. E.; GABERT, A. WEHNER, T. C. Plant variety protection: A consideration of genetic relationship. **Hort Science**, v.31, n.7, p. 1086-1091, dezembro de 1996.

TEIXEIRA, T. A.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, C. C. H. Caracterização de acessos de *Coffea* por marcadores RAPD. **Anais do III SIBAC**, 1999 Londrina, Brasil. pp. 177-180.

UDE, G.; PILLAY, M.; NWAKANMA, D.; TENKOUANO, A. Analysis of genetic diversity and sectional relationships in *Musa* using AFLP markers. **Theor Appl Genet**, n.104, p.1239–1245, 2002.

VÁRZEA, V. M. P., MARQUES, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. Coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E. M., VÁRZEA, V.M.P. (Eds). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, UFV, p.53-74, 2005.

VASCONCELOS NETO, M. O. *et al.* Lei de proteção de cultivares. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, Editora UFV, 1999. p. 769-798.

VIEIRA, E., S. N.; VON PINHO, E. V. DE R.; CARVALHO, M. G. G.; ESSELINK, D. G. Development of microsatellite for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 507-514, June 2010.

ZAMBOLIM, L., MACIEL-ZAMBOLIM, E., VALE, F. X. R., PEREIRA, A. A., SAKIYAMA, N. S., CAIXETA, E. T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects. In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E. M., VÁRZEA, V.M.P. (Eds). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, UFV, p.75-98, 2005.