



JEAN CARLOS ALEKCEVETCH

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA, POR
MEIO DE MARCADORES MOLECULARES, DE
UMA POPULAÇÃO DE *Coffea canephora* var.
Conilon**

LAVRAS – MG

2013

JEAN CARLOS ALEKCEVETCH

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA, POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES, DE UMA POPULAÇÃO DE *Coffea*
canephora var. **Conilon****

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Alan Carvalho Andrade

Coorientador

Dr. Dario Grattapaglia

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Alekcevetch, Jean Carlos.

Estudo da diversidade genética, por meio de marcadores moleculares de uma população de *Coffea canephora* var. Conilon / Jean Carlos Alekcevetch. – Lavras : UFLA, 2013.

92 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Alan Carvalho Andrade.

Bibliografia.

1. Café. 2. Variabilidade genética. 3. Marcadores moleculares fluorescentes. 4. Análise de paternidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

JEAN CARLOS ALEKCEVETCH

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA, POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES, DE UMA POPULAÇÃO DE *Coffea*
canephora var. *Conilon***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2013.

Dr. Gabriel Ferreira Bartholo

Dr. Antônio Fernando Guerra

Dr. Alan Carvalho Andrade
Orientador

LAVRAS – MG

2013

Aos meus alicerces, Pai, Mãe, Mana e Rafaela...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço ante tudo, à Deus, por me fazer cada vez mais vencedor.

À UFLA – Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, Coordenador, Luciano Vilela Paiva e todos os professores pelos ensinamentos e conhecimentos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela infraestrutura de trabalho.

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) pelo acesso aos materiais genéticos.

À CAPES, Consórcio Pesquisa Café e INCT Café pelo apoio financeiro.

Ao orientador Alan Carvalho Andrade, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Pierre Marraccini, pelos ensinamentos, “consultorias” em qPCR, e buscas nos Freezers e Ultra-freezers.

Ao Co-Orientador, Dario Grattapaglia, pelo apoio científico

Ao meu amigo e irmão de república Joáz, pelo acolhimento e amizade.

Às colegas Fernanda, Tatiana, Natalia, Bárbara, Érica e Rafaela pelo apoio, companhia e ajudas em laboratório.

À Dany, pelo treinamento em sequenciador e GeneMapper.

Aos meus pais, Tere e João e irmã, Ligia, que sempre me incentivaram e apoiaram para eu “correr atrás” do meu sucesso profissional e pessoal.

Finalmente, porém de forma alguma menos importante, à minha colega, amiga, companheira e namorada Rafaela, por estar sempre firme ao meu lado, mesmo nas horas difíceis, pela compreensão, amor e carinho.

Muito Obrigado!

RESUMO

O *Coffea canephora* é uma das duas espécies cultivadas comercialmente no mundo. A produção nacional é muito importante, para a safra de 2013 a produção é estimada em aproximadamente 26% da produção mundial. O *Coffea canephora* possui grande variabilidade genética devido sua alogamia. Por outro lado essa variabilidade genética é importante para os programas de melhoramento do cafeeiro, pois fornece uma fonte de novos genes. O estudo molecular da diversidade genética vem se demonstrando cada vez mais eficiente, necessário e refinado, uma vez que as técnicas moleculares estão evoluindo e os descritores morfológicos estão se tornando insuficientes para a descrição de um indivíduo. Os marcadores moleculares microssatélites ou SSR (“*Simple Sequence Repeats*”) são marcadores co-dominantes, utilizados com uma frequência cada vez maior para estudos de diversidade de populações. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética de genótipos do Banco Ativo de Germoplasma – BAG do Incaper, bem como uma fração de descendentes mantidos no campo da EMBRAPA Cerrados. Para ambos objetivos, marcadores SSR foram utilizados e a fragmentos do produto da PCR, analisados em sequenciador automático (ABI 3130xl). Com esses resultados foi possível observar ampla variabilidade genética entre os parentais e seus descendentes. Foi possível concluir com a análise de paternidade, que a planta “PAR60” é a mais recorrente na população, com 24,44% de frequência. Esses marcadores foram também utilizados num estudo de caso visando a análise de uma planta isolada de *C. canephora* suspeita de se reproduzir por autofecundação. Os resultados preliminares obtidos mostram que essa planta não é autógama mais se reproduz de maneira alógama.

Palavras chave: *Coffea canephora*. Variabilidade genética. Marcadores moleculares fluorescentes. Análise de paternidade.

ABSTRACT

The *Coffea canephora* is one of the two species commercially cultivated in the world. National production is very significant, as it is estimated for the harvest of 2013, a share of 26 % of the total Brazilian processed coffee. *C. canephora* has a large genetic variability of plants because they are allogamous. On the other hand this genetic variability is of importance for the genetic improvement programs of coffee, because it is the source of new genes. The molecular study of coffee genetic diversity is becoming increasingly efficient, necessary and refined, since the molecular techniques are evolving and the morphological descriptors are becoming inadequate for the description of an individual. The microsatellite molecular markers or SSR (Simple Sequence Repeats), are co-dominant markers, used with increasing frequency for studies of diverse populations. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of genotypes from the Active Germplasm Bank - BAG of Incaper as well as a fraction of offspring generated by such parents, which are maintained in the experimental field of Embrapa Cerrados. Another objective was the analysis of paternity in the population. For both objectives, SSR markers have been used and fragments of the PCR product, analyzed in automatic sequencer (ABI 3130xl). With the results, we observed that there is a large genetic variability among the parents, and its offspring. It was possible to conclude from paternity-analysis results, that the plant "PAR60" was the most recurrent in the population, with 24.44 % of the frequency. These markers were also used in a study aiming to analyze the case of an isolated plant of *C. canephora* suspected to reproduce by self-fertilization. Preliminary results show that this plant is not autogamous but reproduces so allogama.

Keywords: *Coffea canephora*. Genetic variability. Fluorescent molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Origem geográfica dos principais grupos genéticos do *Coffea canephora* 19
- Figura 2 Figura representativa do marcador Mg_360 (*forward* [F] *ereverse* [R]), *amplicon* e respectivo *motif* (microsatelite, SSR) repetitivo (CA_n, indicado em vermelho)..... 27
- Figura 3 Representação gráfica do número de indivíduos analisados para cada *primer* (Total = 314)..... 41
- Figura 4 Representação gráfica contendo valores de A) PIC –Polymorphic Information Conten; B) Número de Alelos amplificados (também chamado de fator K); e C) Número de alelos encontrados gerados a partir da frequência alélica encontrada pela análise de fragmentos por meio de marcadores moleculares microsatélites ... 45
- Figura 5 Dendrograma por agrupamento UPGMA, obtido a partir da matriz de similaridade genética dos parentais, construída com base na distância genética de Nei (1978), calculada a partir dos dados de genotipagem de 11 marcadores moleculares microsatélites..... 50
- Figura 6 Dendrograma UPGMA representando a similaridade genética entre os representantes dos diferentes grupos de diversidade de *C. canephora* e dos parentais (PAR) oriundos do BAG do INCAPER 52
- Figura 7 Clusterização Bayesiana dos indivíduos da população (pontos em Rosa), os parentais oriundos do INCAPER (pontos vermelhos), e os representantes dos grupos de diversidade de *C. canephora*

	(SG1, pontos verdes; SG2, pontos azuis e Guineano, pontos amarelos)	54
Figura 8	Representação da distância genética entre os 5 <i>clusters</i> identificados utilizando-se o algoritmo <i>Neighbor-Joining</i> (NJ), obtido por meio das análises com o <i>software Structure 2.3.4</i>	55
Figura 9	Planta com suspeita de auto-compatibilidade encontrada no município de São Gabriel da Palha – ES, na propriedade do Eng. Agrônomo João Luis Perinni (foto).....	63
Figura 10	Eletroferograma da análise de fragmentos obtido com a técnica de eletroforese em sequenciador automático a partir do produto de PCR amplificado com os <i>primers</i> Mg_360, Mg_477 e Mg_779 de um clone (estaca 8) e um descendente (semente 2)	67
Figura 11	Dendrograma representando os 13 indivíduos descendentes da planta, com suspeita de autofecundação, obtido a partir dos dados de genotipagem clusterizados por UPGMA apresentando a similaridade genética entre os indivíduos.....	69

ANEXOS

Figura 1	Eletroferograma obtido pela análise de fragmentos realizado em sequenciador automático ABI 3130xl, representando as 8 plantas (estaca 1 acima ate estaca 8 abaixo) obtidas por estaquia e amplificadas com o <i>primer</i> Mg_360	84
Figura 2	Perfil eletroforético da estaca 8 e todas as plantas oriundas de sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o <i>primer</i> MG_360.....	85
Figura 3	Perfil eletroforético da estaca 8 e de todas as plantas oriundo de sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o <i>primer</i> MG_368.....	86

Figura 4	Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o <i>primer</i> MG_445	87
Figura 5	Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o <i>primer</i> MG_461	88
Figura 6	Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o <i>primer</i> MG_477	89
Figura 7	Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o <i>primer</i> MG_501	90
Figura 8	Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o <i>primer</i> MG_753	91
Figura 9	Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o <i>primer</i> MG_779	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alguns bancos de dados contendo informações e ou sequências de marcadores moleculares do tipo SSR	28
Tabela 2	Relação de representantes do diferentes grupos com respectivos grupos a quais estão classificados	33
Tabela 3	Detalhes dos <i>primers</i> SSR utilizados. Os nomes dos <i>primers</i> são indicados junto com as sequência, os <i>motifs</i> repetitivos (<i>Motif Rep</i>), o número de repetições dos <i>motifs</i> (N° de rep), o fluoróforo (Flr)utilizado na marcação, o número de acesso da sequência no banco de dados <i>GenBank/EMBL</i> que permitiu de desenhar o par de <i>primer</i> SSR, e as referências detalhando a origem das sequências (Orig. Seq) e a origem dos <i>primers</i> (Orig. <i>Primer</i>)	35
Tabela 4	Composição dos sistemas multiplex de <i>primers</i> , <i>amplicon</i> obtido (pb) e cor do fluorocromo utilizado em cada marcador.....	37
Tabela 5	Tabela comparativa dos tamanhos do <i>amplicons</i> (pb) obtidos pelo presente trabalho	42
Tabela 6	Tabela representativa da heterozigosidade observada e esperada e equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	43
Tabela 7	Estimativas de parâmetros forenses, poder de exclusão com um pai conhecido (PE-1), pais desconhecidos (PE-2) e probabilidade de identidade (PI)	48
Tabela 8	Prováveis parentais dos indivíduos da população de <i>C. canephora</i> var <i>Conilon</i> , identificados por meio de análises com o <i>software Cervus</i>	57
Tabela 9	Frequência da recorrência de cada pai na população	61

Tabela 10 Resultado da genotipagem dos oito clones obtidos por estacas e cinco descendentes obtidos pela germinação de sementes originadas a partir da planta com suspeita de autofecundação..... 65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	<i>Coffea canephora</i>	18
2.1.1	Variedade Conilon.....	20
2.2	Melhoramento genético do cafeeiro.....	21
2.3	Diversidade genética do <i>C. canephora</i>	22
2.4	Marcadores genéticos e o estudo da diversidade genética.....	24
2.5	Marcadores moleculares SSR fluorescentes.....	27
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivos gerais.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Material vegetal.....	32
4.2	Obtenção de DNA genômico foliar.....	32
4.3	Marcadores moleculares fluorescentes.....	33
4.4	Condições de PCR.....	37
4.5	Análise de fragmentos.....	38
4.6	Análise dos eletroferogramas.....	39
4.7	Distância genética.....	39
4.8	Análise de estrutura populacional.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Utilização dos <i>primers</i> marcados.....	41
5.2	Frequência alélica da população e parentais.....	42
5.3	Análise da distância gênica dos pais.....	49
5.4	Análise de paternidade.....	55
5.5	Genotipagem de uma planta com suspeita de autofecundação.....	62
6	CONCLUSÕES	70
7	PERSPECTIVAS	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* é composto por mais de 120 espécies catalogadas. Porém dentre essas, somente duas são exploradas comercialmente de forma significativa, o *Coffea arabica* e o *Coffea canephora* (DAVIS, 2010; DAVIS et al., 2006). O *C. arabica* é uma planta alotetraplóide ($2n = 4x = 44$) e autógama, possui uma taxa de autofecundação de aproximadamente 90% (CHARRIER; BERTHAUD, 1985; FERRÃO et al., 2007; KOCHKO et al., 2010; MONTAGNON; CUBRY; LEROY, 2012). O *C. canephora*, popularmente conhecido como Robusta ou Conilon no Brasil, é uma espécie diplóide ($2n=2x=22$ cromossomos) alógama e autoincompatível geneticamente que representa uma fatia do mercado nacional em torno de 30% (AGUIAR et al., 2005; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013).

A produção nacional do *C. canephora* na safra 2012 representou 24,38% do total produzido, sendo a maior parte deste produzido no estado do Espírito Santo (CONAB, 2013). O interesse comercial no Robusta, é na maior parte das indústrias de café solúveis e para constituição de *blends* com o *C. arabica*, devido seu sabor mais acentuado, formando o equilíbrio de aroma e sabor desejado pelos baristas, ou ainda na indústria farmacêutica e alimentícia por maiores níveis de sólidos solúveis e cafeína (em torno de 2%) (IVOGLIO et al., 2008; KOCHKO et al., 2010; LEROY et al., 2011).

O considerável volume de café Robusta produzido é um forte incentivo para a criação, desenvolvimento e condução de programas de melhoramento genético do *C. canephora*. Para conseguir obter algum avanço em um programa de melhoramento genético, é necessário que haja variabilidade genética na espécie a ser trabalhada. Característica esta, facilmente encontrada no *C. canephora* devido sua forma de reprodução, amplo centro de origem e a

presença da auto incompatibilidade genética do tipo gametofítica no loco S (FABER, 1910 citado por CONAGIN; MENDES, 1961).

Esta diversidade, por sua vez, é de suma importância e interesse no melhoramento do cafeeiro e tem contribuído intensamente para a sustentabilidade da cultura, incorporando, por meio de cruzamentos, ganhos genéticos para produtividade e outras características de interesse agrônomo, tal como elevação da qualidade e atender aos desafios recentes das mudanças climáticas, por exemplo, buscando novas plantas, mais tolerantes aos estresses tanto bióticos e também abióticos que podem ser incluídas nos programas de melhoramento genético cafeeiro.

A introdução de métodos biotecnológicos tem grande potencial para auxiliar os programas de melhoramento genético a obter rápidos avanços na geração de novas cultivares, principalmente em culturas perenes, como o cafeeiro, que possuem aspectos biológicos peculiares, tais como grande período de ciclo reprodutivo, a reprodução sexuada e a expressão de caracteres ao longo de várias idades, pois essas características dificultam a execução de técnicas clássicas de melhoramento. Pesquisas nessa área avançam rapidamente e suas aplicações com resultados práticos para o melhoramento genético já podem ser observados em algumas culturas (REZENDE et al., 2012).

A seleção genética com base em dados fenotípicos avaliados a campo constitui o fundamento do melhoramento genético convencional do cafeeiro, tanto para a definição dos cruzamentos a serem realizados visando à geração de novos genótipos, como na identificação dos indivíduos superiores a serem usados comercialmente. Uma forma de armazenar essa variabilidade natural é a formação de Bancos Ativos de Germoplasma (BAG). Os BAGs são de extrema importância para os programas de melhoramento genético, pois contêm o maior número possível de indivíduos geneticamente distintos, servindo de base genética para os programas de melhoramento. Desta forma, condutores dos

programas de melhoramento conseguem ter acesso as informações das mais diversas características, de cada indivíduo catalogado no BAG (BORÉM; MIRANDA, 2009). Como forma alternativa para elevar a eficiência nos processos de avaliações, Lande e Thompson (1990) descreveram a Seleção Auxiliada por Marcadores moleculares (SAM ou MAS em inglês “*Marker Assisted Selection*”), que consiste na utilização simultânea dos dados fenotípicos e dados moleculares em ligação muito próxima com alguns locos controladores de características quantitativas (QTLs: “*Quantitative Traits Loci*”) (REZENDE et al., 2012).

A grande vantagem da utilização da genética molecular pelo melhoramento genético aplicado é a utilização direta das informações das sequências de DNA (particularmente/especialmente dos polimorfismos dessas sequências entre indivíduos ou populações) na seleção, propiciando alta eficiência na mesma, rapidez na obtenção de ganhos genéticos e baixos custos (após identificação dos marcadores), quando comparados com a seleção baseada em fenotipagem. Os marcadores moleculares apresentam também muitas características interessantes e proveitosas no melhoramento genético, pois não interagem com o ambiente, são passíveis de aplicação em qualquer estágio de desenvolvimento e conseguem distinguir indivíduos heterozigotos (marcadores co-dominantes). Revelando-se assim um recurso muito eficiente não só na SAM, mas também na identificação de indivíduos, proteção de cultivares, análise de paternidade e de diversidade genética (BORÉM; MIRANDA, 2009; MORAIS; MELO, 2011; REZENDE et al., 2012).

No sentido de integrar ferramentas moleculares aos programas de melhoramento genético do cafeeiro, os objetivos deste trabalho foram por meio de marcadores moleculares microssatélites (chamado também de “SSR” para “*Simple Sequence Repeats*”),

- a) Estudar a diversidade genética de 48 indivíduos presente no BAG do INCAPER de uma população (descendência) de *C. canephora* var. Conilon (266 plantas) obtida por polinização aberta dos 48 parentais e, mantida nos campos experimentais da Embrapa Cerrados;
- b) Avaliar o potencial desses marcadores na identificação dos genitores dos indivíduos analisados na população;
- c) Utilizar esses marcadores num estudo de caso visando a análise uma planta isolada de *C. canephora* suspeita de se reproduzir por autofecundação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Coffea canephora*

O *C. canephora* foi descrito em 1895 por Louis Pierre e classificado pelo botânico Albrecht Froehner em 1897 durante uma revisão do gênero *Coffea*. É uma planta arbustiva e perene, que em condições ideais de altitude e regime hídrico, pode chegar a 8 metros de altura. Possuem caules lenhosos e múltiplos, folhas lanceoladas, grandes com nervuras salientes e bordas onduladas (FERRÃO et al., 2007).

É comum a comunidade cafeeira referir-se ao *C. canephora* como Café Robusta, isso devido a robustez da espécie tratando-se de tolerância ou até mesmo, para alguns clones, resistência a bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) (GUERREIRO FILHO, 2006), ferrugem (*Hemileia vastatrix*), déficit hídrico (MARRACCINI et al., 2012; PINHEIRO et al., 2005) e nematóides (*Meloidogyne exigua*) (BERTRAND; ANTHONY; LASHERMES, 2001).

O *C. canephora* é originário das regiões de baixas altitudes e altas temperaturas e umidade do continente africano, compreendendo uma faixa que estende-se do Guiné Costa do Marfim (grupo Guineano) e a República Democrática do Congo, República Centro Africano, e Camarões (grupo congolês) (MONTAGNON; LEROY; ESKEES, 1998).

Com base em marcadores enzimáticos Berthaud (1984) sugeriu que a espécie *C. canephora* fosse dividida em dois grupos:

- a) O grupo Congolês que possui maior concentração na África Central, na bacia do rio Congo e também em pais ao redor tais como Camarões, Uganda e angola, por exemplo;

- b) O grupo Guineano restringe-se originalmente a costa oeste da África, entre a Guiné e a Costa do Marfim.

Montagnon, Leroy e Yapo (1992) subdividiram o grupo congolense em SG1 e SG2, posteriormente, em 1999, também com base em estudos de isoenzimas, foram identificados mais dois subgrupos (B e C), formando assim 4 grupos menores (Figura 1).

O subgrupo SG1 compreende os indivíduos da região do Gabão e do Congo, enquanto que o sub-grupo SG2 representa os oriundos da região da República Democrática do Congo, República Centro-Africana (sub-grupo B) e Camarões (sub-grupo C).

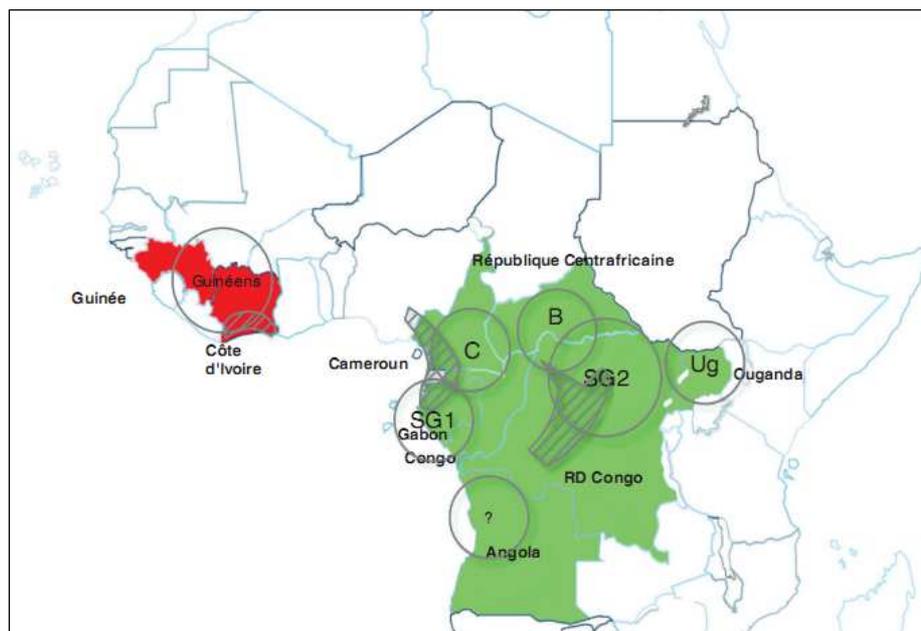


Figura 1 Origem geográfica dos principais grupos genéticos do *Coffea canephora*

Fonte: Montagnon, Cubry e Leroy (2012)

A introdução de mais de uma variedade nesse tipo de lavoura é essencial, pois o *Coffea canephora*, assim como outras espécies da família *Rubiaceae* (exceção o *C. arabica* e o *C. heterocalyx*), apresenta autoincompatibilidade do tipo gametofítica (DEVREUX et al., 1959; LASHERMES et al., 1996), multialélica para o loco S (S_1 , S_2 e S_3) e monogênica. Uma planta é considerada como autoincompatível, quando a mesma é fértil, porém, de alguma maneira, rejeita o próprio pólen, evitando assim consanguinidade (ASQUINI et al., 2011; FABER, 1910 citado por CONAGIN; MENDES, 1961; NETTANCOURT, 1997). No tipo de incompatibilidade presente no *C. canephora*, o processo ocorre pela dificuldade ou retardo do crescimento do tubo polínico no pistilo quando os alelos do locus S do pólen são idênticos aos alelos do pistilo, formando um dímero de glicoproteínas (ASQUINI et al., 2011; FERRÃO et al., 2007).

2.1.1 Variedade Conilon

Ao nível molecular foi mostrado que a variedade atualmente conhecida no Brasil como o Café Conilon, é próxima geneticamente das plantas do grupo SG1 encontradas na bacia do rio Kouilou. Acredita-se que, quando essas plantas foram importadas da África para o Brasil, aconteceram algumas distorções ortográficas (“u” virou “n”) do nome original “Kouillou” que passou a ser conhecida popularmente por Conilon (FERRÃO et al., 2007).

Essa espécie despertou interesse dos cafeicultores por apresentar resistência à ferrugem asiática causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* (CAPUCHO et al., 2011), que na ilha de Java e algumas regiões da Ásia foi grande problema nos cafezais de *C. arábica* no início do século XIX (MONTAGNON; LEROY; ESKES, 1998). Em alguns casos, além da resistência à ferrugem, o Conilon também apresenta boa tolerância ao estresse

hídrico (FERRÃO; FONSECA; FERRÃO, 2000; MARRACCINI et al., 2012). O Instituto Capixaba de Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) identificou várias plantas, de *C. canephora* var. Conilon tolerantes (como os clones 14, 73 e 120) e sensíveis (como o clone 22) ao déficit hídrico (FERRÃO et al., 1999). Essas plantas foram analisadas ao nível morfológico e fisiológico (DAMATTA et al., 2003; PINHEIRO et al., 2004, 2005; PRAXEDES et al., 2005) e mais recentemente ao nível da expressão de genes (“transcritômico”) (MARRACCINI et al., 2012) o que permitiu de identificar vários genes candidatos para a tolerância a seca. Ao nível agrônomo, plantas “elites” de *C. canephora* var. Conilon já entram na composição das variedades clonais que o INCAPER distribuída na forma de estacas para os cafeicultores do estado do Espírito Santo que é o maior produtor nacional de *C. canephora* Conilon (FERRÃO et al., 1999).

2.2 Melhoramento genético do cafeeiro

O melhoramento genético baseia-se na seleção de indivíduos diferenciados, que possuem características de interesse agrônomo ou comercial. Inicialmente essas seleções eram realizadas sem um conhecimento científico de genética ou metabólitos envolvidos com as características, consistindo basicamente em observações e seleção de indivíduos ao longo dos anos e das safras, para as características agrônomicas de interesse tais como vigor das plantas, a florada, a produtividade, as respostas aos estresses bióticos (susceptibilidade/resistência à ferrugem) e abióticos (susceptibilidade/tolerância a seca), por exemplo. Após as descobertas de Mendel, o conhecimento científico passou a ser utilizado na condução de experimento de melhoramento genético, propiciando os melhoristas obterem plantas diferenciadas, de forma orientada (BORÉM; MILACK, 1999).

Um dos pré-requisitos para a condução de um programa de melhoramento genético é a existência e o conhecimento da diversidade genética da espécie, pois com base nestas, são realizados os planejamentos e definidas as estratégias de trabalho (BERED; NETO; CARVALHO, 1997; FERRÃO; FONSECA; FERRÃO, 2000; FONSECA et al., 2001).

Os processos de seleções e cruzamentos propiciam consideráveis ganhos em adaptabilidade ao clima, regimes hídricos e a pragas, bem como aumento na qualidade e volume de produção das culturas. A exemplo disto são as plantas geradas a partir do cruzamento do híbrido de Timor (um híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora*) objetivando tolerância à ferrugem asiática causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Miranda, Perecin e Pereira (2005) demonstraram que a progênie (F5) H419-3-1-1-14 obtida pelo cruzamento entre Catuaí amarelo e Híbrido de Timor apresentou maior produção em relação à variedade Catuaí, ambos sob ataque do fungo. A cultivar Icatu foi obtida a partir da duplicação cromossômica da IAC 37 e posterior cruzamento com a cultivar Bourbon vermelho, sendo também sendo assim um exemplo de cultivar obtida artificialmente para resistência à ferrugem asiática (FAZUOLI et al., 2007). E a utilização da cultivar Apoatã como porta enxerto para resistência à nematoides (DIAS et al., 2011).

2.3 Diversidade genética do *C. canephora*

OC. canephora possui floração gregária, comum em espécies autoincompatíveis. Este tipo de floração compreende um relativo sincronismo da floração dos indivíduos de determinada região. No caso específico do café, a florada ocorre geralmente de 6 até 10 dias após as chuvas (como pelo menos 10mm de água) ou do retorno de irrigação que acontece após um período de estiagem (FERRÃO et al., 2007).

A grande heterogeneidade genética e fenotípica das plantas de *C. canephora* é de valor inestimável para os programas de melhoramento genético, pois ela serve como fonte de genes que podem ser usadas para criar novos clones. Entretanto, ao nível dos cafeicultores, a heterogeneidade fenotípica da lavoura é totalmente indesejada, pois os tratos culturais como um todo, tornam-se dificultados devido às variações entre vigor, porte, arquitetura, maturação, além da possibilidade de grandes diferenças de produtividade entre uma planta e outra. Estas características são comumente encontradas em cafezais obtidas a partir de sementes (IVOGLO et al., 2008).

Para diminuir a diferença fenotípica entre as plantas de uma lavoura gerada a partir de sementes e suas conseqüentes desuniformidades, é muito comum a formação de lavouras com variedades clonais propagadas por estacas a partir de clones “elites” (MELO; SOUSA, 2011), assim todos os indivíduos são geneticamente idênticos e por conseqüência, apresentam o mesmo fenótipo o que permite organizar melhor as lavouras, por exemplo, com planto em linha de clones (o que facilita a colheita). É válido lembrar que no caso do *C. canephora*, essas lavouras devem ser composta por várias cultivares compatíveis geneticamente para a lavoura produzir.

A utilização de cultivares clonais e a necessidade do plantio de diferentes cultivares geneticamente compatíveis reforça a necessidade dos estudos genéticos do *C. canephora*. Os testes realizados para identificação de variedades compatíveis é realizada até então somente em campo, pela polinização artificial e observação da produção.

Não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando ou quantificando geneticamente a compatibilidade genética entre variedades de Conilon com o intuito de indicar os indivíduos ou variedades mais compatíveis.

Com estudos baseados em DNA é possível a identificação dos indivíduos mais recorrentes na descendência, independente do motivo para tal

(maior produção de pólen, taxa de fecundação mais elevada, maior compatibilidade genética, entre outros fatores) e assim estimar qual ou quais plantas ou variedades são mais indicadas para serem utilizadas em uma lavoura clonal em função da frequência observada dos genótipos paternos e maternos. A análise de paternidade realizada neste trabalho é um teste genético por meio de marcadores moleculares SSR capaz de facilmente gerar este tipo de informação a partir do cruzamento de dados obtidos em um trabalho de genotipagem dos descendentes e ascendentes.

2.4 Marcadores genéticos e o estudo da diversidade genética

Desde os tempos de Mendel, até meados dos anos 60 os marcadores fenotípicos eram utilizados nas seleções genômicas dos programas de melhoramento genético e na construção de mapas de ligação (BERED; NETO; CARVALHO, 1997; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

No início da década de 80, foram introduzidos os marcadores moleculares nos estudos genéticos como uma nova e poderosa ferramenta para complementar as avaliações morfológicas. Ferreira e Grattapaglia (1998) evidenciam que além do fato dos marcadores morfológicos serem basicamente restritos às espécies tidas como modelos de estudos de genética (milho, tomate e ervilha), há naturalmente nas populações segregantes, um pequeno número de marcadores morfológicos distintos associados às características de importância econômica. Tornando-se assim um dos fatores limitantes para seu emprego em programas de melhoramento.

Lande e Thompson (1990) sugeriram a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), para auxiliar o melhoramento genético. A SAM consiste na utilização marcadores moleculares ligados geneticamente próximos a alguns locos controladores de QTL's (*Quantitative Traits Loci*) previamente

identificados e validados, para reforçar ou prever características fenotípicas e também para estudo de diversidade (RESENDE et al., 2008).

Os marcadores utilizados para detectar o polimorfismo em nível de DNA foram:

- a) Os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTSTEIN et al., 1980; KY et al., 2000; PAILLARD; LASHERMES; PÉTIARD, 1996) que foram os primeiros marcadores utilizados para construção de mapas de ligação. Esses marcadores baseiam-se em hibridização e tem baixo rendimento em função da grande quantidade de gDNA necessária;
- b) Os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (ANTHONY et al., 2001; OROZCO-CASTILLO et al., 1994) que foram os primeiros marcadores baseados em amplificações via PCR. Mesmo com baixa reprodutibilidade, eles são utilizados ainda hoje em estudos de diversidade genética;
- c) Os AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (KY et al., 2000; STEIGER et al., 2002) demandam bastante tempo e mão de obra, e foram bastante empregado em estudos genéticos em geral do café.

Mais recentemente, os marcadores SSRs (*Single Sequence Repeats*) também conhecidos como microssatélites passaram a ser utilizados, sendo seus principais usos o de estudo de diversidade genética (CUBRY et al., 2008; GELETA et al., 2012; MISSIO et al., 2009); SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (COMBES et al., 2000; CUBRY et al., 2008, 2012; GELETA et al., 2012) também permitem estudos de diversidade genética, bem como estudos individualizados em cada forma alélica de *Coffea arabica* e COS (*Conserved*

Ortholog Set) (PONCET et al., 2006; PRAKASH et al., 2005; SILVESTRINI et al., 2008), em estudos comparativos de genes entre diferentes espécies relacionadas.

O desenvolvimento de marcadores moleculares a partir do sequenciamento em larga-escala de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) (VIEIRA et al., 2006) (o primeiro passo para a genômica do cafeeiro) foi essencial para (i) avaliar a diversidade genética dentro das duas principais espécies cultivadas *C. canephora* e *C. arabica* (MISHRA et al., 2011; VIDAL et al., 2010; VIEIRA et al., 2010) (ii) analisar a diversidade de espécies selvagens e as relações filogenéticas dentro do gênero (ANTHONY et al., 2001); (iii) detectar introgressões e rearranjos estruturais (PRAKASH et al., 2005); (iv) identificar QTLs (PINTO et al., 2007), e (vi) caracterizar os principais genes de interesse (ALVARENGA, 2011; ALVARENGA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011).

Os marcadores moleculares também foram utilizados para construir mapas genéticos de *C. canephora* (LEROY et al., 2011) e identificar QTLs (PRIYONO et al., 2010; PRIYONO; SUMIRAT, 2012). Um mapa genético é essencial para a montagem do genoma e para localização de genes alvo de interesse. Um mapa altamente saturado de *C. canephora* já está disponível e vai ser útil para a integração de mapas genéticos e físicos e montagem da sequência do genoma completo.

No café, os marcadores moleculares têm sido utilizados principalmente para avaliar a diversidade genética da espécie, construir mapas genéticos e identificar locos quantitativos (QTLs) ligados às características de interesse comercial ou agronômica.

2.5 Marcadores moleculares SSR fluorescentes

Marcadores moleculares do tipo microssatélite (SSR) (Figura 2) apresentam boas características como multi-alelicidade e co-dominância que propiciam ampla cobertura do genoma (AGGARWA et al., 2007). Esses marcadores consistem em um par de pequenas sequências nucleotídicas (em torno de 20 pares de bases) sintetizadas artificialmente e que são complementares ao genoma do indivíduo a ser analisado. Esses dois pequenos fragmentos são chamados de *primers* e flanqueiam uma região específica do genoma contendo pequenas repetições de alguns pares de bases (*motif* repetitivo) (Figura 2). Essas repetições devem ser presentes em todos os indivíduos da espécie estudada e podem ser de dois (dinucleotídicos) até seis pares de bases (hexanucleotídicos).

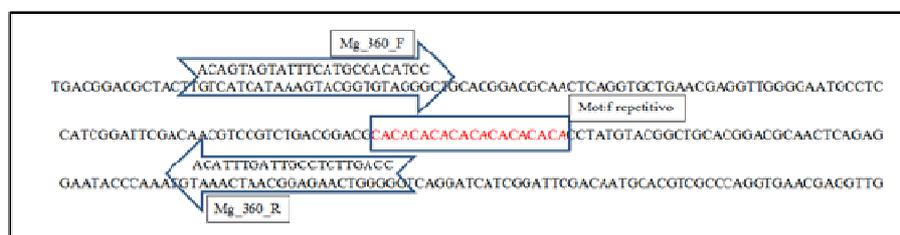


Figura 2 Figura representativa do marcador Mg_360 (*forward* [F] e *reverse* [R]), *amplicon* e respectivo *motif* (microssatélite, SSR) repetitivo (CA_n, indicado em vermelho)

Quando utilizados esses marcadores e submetidos à PCR, são sintetizadas milhares de cópias *in vitro* dessa região delimitada por tais, sendo possível visualizá-las em gel de agarose, acrilamida ou em sequenciador automático. Quando há variação na quantidade de vezes que tal *motif* se repete, é

possível visualizar dois fragmentos. São justamente essas variações das repetições dos *motifs* que geram as informações genéticas obtidas pelos microssatélites, seja ela variação alélica (homozigose ou heterozigose) e variação gênica entre indivíduos (CARPENTIERI-PÍPOLO; GARCIA; RIVALDI, 2006).

Centenas de marcadores SSRs foram obtidos a partir de bibliotecas de microssatélites, sequenciamento de clones genômicos de café em cromossomo artificial de bactéria (BACs), ou bibliotecas de EST (Etiquetas de Sequências Expressas) a partir de cDNA de *C. arabica* (BARUAH et al., 2003; MISSIO et al., 2011) e *C. canephora* (DUFOR et al., 2001; HENDRE et al., 2008; LEROY et al., 2005; PONCET et al., 2007). *Primers* derivados a partir dessas sequências geralmente apresentam ampla transferabilidade no cruzamento entre espécies (PONCET et al., 2004). Bancos de dados contendo informações e sequências de marcadores microssatélites, estão disponíveis conforme a tabela 1.

Tabela 1 Alguns bancos de dados contendo informações e ou sequências de marcadores moleculares do tipo SSR

Nome	Tipo de dados	Referência
Projeto Genoma Café CBP & D -Café- Brasil	EST, SSR, SNP, Elem. de transposição	Vieira et al. (2006)
Coffe DNA - Universidade de Trieste - Itália	EST, SSR retrotransposons	Rezende et al. (2012)
Mocca DBIRD - France	SSR, Seq. DNA, mapas genéticos e diversidade	Plechakova et al. (2009)

Estudos recentes realizado em *C. canephora* e *C. arabica* confirmaram que os microssatélites foram eficientes nos estudos de diversidade do cafeeiro

(LEFEBVRE-PAUTIGNY et al., 2010; MONTAGNON; CUBRY; LEROY, 2012).

Os marcadores moleculares SSR podem são marcadores genéticos co-dominantes, ou seja, utilizando-os é possível distinguir indivíduos homozigotos e heterozigotos após amplificação em PCR. A visualização convencional do produto da PCR é realizada em géis de agarose e/ou acrilamida corados com brometo de etídio e nitrato de prata respectivamente, levando em consideração a presença e ausência de fragmentos, nos géis visualizados na forma de banda ou ainda, embora pouco utilizada, a visualização por autorradiografia, quando realizada PCR com *primers* marcados com radioisótopos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os SSR também poder ser marcados com uma fluorescência na extremidade 5' (MISSIAGGIA; GRATTAPAGLIA, 2006) de modo que quando excitados por determinado comprimento de onda (variado de acordo com o fluoróforo utilizado), o mesmo emite uma luminescência em outro comprimento de onda. Essa absorção e reflexão da fluorescência permite a visualização e análise dos fragmentos obtidos em sequenciador automático.

A utilização de *primers* marcados vem se apresentando uma opção mais específica e refinada quando comparada com as metodologias de marcação pós-amplificação, pois essa técnica permite melhor discriminação entre indivíduos (é capaz de discriminar diferenças de até um par de base), é possível a utilização de vários marcadores na mesma reação (multiplex), desde que não haja sobreposição de tamanhos de fragmentos com as mesmas cores. Neilan, Wilton e Jacobs (1997) descrevem o desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares universais fluorescentes; López-Gartner et al. (2009) e Silvestrini et al. (2008), utilizando microssatélites fluorescentes separados em sequenciador automático para estudo de diversidade genética de diferentes espécies de cafeeiro, obtiveram bons resultados. Cubry et al. (2008), utilizando *primers*

universais M13, constatou dentro do gênero *Coffea* grande diversidade gênica entre populações selvagens e Faria et al. (2011) obteve alta resolução na diferenciação de indivíduos de *Eucalyptus* utilizando SSR tetra, penta e hexanucleotídico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

3.1.1 Avaliar e caracterizar geneticamente a diversidade genética de 314 (48 pais e 266 descendentes) indivíduos de *C. canephora* variedade Conilon, por meio de marcadores moleculares microssatélites.

3.1.2 Avaliar e caracterizar geneticamente, por meio de marcadores moleculares microssatélites, uma planta isolada de *C. canephora* suspeita de se reproduzir por autofecundação.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a relação genética da população estudada com os grupos de diversidade de *C. canephora*.

3.2.2 Avaliar a eficiência do uso de marcadores moleculares na identificação de progenitores em uma população de *C. canephora*.

3.2.3 Avaliar geneticamente a possibilidade da existência de uma planta de *C. canephora* autofecundante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram coletadas folhas frescas da terceira axila foliar de 48 parentais (diretamente no banco ativo de germoplasma do INCAPER), bem como de 266 pertencentes a uma população (\pm 3500 indivíduos) de *C. canephora* var. Conilon, mantida na Embrapa Cerrados e obtidas a partir de um *pool* de sementes geradas a partir da polinização aberta entre tais parentais.

As amostras foram imediatamente envoltas em embalagens de papel alumínio devidamente identificadas e acondicionadas em gelo. Em laboratório, as amostras foram armazenadas em ultra-freezer -80°C (parentais) ou em freezer -20°C (população), até a extração de DNA.

4.2 Obtenção de DNA genômico foliar

Uma pequena quantidade de material vegetal foi pulverizada em nitrogênio líquido e uma alíquota desse material (200mg), acondicionada em micro tubos. A extração de DNA seguiu o protocolo de extração de Doyle e Doyle (1990) com modificações:

- a) Tampão: CTAB 2%, NaCl 2M; Tris-HCl 100mM (pH8)EDTA 25mM (pH8);
- b) Volume inicial de tampão CTAB: 750 μ L (pré-aquecido a 65°C) + 3 μ L de 2- β -Mercapto-Etanol;
- c) Incubação: 65°C por 1 hora;
- d) Centrifugação 1:16002,2 x g;

- e) Lavagem do *pellet*: Etanol 70%;
- f) Centrifugação pós-lavagem: 16002,2 x g por 3 minutos;
- g) Secagem do *pellet*: 10 minutos a temperatura constante de 37°C;
- h) Ressuspensão do *pellet*: 30 µL de água ultra pura autoclavada.

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro do tipo NanoDrop (ND-1000), alíquota dos e estas alíquotas diluídas à 3 ng/µL.

Foram utilizadas também algumas alíquotas de DNA genômico de alguns representantes de diferentes grupos de *C. canephora* extraído e gentilmente cedido pelo Dr. Thierry Leroy (tabela 2).

Tabela 2 Relação de representantes do diferentes grupos com respectivos grupos a quais estão classificados

Indivíduo	Grupo	Indivíduo	Grupo
C1006	B	C3001	SG1
C4003	C	C3008	SG1
C4021	C	UE020	SG2
G1003	G	UN012	SG2
G7001	G	C5001	SG2
1637-1	SG1	C2014	SG2
1648-1	SG1	UW148	SG2

4.3 Marcadores moleculares fluorescentes

Os *primers* dinucleotídicos utilizados no presente estudo foram descritos e utilizados (em um conjunto maior de iniciadores) com sucesso em vários trabalhos (CUBRY et al., 2008, 2012; PONCET et al., 2004, 2007).

As origens das sequências dos *primers* e o número do acesso no EMBL estão indicados na tabela 3. Para o presente estudo, tais marcadores foram sintetizados com marcação fluorescente na extremidade 5' com diferentes fluoróforos (6-FAN, na cor azul [absorção λ_{\max} 494nm e emissão λ_{\max} 518nm] NED na cor amarela [absorção λ_{\max} 546nm e emissão λ_{\max} 576nm] e HEX na coloração verde [absorção λ_{\max} 535nm e emissão λ_{\max} 556nm]) de maneira que somente o *forward* ou *reverse* foram marcados e cada qual, somente com um fluorocromo, conforme Tabela 3.

Tabela 3 Detalhes dos *primers* SSR utilizados

Nome	Sequência	Motif Rep.	Nº de rep.	Flr.	EMBL Ac. Nº	Orig. Seq.	Orig. Primer
Me_13_F	AGAGGGATGTCAGCATAA	CA, CT	6, 8	6-FAN	AJ871892	Leroy et al. (2005)	Leroy et al. (2005)
Me_13_R	ATTTGTGTTTGGTAGATGTG						
Mg_257_F	GACCATTACATTTACACACAC	CA	9	6-FAN	AJ250257	Combes et al. (2000)	Poncet et al. (2004)
Mg_257_R	GCATTTTGTGACACTGTA						
Mg_360_R	ACATTTGATTGCCTCTTGACC	CA	10	6-FAN	AM231555	Dufour et al. (2001)	Poncet et al. (2007)
Mg_360_F	ACAGTAGTATTTTCATGCCACATCC						
Mg_501_F	CACCACCATCTAATGCACCT	TG	8	6-FAN	AM231576	Dufour et al. (2001)	Poncet et al. (2007)
Mg_501_R	CTGCACCAGCTAATTCAAGC						
Mg_753_F	GGAGACGCAGGTGGTAGAAG	CA	15	6-FAN	AJ308753	Rovelli et al. (2000)	Poncet et al. (2004)
Mg_753_R	TCGAGAAGTCTTGGGGTGT						
Mg_358_F	CATGCACTATTATGTTTGTGTTTT	CA	11	HEX	AM231554	Dufour et al. (2001)	Poncet et al. (2007)
Mg_358_R	TCTCGTCATATTTACAGGTAGGTT						
Mg_368_R	TCCTACCTACTTGCTGTGCT	TG	13	HEX	AM231558	Dufour et al. (2001)	Poncet et al. (2007)
Mg_368_F	CACATCTCCATCCATAACCATTT						
Mg_445_F	CCACAGCTTGAATGACCAGA	CA	10	HEX	AM231567	Dufour et al. (2001)	Poncet et al. (2007)
Mg_445_R	AATTGACCAAGTAATCACCGACT						
Mg_779_F	TCCCCATCTTTTCTTTCC	TG	17	HEX	AJ308779	Rovelli et al. (2000)	Poncet et al. (2004)
Mg_779_R	GGGAGTGTTTTGTGTTGCTT						
Mg_461_F	CGGCTGTGACTGATGTG	AC	9	NED	AM231570	Dufour et al. (2001)	Poncet et al. (2007)

“Tabela 3, conclusão”

Nome	Sequência	Motif Rep.	Nº de rep.	Flr.	EMBL Ac. Nº	Orig. Seq.	Orig. Primer
Mg_461_R	AATTGCTAAGGGTCGAGAA						
Mg_477_F	CGAGGGTTGGGAAAAGGT						
Mg_477_R	ACCACCTGATGTTCCATTTGT	AC	16	NED	AM231574	Dufour et al. (2001)	Poncet et al. (2007)

Nota: Os nomes dos *primers* são indicados junto com as sequência, os *motifs* repetitivos (*Motif Rep*), o número de repetições dos *motifs* (Nº de rep), o fluoróforo (Flr) utilizado na marcação, o número de acesso da sequência no banco de dados *GenBank/EMBL* que permitiu de desenhar o par de *primer* SSR, e as referências detalhando a origem das sequências (Orig. Seq) e a origem dos *primers* (Orig. *Primer*).

Considerando o tamanho dos fragmentos esperado (CUBRY et al., 2012), a cor emitida pelo fluorocromo de cada marcador e a temperatura de anelamento, foi possível a utilização dos mesmos em duas composições. As misturas utilizadas permitiram a análise dos fragmentos amplificados sem problemas de sobreposição de fragmentos e cores (Tabela 4).

Tabela 4 Composição dos sistemas multiplex de *primers*, *amplicon* obtido (pb) e cor do fluorocromo utilizado em cada marcador

MULTIPLEX 1	AMPLICON (pb)	COR FLUOR.
Mg_368	148-176	Verde
Mg_445	265-279	Verde
Mg_461	75-95	Amarelo
Mg_477	246-265	Amarelo
Mg_501	126-144	Azul
Mg_753	265-300	Azul

MULTIPLEX 2	AMPLICON (pb)	COR FLUOR.
Me_13	267-272	Azul
Mg_257	90-140	Azul
Mg_360	196-229	Azul
Mg_358	167-277	Verde
Mg_779	100-119	Verde

4.4 Condições de PCR

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (BIO-RAD-T100™ *Thermal Cycler*) comum volume final de 10 µl utilizando os reagentes

do QIAGEN® *Multiplex PCR Kit*, seguindo as especificações de amplificação indicada pelo fabricante, com modificações de 1/10 do volume recomendado, pois para tais análises necessita-se apenas uma alíquota deste volume para as análises posteriores em sequenciador automático ABI 3130xl.

As condições de termociclagem foram realizadas integralmente conforme recomendações do fabricante (15 min – 95°C, [30s – 94°C, 90s – 60°C, 90s – 72°C] x 45 ciclos, e 10min – 72°C de extensão final).

4.5 Análise de fragmentos

Em uma alíquota de 1µL de cada produto das PCRs, foram misturados a 1µL de fragmentos padrões marcados com ROX (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001) (que servem como parâmetro para o software *GeneMapper® V4.1 Applied Biosystem* realizar os cálculos dos tamanhos dos fragmentos amplificados) e 8 µL de Formamida HI-DI *Applied Biosystems*, com posterior desnaturação em termociclador (95°C por 5 minutos). Em seguida, as amostras foram eletro injetadas em um sequenciador automático modelo ABI3130 XL, (*Applied Biosystems*) utilizando-se capilares de sílica fundida de 36 cm de comprimento e 50µm de diâmetro preenchidos com polímero do tipo POP7 conforme recomendação do fabricante para análise de fragmentos. Os dados foram coletados, utilizando o filtro de leitura do tipo D, que é específico para tais marcadores.

A visualização dos fragmentos resultantes dos eletroferogramas foi realizada no programa *GeneMapper®V4.1 Applied Biosystem*, o qual gerou os dados genotípicos (eletroferogramas e tabela de genotipagem), sendo que os dados destas análises, foram arredondados pelo Microsoft Excel 2010®. As informações de distância gênica foram obtidas após análises no *GenAlex-*

Microsoft Excel (versão 6.5) (PEAKALL; SMOUSE, 2012), a partir dos dados arredondados.

4.6 Análise dos eletroferogramas

Os dados de frequência alélica, heterozigos e esperada e observada, conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), equilíbrio de Hardy-Weinberg, alelo nulo e probabilidades médias de exclusão de provável pai (com e sem um dos supostos pais conhecidos), foram obtidos no programa *Cervus* (KALINOWSKI et al., 2007).

4.7 Distância genética

A genotipagem obtida a partir da análise de fragmentos permite inferências sobre a distância genética entre os indivíduos. Foram realizadas diferentes comparações entre os parentais e os representantes de grupos de diversidade de *C. canephora*, previamente descritos. Todas as análises se deram a partir da submissão de dados de genotipagem à análise de distância genética do *GenAlex*, programa de análise genética no *Microsoft Excel* (versão 6.5) (PEAKALL; SMOUSE, 2012), o qual gera matrizes de dissimilaridade genética. Para a construção dos dendogramas, a similaridade foi calculada (1- valor da distância genética/100) e as matrizes de similaridade exportados para o programa *on-line* DendroUPGMA (GARCIA-VALLVE; PUIGBO, 2009) no qual gerou-se dendogramas do tipo UPGMA.

4.8 Análise de estrutura populacional

A partir dos dados de genotipagem de todos os indivíduos analisados (314 amostras = 48 parentais do BAG do INCAPER + 266 plantas da descendência), foi realizada uma análise de clusterização probabilística utilizando-se o método Bayesiano, realizada com o *Software Structure 2.3.4*. A análise foi realizada com o modelo “*admixture*”, onde as frequências alélicas foram correlacionadas, aplicando-se um período de “*burn-in*” de 1000 e 100 interações para a coleta de dados. As análises foram realizadas com k (tamanho da população) variando de 2 a 5, realizadas com 5 repetições independentes cada. O modelo para o critério de escolha do k mais provável foi o de Delta k (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Utilização dos *primers* marcados

Os *primers* utilizados apresentaram amplificação na maior parte dos indivíduos submetidos à análise (Figura 3), de modo geral, apresentaram boas amplificações e não houveram problemas com as marcações.

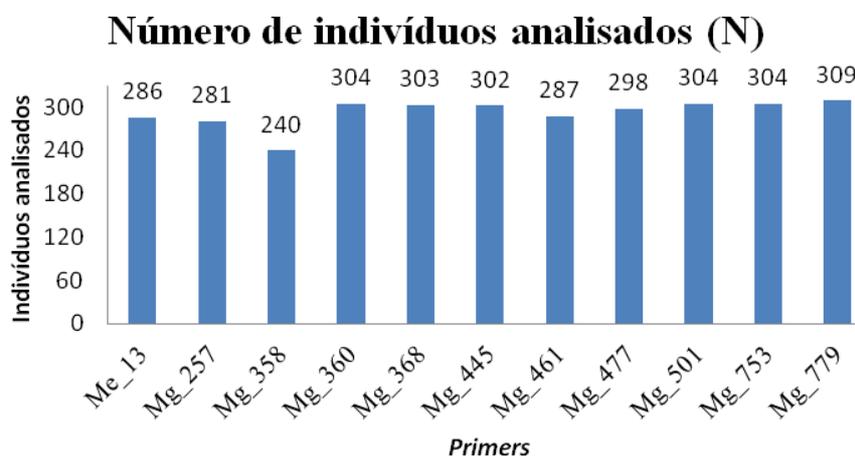


Figura 3 Representação gráfica do número de indivíduos analisados para cada *primer* (Total = 314)

Com base nos dados obtidos na análise de fragmento realizada a partir do produto de PCR com o DNA genômico dos indivíduos e *primers* em questão, foi possível comparar os tamanhos dos *amplicons* obtidos neste trabalho com os tamanhos esperados (disposto na tabela 5).

Tabela 5 Tabela comparativa dos tamanhos do *amplicons* (pb) obtidos por no presente trabalho

<i>Primer</i>	<i>Amplicon</i> esp. (pb)	<i>Amplicon</i> obs. (pb)
Me_13	267	267-272
Mg_257	103	99-140
Mg_358	248	167-277
Mg_360	213	196-229
Mg_368	160	148-176
Mg_445	274	265-279
Mg_461	82	75-95
Mg_477	268	246-265
Mg_501	147	126-144
Mg_753	294	265-300
Mg_779	116	100-119

Nota: Esp: informações não publicadas (Thierry Leroy, pesquisador do Cirrad. Comunicação feita em 22 abr. 2013). Obs; tamanhos observados neste trabalho.

Os tamanhos dos alelos obtidos, de forma geral, corresponderam ao tamanho esperado, com exceção aos *primers* Mg_477 e Mg_501, sendo que ambos apresentaram fragmentos com no mínimo três pares de bases menores que o esperado, evidenciando a possibilidade de alguma mutação, do tipo deleção, na região amplificada da população analisada, ou ainda diferença de sensibilidade da técnica utilizada pelo Dr. T. Leroy (gel de Acrilamida) e deste trabalho.

5.2 Freqüência alélica da população e parentais

A partir dos dados de genotipagem foi possível realizar as análises dos parâmetros genéticos e eficiência dos marcadores, utilizando-se o *Software Cervus* (tabela 6). Os dados apresentados na tabela 6 evidenciam que os

marcadores Me_13, Mg_358, Mg_360, Mg_753 e Mg_779 apresentaram valores da heterozigos e esperada (*Hexp*) calculada a partir da equação 8.4 (NEI, 1978) e assumindo o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* abaixo de 0,5, evidenciando indícios que os *loci* em questão, têm baixo potencial informativo de diversidade genética por apresentarem uma alta frequência de homozigose.

Tabela 6 Tabela representativa da heterozigosidade observada e esperada e equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Lócus	Hobs	Hexp	HW
Me_13	0, 017	0, 041	ND
Mg_257	0, 623	0, 682	***
Mg_358	0, 292	0, 353	NS
Mg_360	0, 454	0, 496	NS
Mg_368	0, 693	0, 691	NS
Mg_445	0, 175	0, 651	ND
Mg_461	0, 578	0, 606	***
Mg_477	0, 450	0, 559	***
Mg_501	0, 559	0, 540	*
Mg_753	0, 470	0, 491	***
Mg_779	0, 239	0, 233	NS

Cubry et al. (2008) evidenciaram que tanto o locus Me_13, quanto o Mg_257 apresentaram-se capazes de identificar polimorfismo, porém a população analisada estava em homozigose, portanto *Hobs* com valor zero. O presente trabalho apresentou resultado semelhante a tal, com valor próximo à zero (0, 017) para o *primer* Me_13, possivelmente devido ao elevado número de alelos nulos (0, 3565), enquanto que o Mg_257, diferentemente do trabalho apresentado pelo autor acima citado, apresentou *Hobs* elevado (0, 623). Nesse

parâmetro, quanto maior o valor “encontrado” mais polimórfica é a população analisada.

Ainda é possível observar que os indivíduos analisados e submetidos ao teste de *Hardy-Weinberg* apresentaram significância de 5% para o marcador Mg_501 e 0,1% nos marcadores Mg_257, Mg_461, Mg_477 e Mg_753 (Tabela 5). Faria et al. (2010) ao analisar uma população de *Eucalyptus* aponta como possíveis causas da significância deste teste a cosanguinidade entre espécies, presença de alelos nulos ou elevada taxa de homozigose na população.

Também com base nos dados obtidos pela genotipagem da população, é possível obter algumas outras informações a respeito dos marcadores utilizados tal como o Conteúdo Informativo de Polimorfismo (PIC), o número de alelos amplificados e os alelos nulos encontrados (respectivamente Figuras 4 - A, B e C).

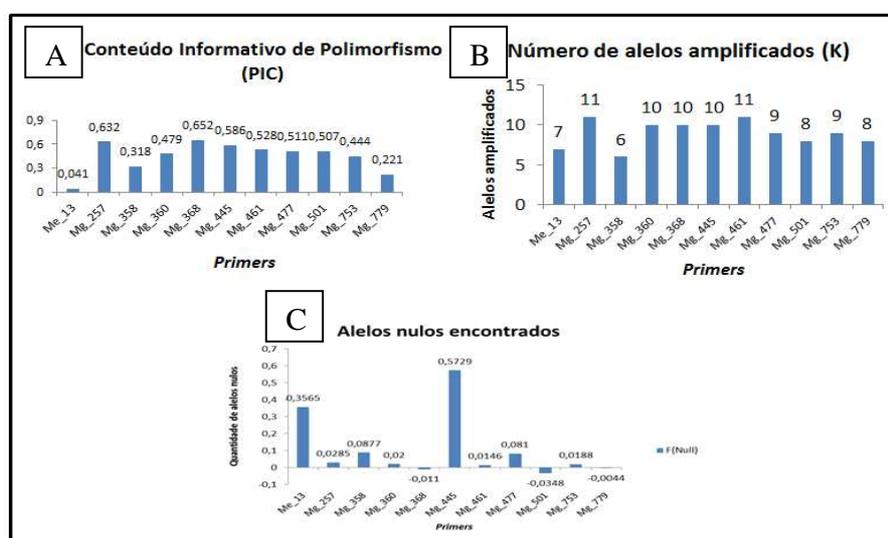


Figura 4 Representação gráfica contendo valores de A) PIC – Polymorphic Information Content; B) Número de Alelos amplificados (também chamado de fator K); e C) Número de alelos encontrados gerados a partir da frequência alélica encontrada pela análise de fragmentos por meio de marcadores moleculares microssatélites

O PIC – *Polymorphic Information Content*, é uma forma de medir a quantidade de informação de polimorfismo que cada marcador é capaz de gerar para cada locus. Assim, analisando-se os dados apresentados (Figura 4A), verifica-se que na população analisada, os marcadores Me_13, Mg_358 e Mg_779 apresentaram os menores valores de PIC (0,041; 0,318 e 0,221 respectivamente), sendo “portanto” pouco informativos com relação à diversidade. Por outro lado, destacam-se como marcadores com alto poder informativo o Mg_257, Mg_368 e Mg_445, com PIC de 0,632; 0,652 e 0,586, respectivamente.

O número de alelos amplificados (Figura 4B) também é uma forma de quantificar a diversidade genética, visto que representa a riqueza de variações alélicas, sendo que quanto maior o número de alelos amplificados, maior informação da diversidade gerada pelo marcador. Neste caso, pode-se observar novamente, que juntamente com o Mg_501, os marcadores Me_13, Mg_358 e Mg_779, quando comparados com os demais marcadores, foram os menos informativos, pois apresentaram os menores números de alelos amplificados.

Um alelo é tido como nulo F (“*null*”) (Figura 4C), quando por algum motivo, houver falhas na reação de PCR. Essas falhas podem ocorrer por competição natural na PCR, mutações nos sítios de anelamento dos *primers*, comumente do tipo INDEL (inserções e/ou deleções) ou pontuais SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e podendo assim interferir fortemente nas análises de genotipagem (DAKIN; AVISE, 2004; FARIA et al., 2010).

Os *loci* Mg_368, Mg_501 e Mg_779, apresentaram valores negativos para os alelos nulos (Figura 3C). Esse comportamento é esperado em lócus com excesso de genótipos heterozigotos observados. Já os marcadores Me_13, Mg_358, Mg_445 e Mg_477 há um número F (*null*) acima de 0,05, podendo justificar assim, a não significância no teste de *Hardy-Weinberg* no *primer* Mg_358, bem como a impossibilidade de realização da análise nos lócus Me_13 e Mg_445, que apresentaram F (*null*) consideravelmente acima de 0,5 (Figura 2, painel C) e baixa *Hobs* (tabela 5), indicando assim a possibilidade desse loco possuir bastante variação alélica, porém baixa recombinação.

Vale ressaltar que o marcador Mg_445, embora tenha apresentado valores elevados para o PIC (Figura 4A) e número de alelos amplificados (Figura 4B), o mesmo também apresentou valores elevados de alelos nulos (Figura 4C), indicando que o mesmo é informativo, porém a população analisada possui alta taxa de homozigose neste locus.

A Tabela 7 apresenta as estimativas de parâmetros forenses, probabilidade de exclusão de paternidade (PE) e probabilidade de identidade (PI), para os onze marcadores moleculares utilizados neste estudo. A probabilidade de exclusão de paternidade (PE) corresponde ao poder com o qual um locus é capaz de excluir um indivíduo selecionado erroneamente como parental de um descendente. Os valores PE-1 correspondem às probabilidades de exclusão de um parental candidato com um dos pais conhecidos e os valores PE-2 se referem às probabilidades de exclusão com ambos os pais desconhecidos (situação da população alvo deste trabalho). A probabilidade de identidade (PI) corresponde à probabilidade de dois indivíduos aleatórios apresentarem o mesmo genótipo (CUBRY et al., 2008; FARIA et al., 2010, 2011; PONCET et al., 2004).

O poder combinado dos 11 *loci* estudados alcançou um valor de Probabilidade de Identidade (PI) da ordem de $5,00 \times 10^{-7}$ (tabela 7) o que,

conforme relatado na literatura, é suficiente para a correta e precisa discriminação de indivíduos em plantas, tais como observado no *Eucalyptus* (SANSALONI, 2008). Esse parâmetro é probabilidade de diferenciar dois indivíduos com mesma frequência alélica.

Tabela 7 Estimativas de parâmetros forenses, poder de exclusão com um pai conhecido (PE-1), pais desconhecidos (PE-2) e probabilidade de identidade (PI)

Loci	PE-1	PE-2	PI
Me_13	0,021	0,042	0,919
Mg_257	0,442	0,627	0,149
Mg_358	0,177	0,295	0,454
Mg_360	0,344	0,549	0,244
Mg_368	0,496	0,694	0,118
Mg_445	0,408	0,586	0,174
Mg_461	0,367	0,538	0,206
Mg_477	0,355	0,539	0,220
Mg_501	0,356	0,550	0,223
Mg_753	0,288	0,453	0,287
Mg_779	0,146	0,260	0,550
Poder combinado	0,986	0,999	5,0E-07

Os valores de PE-2 apresentados na tabela 7, mostram que com exceção dos marcadores Me_13, Mg_358, Mg_753 e Mg_779, todos os outros marcadores apresentaram valores de PE-2 superiores a 0,5, apresentando portanto um nível de confiabilidade mais elevado. Observa-se que os valores de PE-2 combinado foi da ordem de 99,9%, indicando que esses marcadores utilizados em conjunto, são capazes de excluir 99,9 % de parentais identificados erroneamente. Nesse aspecto, relatos na literatura mostram que marcadores dinucleotídeos como os que foram utilizados nesse estudo, são certamente mais potentes para essa aplicação, quando comparados aos marcadores tetra e penta nucleotídeos, ou seja, com repetição de quatro e cinco bases nitrogenadas repetitivamente (KIRST et al., 2005; SANSALONI, 2008).

5.3 Análise da distância gênica dos pais

O resultado de clusterização por UPGMA, obtido pela análise da distância genética (NEI, 1978), utilizando-se somente os dados dos parentais oriundos do INCAPER é mostrada na Figura 5. Observa-se a formação de vários subgrupos, indicando a existência de diversidade genética considerável no grupo de parentais.

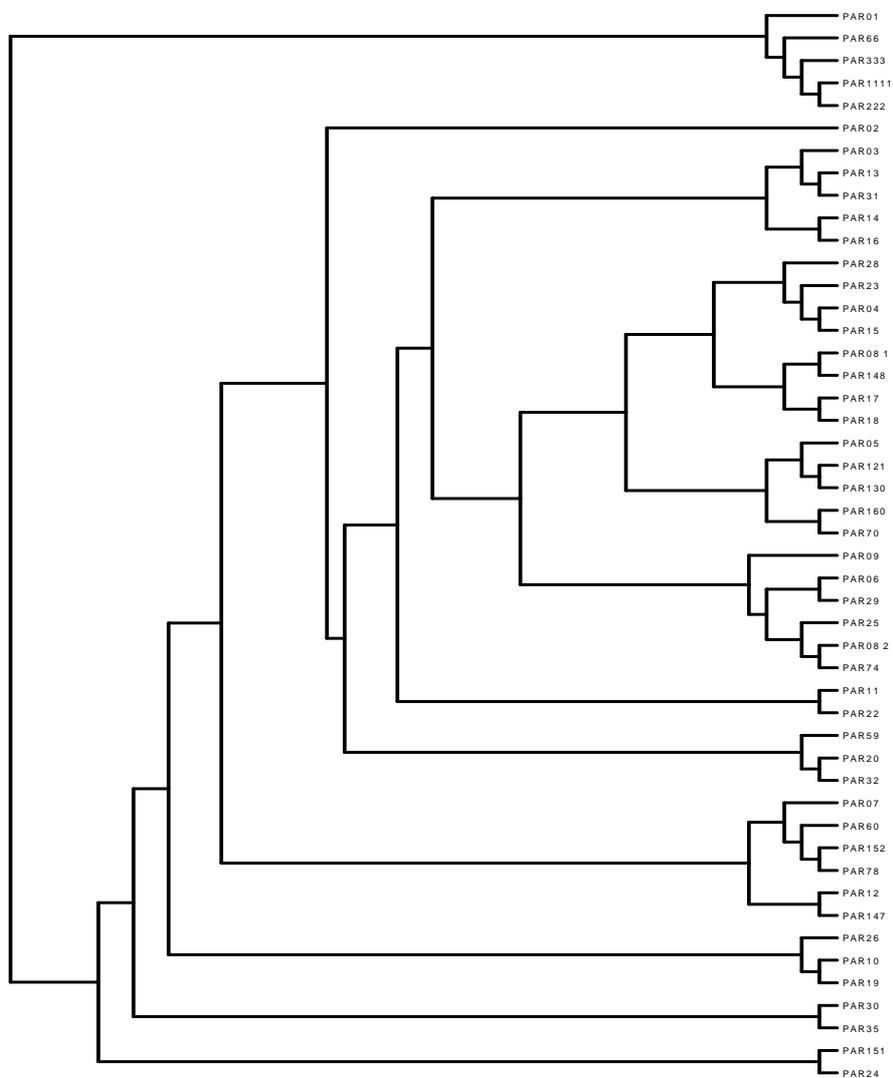


Figura 5 Dendrograma por agrupamento UPGMA, obtido a partir da matriz de similaridade genética dos parentais, construída com base na distância genética de Nei (1978), calculada a partir dos dados de genotipagem de 11 marcadores moleculares microssatélites

Os resultados demonstram que existe variabilidade genética nos parentais oriundos do BAG do Incaper e que boa parte dos indivíduos, entre o PAR03 e o PAR32 (conforme dados da Figura 5), mesmo possuindo coancestralidade, geram vários subgrupos. O PAR02 é uma planta que merece atenção especial, pois ela se destaca de todos os outros clones parentais, por apresentar-se isolada em um sub-agrupamento.

O grupo contendo os indivíduos PAR01, PAR66, PAR333, PAR1111 e PAR 222 (no canto superior da Figura 5), também se destaca por ser bastante distinto dos demais e não conter sub-agrupamentos, indicando que essas plantas são bastante próximas. Há também três sub-grupos menores, compostos apenas por dois indivíduos (PAR11 e PAR22, PAR30 e PAR35, PAR151 e PAR24). Esse comportamento ao mesmo tempo em que os discrimina do restante dos parentais, indica que possivelmente sejam irmãos, ou seja, ao mesmo tempo em que há grande variabilidade genética dentro do BAG, há também indivíduos geneticamente semelhantes.

Uma segunda análise foi realizada, inserindo os representantes de diferentes grupos da diversidade de *C. canephora* (tabela 2), com o objetivo de verificar a similaridade dos parentais com os representantes dos grupos, conforme o dendograma apresentado na figura 6.

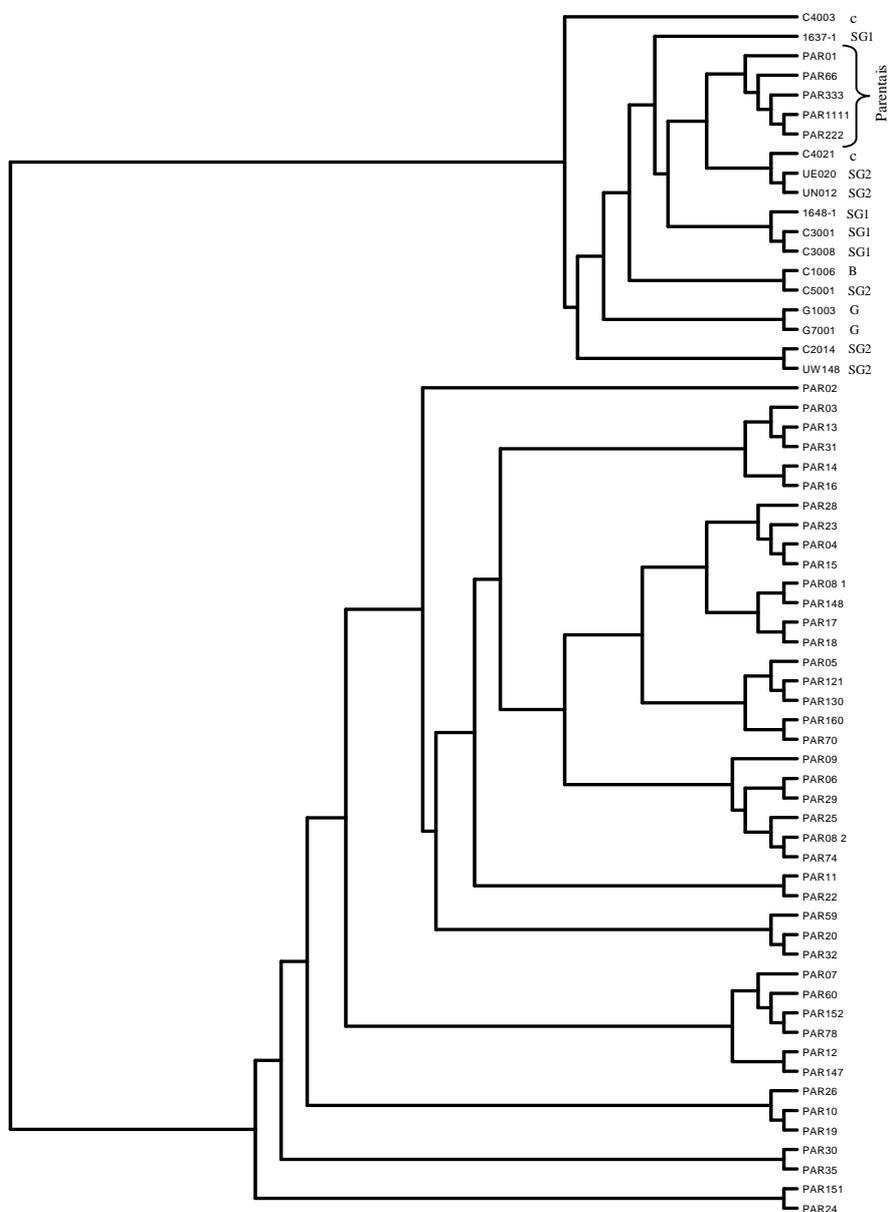


Figura 6 Dendrograma UPGMA representando a similaridade genética entre os representantes dos diferentes grupos de diversidade de *C. canephora* e dos parentais (PAR) oriundos do BAG do INCAPER

Novamente foi possível observar uma grande variabilidade genética entre os indivíduos, porém com essa segunda análise, formaram-se basicamente dois grandes grupos.

O primeiro agrupamento é composto pelos representantes dos grupos SG1, SG2, B e C de diversidade de *C. canephora* com cinco representantes (PAR01, PAR66, PAR33, PAR1111 e PAR222) provenientes do INCAPER (Figura 6). Esses cinco indivíduos são justamente os que na análise anterior (Figura 5), formavam um grupo à parte. Essa nova clusterização sugere que esses parentais estão mais próximos geneticamente de um coancestral selvagem.

O segundo grande grupo, composto apenas pelos parentais, segue o mesmo agrupamento observado sem a introdução dos representantes dos grupos. Novamente, o PAR02 chama atenção dentro do segundo grupo, pois o ainda compõem sozinho, um sub-grupo.

Para facilitar a visualização da análise da similaridade entre os parentais, representantes dos diferentes subgrupos do *C. canephora* e a população, foi adotada a clusterização probabilística pelo método Bayesiano, conforme demonstrado na Figura 7. Esta clusterização foi realizada no *Software Structure 2.3.4* onde foram analisadas as 325 amostras.

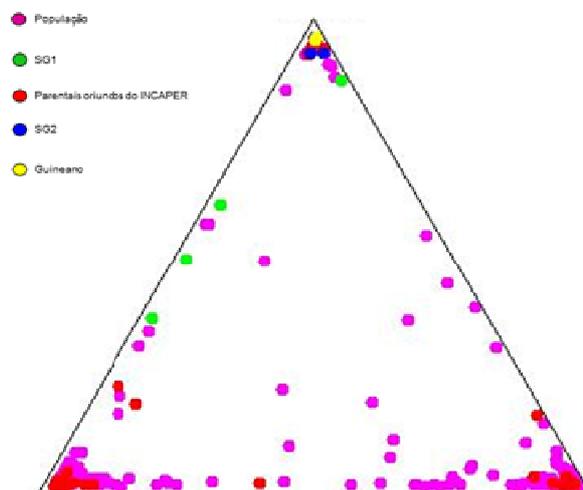


Figura 7 Clusterização Bayesiana dos indivíduos da população (pontos em Rosa), os parentais oriundos do INCAPER (pontos vermelhos), e os representantes dos grupos de diversidade de *C. canephora* (SG1, pontos verdes; SG2, pontos azuis e Guineano, pontos amarelos)

Os resultados indicam claramente a formação de dois grupos distintos (vértices inferiores do triângulo) compostos dos parentais (vermelho) e indivíduos da população, além de indivíduos da população intermediários e dispersos entre os vértices da base (Figura 7). Além disto, os resultados mostram uma maior proximidade genética dos membros do grupo SG1 (pontos verdes), com os parentais e a população de Conilon estudada. Este fato, também pode ser claramente visualizado quando os dados são apresentados para representar a distância genética entre os clusters utilizando-se o algoritmo *Neighbor-Joining* (Figura 8). Estes resultados confirmam estudos anteriores de uma maior proximidade de *C. canephora* var. Conilon com os membros do grupo SG1 de Congolese (CUBRY et al., 2008; LAMBOT et al., 2008).

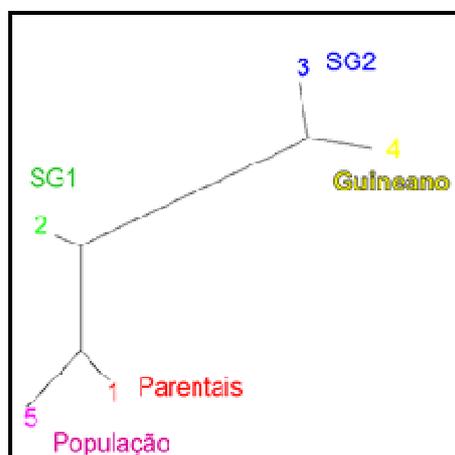


Figura 8 Representação da distância genética entre os 5 *clusters* identificados utilizando-se o algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ), obtido por meio das análises com o *software Structure 2.3.4*

A ilustração da Figura 7 mostra também um agrupamento envolvendo os representantes dos outros grupos de diversidade de robusta (SG2- azul e Guineano- amarelo), no vértice superior do triângulo, assim como alguns membros dos parentais (vermelho) e alguns indivíduos da população (rosa). Desta forma, pode-se concluir que existe variabilidade genética considerável na população estudada, com certa estruturação, mas também com indivíduos dispersos e presentes nos diferentes agrupamentos.

5.4 Análise de paternidade

Os resultados das análises de paternidade, realizada com *software Cervus* aos níveis de confiança (80/95%), encontram-se apresentados na tabela 8. Os resultados indicam que as análises foram eficientes em identificar os parentais para todos os indivíduos analisados na população.

Com base nesses resultados, foi também possível identificar os parentais mais frequentes (Tabela 9). É evidente que os parentais possuem participação genética em quantidade bastante variada e ao mesmo tempo muito discrepante, variando de 0,38% a 24,44% de recorrência.

Tabela 8 Prováveis parentais dos indivíduos da população de *C. canephora* var. Conilon, identificados por meio de análises com o *software Cervus*

População	1ºPai	2ºPai	População	1ºPai	2ºPai	População	1ºPai	2ºPai
Clone 120	PAR222	PAR66	L5P25	PAR08_1	PAR12	L7P60	PAR06	PAR14
Clone 14	PAR1111	PAR333	L5P28	PAR32	PAR60	L7P64	PAR22	PAR32
Clone 22	PAR1111	PAR148	L12P57	PAR03	PAR13	L7P66	PAR12	PAR32
Clone 73	PAR222	PAR66	L12P65	PAR12	PAR28	L7P67	PAR05	PAR12
L10P102	PAR08_1	PAR60	L12P66	PAR13	PAR60	L1P16	PAR12	PAR25
L10P11	PAR31	PAR60	L12P68	PAR07	PAR60	L1P19	PAR31	PAR60
L10P14	PAR22	PAR66	L12P78	PAR06	PAR07	L1P20	PAR03	PAR60
L10P17	PAR31	PAR60	L12P84	PAR07	PAR60	L1P32	PAR15	PAR60
L10P18	PAR07	PAR31	L12P97	PAR06	PAR66	L1P35	PAR59	PAR60
L10P22	PAR60	PAR78	L13P104	PAR07	PAR31	L1P37	PAR151	PAR78
L10P23	PAR12	PAR70	L13P15	PAR04	PAR07	L1P49	PAR04	PAR05
L10P25	PAR05	PAR12	L13P21	PAR24	PAR60	L1P50	PAR151	PAR66
L10P38	PAR22	PAR60	L13P35	PAR17	PAR70	L1P60	PAR04	PAR160
L10P48	PAR08_1	PAR31	L13P52	PAR24	PAR29	L1P62	PAR160	PAR23
L10P52	PAR28	PAR78	L13P54	PAR05	PAR148	L1P65	PAR12	PAR70
L10P61	PAR08_1	PAR66	L13P60	PAR07	PAR12	L20P119	PAR04	PAR08_1
L10P66	PAR04	PAR66	L13P63	PAR15	PAR74	L20P47	PAR06	PAR11
L10P68	PAR07	PAR14	L13P83	PAR12	PAR18	L20P73	PAR09	PAR24
L10P93	PAR15	PAR160	L14P24	PAR04	PAR78	L20P93	PAR04	PAR22
L10P95	PAR17	PAR60	L14P33	PAR03	PAR04	L21P12	PAR14	PAR31
L10P96	PAR12	PAR14	L14P71	PAR07	PAR08_1	L21P122	PAR08_1	PAR25
L11P20	PAR09	PAR12	L14P73	PAR06	PAR148	L21P19	PAR24	PAR70
L11P37	PAR13	PAR60	L14P75	PAR06	PAR130	L24P106	PAR08_2	PAR29
L11P46	PAR23	PAR78	L14P76	PAR08_1	PAR16	L24P143	PAR08_2	PAR74
L11P47	PAR07	PAR60	L14P80	PAR148	PAR70	L24P50	PAR121	PAR78
L11P48	PAR03	PAR60	L14P88	PAR04	PAR31	L2P10	PAR147	PAR30

“Tabela 8, continuação”

População	1ºPai	2ºPai	População	1ºPai	2ºPai	População	1ºPai	2ºPai
L11P51	PAR05	PAR28	L15P113	PAR05	PAR29	L2P13	PAR04	PAR130
L11P53	PAR12	PAR78	L15P14	PAR31	PAR60	L2P21	PAR151	PAR78
L11P56	PAR31	PAR60	L15P19	PAR08_1	PAR148	L2P23	PAR23	PAR60
L11P58	PAR04	PAR60	L15P35	PAR06	PAR66	L2P30	PAR147	PAR28
L11P62	PAR06	PAR23	L15P99	PAR06	PAR74	L2P32	PAR26	PAR29
L11P74	PAR04	PAR160	L16P49	PAR07	PAR148	L2P33	PAR10	PAR35
L11P76	PAR18	PAR60	L16P72	PAR31	PAR78	L2P34	PAR08_1	PAR60
L11P84	PAR12	PAR160	L16P75	PAR31	PAR60	L2P38	PAR06	PAR25
L11P98	PAR07	PAR08_1	L17P106	PAR09	PAR11	L2P41	PAR05	PAR12
L12P08	PAR06	PAR66	L18P102	PAR12	PAR148	L2P44	PAR08_1	PAR60
L12P15	PAR23	PAR78	L18P21	PAR12	PAR32	L2P45	PAR12	PAR151
L12P17	PAR04	PAR160	L18P52	PAR02	PAR147	L2P48	PAR19	PAR26
L12P27	PAR05	PAR60	L18P56	PAR09	PAR148	L2P57	PAR121	PAR151
L12P41	PAR05	PAR23	L18P72	PAR08_2	PAR148	L2P59	PAR04	PAR121
L12P44	PAR04	PAR14	L18P82	PAR05	PAR08_2	L2P62	PAR31	PAR60
L12P49	PAR31	PAR60	L19P126	PAR05	PAR74	L2P64	PAR31	PAR60
L12P51	PAR31	PAR60	L19P130	PAR08_1	PAR74	L2P65	PAR10	PAR30
L12P54	PAR13	PAR152	L19P57	PAR09	PAR148	L2P67	PAR31	PAR60
L3P17	PAR04	PAR60	L19P59	PAR09	PAR14	L2P70	PAR04	PAR06
L3P19	PAR04	PAR28	L1P15	PAR03	PAR60	L2P71	PAR04	PAR78
L3P21	PAR147	PAR30	L5P32	PAR07	PAR60	L3P15	PAR121	PAR31
L3P22	PAR10	PAR28	L5P33	PAR31	PAR60	L3P16	PAR07	PAR78
L3P24	PAR147	PAR222	L5P39	PAR11	PAR78	L7P68	PAR60	PAR78
L3P35	PAR11	PAR151	L5P45	PAR12	PAR151	L7P73	PAR08_1	PAR60
L3P37	PAR31	PAR60	L5P48	PAR160	PAR60	L7P84	PAR06	PAR31
L3P38	PAR03	PAR31	L5P50	PAR03	PAR60	L7P85	PAR04	PAR66
L3P40	PAR03	PAR31	L5P60	PAR31	PAR60	L7P89	PAR29	PAR66

“Tabela 8, continuação”

População	1ºPai	2ºPai	População	1ºPai	2ºPai	População	1ºPai	2ºPai
L3P42	PAR10	PAR30	L5P66	PAR11	PAR60	L8P12	PAR60	PAR78
L3P50	PAR1111	PAR78	L5P71	PAR12	PAR130	L8P13	PAR147	PAR19
L3P55	PAR121	PAR130	L5P72	PAR07	PAR130	L8P15	PAR148	PAR70
L3P56	PAR03	PAR60	L6P22	PAR31	PAR60	L8P23	PAR31	PAR59
L3P57	PAR12	PAR23	L6P23	PAR08_1	PAR78	L8P36	PAR12	PAR16
L4P09	PAR13	PAR60	L6P26	PAR12	PAR160	L8P37	PAR04	PAR06
L4P10	PAR03	PAR60	L6P27	PAR06	PAR333	L8P42	PAR06	PAR14
L4P13	PAR05	PAR59	L6P28	PAR151	PAR60	L8P45	PAR04	PAR31
L4P14	PAR151	PAR20	L6P37	PAR31	PAR60	L8P46	PAR04	PAR22
L4P16	PAR12	PAR151	L6P38	PAR04	PAR13	L8P48	PAR07	PAR66
L4P21	PAR12	PAR121	L6P42	PAR09	PAR121	L8P50	PAR07	PAR31
L4P23	PAR13	PAR60	L6P45	PAR03	PAR12	L8P53	PAR04	PAR08_2
L4P26	PAR15	PAR160	L6P46	PAR07	PAR121	L8P56	PAR130	PAR74
L4P30	PAR10	PAR147	L6P49	PAR06	PAR07	L8P62	PAR07	PAR152
L4P45	PAR03	PAR07	L6P50	PAR08_2	PAR66	L8P64	PAR130	PAR160
L4P47	PAR09	PAR14	L6P54	PAR05	PAR09	L8P66	PAR15	PAR22
L4P48	PAR160	PAR20	L6P61	PAR12	PAR78	L8P69	PAR05	PAR13
L4P51	PAR08_1	PAR160	L6P63	PAR05	PAR66	L8P75	PAR03	PAR66
L4P53	PAR07	PAR60	L6P66	PAR23	PAR60	L8P76	PAR04	PAR12
L4P56	PAR16	PAR60	L6P67	PAR151	PAR78	L8P80	PAR04	PAR06
L4P61	PAR31	PAR60	L6P73	PAR130	PAR151	L9P07	PAR08_1	PAR66
L4P62	PAR147	PAR66	L6P75	PAR06	PAR66	L9P112	PAR04	PAR08_1
L4P66	PAR12	PAR130	L6P85	PAR130	PAR31	L9P113	PAR06	PAR66
L4P67	PAR147	PAR19	L6P87	PAR08_1	PAR160	L9P17	PAR09	PAR12
L4P69	PAR23	PAR60	L7P17	PAR08_1	PAR12	L9P23	PAR03	PAR05
L4P71	PAR08_1	PAR12	L7P26	PAR16	PAR60	L9P50	PAR12	PAR23
L4P74	PAR31	PAR60	L7P28	PAR07	PAR60	L9P53	PAR08_1	PAR60

“Tabela 8, conclusão”

População	1ºPai	2ºPai	População	1ºPai	2ºPai	População	1ºPai	2ºPai
L5P02	PAR30	PAR59	L7P45	PAR11	PAR130	L9P66	PAR06	PAR13
L5P16	PAR16	PAR60	L7P47	PAR09	PAR12	L9P70	PAR07	PAR60
L5P17	PAR08_1	PAR121	L7P50	PAR08_1	PAR12	L9P73	PAR03	PAR07
L5P18	PAR31	PAR60	L7P52	PAR12	PAR66	L9P91	PAR07	PAR11
L5P20	PAR12	PAR66	L7P55	PAR03	PAR60	L9P92	PAR13	PAR60
L5P21	PAR07	PAR11	L7P57	PAR08_1	PAR12	L9P95	PAR04	PAR13

É válido ressaltar que os clones 14 e 120 apresentam tolerância à seca, enquanto que o clone 22 é sensível (MARRACCINI et al., 2012) e que os clones 22 e 14 apresentam-se na análise de paternidade (Tabela 8) como meio irmãos, ou seja possuem um dos pais em comum (PAR1111), por outro lado, os clones 73 e 120 tolerantes a seca apresentam-se como irmão, tendo como pais as plantas PAR222 e PAR66.

Tabela 9 Frequência da recorrência de cada pai na população

Pais Candidatos	Frequência %	Pais Candidatos	Frequência %
PAR60	24,44	PAR28	2,26
PAR12	14,29	PAR70	2,26
PAR31	12,41	PAR74	2,26
PAR04	10,9	PAR10	1,88
PAR07	10,15	PAR15	1,88
PAR08_1	9,4	PAR16	1,88
PAR06	7,89	PAR29	1,88
PAR66	7,89	PAR30	1,88
PAR78	7,14	PAR24	1,5
PAR03	6,02	PAR32	1,5
PAR05	5,64	PAR59	1,5
PAR160	4,89	PAR1111	1,13
PAR151	4,51	PAR19	1,13
PAR09	4,14	PAR222	1,13
PAR13	4,14	PAR25	1,13
PAR130	4,14	PAR333	1,13
PAR148	4,14	PAR152	0,75
PAR23	3,76	PAR17	0,75
PAR121	3,38	PAR18	0,75
PAR147	3,38	PAR20	0,75
PAR11	3,01	PAR26	0,75
PAR14	3,01	PAR02	0,38
PAR08_2	2,26	PAR35	0,38
PAR22	2,26		

Pode-se observar que os parentais PAR 60, PAR 12, PAR 31, PAR04 e PAR07, foram os que apresentaram maior ocorrência. Isto pode indicar que estes parentais tem uma compatibilidade e/ou sincronismo de florescimento com um maior número de plantas da amostra de 48 parentais.

5.5 Genotipagem de uma planta com suspeita de autofecundação

Como indicado previamente, as plantas da espécie *C. canephora* são alógamas. No entanto a possibilidade de existência de uma planta de Robusta auto-compatível, seria de extrema importância para os programas de melhoramento genético de plantas, pois permitiria a formação de lavouras de Conilon obtidas a partir das suas próprias sementes, descartando a necessidade de propagar para os agricultores os clones de *C. canephora* por estacas, permitindo assim o uso de lavouras geneticamente homogêneas compostas de somente um clone. Além disso, poderia ser interessante transferir esse caráter em outras plantas da espécie para propagar rapidamente e com custo reduzidos clones de interesse agrônomicos como os tolerantes a seca. Por acaso, foi encontrada no município de São Gabriel de Palha – ES, na propriedade do engenheiro agrônomo João Luis Perinni uma única planta de café aparentemente isolada de outras plantas de *C. canephora* frutificando em seus quatro ramos ortotrópicos (cada ano com alta produção), mesmo com os ramos protegidos para impedir a alopolinização e com fenótipo característico de Robusta (Figura 9). Esses fatores contrariam o conhecimento científico e as descrições botânicas do *C. canephora*.

Para investigar a hipótese de uma possível descoberta de uma planta com provável mutação natural no locus S de *C. canephora* de forma a tornar-se autógama, a possibilidade de tratar-se de uma planta quimérica, triplóide (do tipo arabusta) ou ainda, tratar-se não de uma, mas sim de duas plantas. Foram realizados clones via estacas e também coletadas sementes desta planta para avaliação da descendência.



Figura 9 Planta com suspeita de auto-compatibilidade encontrada no município de São Gabriel da Palha – ES, na propriedade do Eng. Agrônomo João Luis Perinni (foto)

Tendo em vista as informações a respeito da eficiência e confiabilidade dos dados gerados a partir da genotipagem com o uso de marcadores SSR marcados fluorescentemente foram analisados 13 descendentes desta planta, sendo 8 obtidas por estaquia e 5 por germinação de sementes oriundas da mesma.

Pequenas alterações de metodologia foram adotadas em relação ao estudo anterior, sendo que estas consistiram na análise idêntica à descrita anteriormente seguida por uma segunda eletroforese em capilar de 50 cm de comprimento e *Size Standard LIZ -500 – Applied Biosystems*.

Neste uso prático/aplicado da técnica, foi possível a amplificação em somente oito marcadores Mg_368; Mg_445; Mg_461; Mg_477; Mg_501;

Mg_753; Mg_360 e Mg_779. Com esse conjunto de marcadores, foi possível obter dados de genotipagem de todos os indivíduos que estão apresentados na Tabela 10. Os eletroforegramas obtidos para cada um desses pares de *primers* são mostrados também (Anexo, Figuras 13 até 20, respectivamente para os *primers* citados acima)

Tabela 10 Resultado da genotipagem dos oito clones obtidos por estacas e cinco descendentes obtidos pela germinação de sementes originadas a partir da planta com suspeita de autofecundação

	Mg_360a/b	Mg_368a/b	Mg_445a/b	Mg_461a/b	Mg_477a/b	Mg_501a/b	Mg_753a/b	Mg_779a/b
ESTACA1	202/204	171/173	279/279	82/90	259/279	133/144	272/272	119/119
ESTACA2	202/204	171/173	279/279	82/90	259/279	133/144	272/272	119/119
ESTACA3	202/204	171/173	279/279	82/90	259/279	133/144	272/272	119/119
ESTACA4	202/204	171/173	279/279	82/90	259/279	133/144	272/272	119/119
ESTACA5	202/204	171/173	279/279	82/90	259/279	133/144	272/272	119/119
ESTACA6	202/204	171/173	279/279	82/90	259/279	133/144	272/272	119/119
ESTACA7	202/204	171/173	279/279	82/90	259/279	133/144	272/272	119/119
ESTACA8	202/204	171/173	279/279	82/90	259/279	133/144	272/272	119/119
SEMENTE1	202/204	171/173	279/279	82/90	255/259	133/144	272/272	107/119
SEMENTE2	204/206	171/173	279/279	82/82	255/259	133/144	272/272	107/119
SEMENTE3	204/204	171/173	279/279	90/90	259/279	133/144	272/272	107/119
SEMENTE4	202/206	171/171	279/279	90/90	255/259	133/144	272/272	107/119
SEMENTE5	202/204	171/171	279/279	82/90	255/259	133/144	272/272	119/119

Esses dados mostram que os marcadores moleculares utilizados foram eficientes em comprovar a identidade genotípica de todas as plantas produzidas por estacas, pois todas as estacas testadas apresentam genótipos iguais entre si, embora os diferentes ramos da planta mãe não tenham sido incluídos na análise em questão. Esta inclusão eliminaria a hipótese de tratar-se de mais de uma planta ou de quimérica.

Entretanto no caso das plantas produzidas por sementes, em alguns casos, alelos diferentes dos presentes nas estacas foram observados. Por exemplo, nos resultados do marcador Mg_360, o alelo 206 apareceu nas plântulas derivadas da semente 2 e 4 (Tabela 10).

Evidencia-se nos dados genotípicos, que entre as plantas obtidas por sementes, a “semente 2 e semente 4” apresentaram amplificação de alelos distinto às estacas (206, 255 e 107) para os *primers* Mg_360, Mg_477 e Mg_779 respectivamente (Tabela 10). Estes dois indivíduos foram os representantes das plantas obtidas por sementes que apresentaram maior número de loci com distinção das estacas. Por outro lado, há ainda dois representantes do mesmo grupo também destacados (semente 2 e semente 5), que apresentam apenas um alelo distinto dos amplificados (locus Mg_779 e Mg_477) no grupo de plantas obtidas por estacas.

Exemplos da existência de alguns desses alelos não encontrados nas estacas são apresentados na Figura 10, a qual é composta por perfis eletroforéticos de uma representante das plantas obtidas por estacas (estaca 8) e por uma do grupo obtida por semente (semente 2).

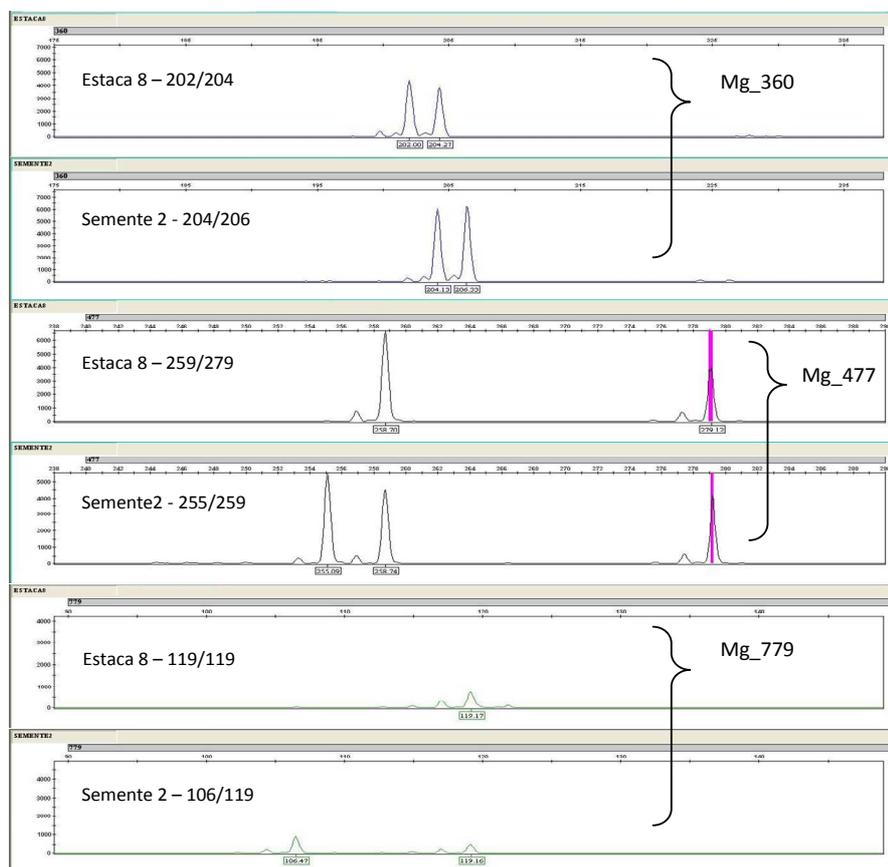


Figura 10 Eletroferograma da análise de fragmentos obtido com a técnica de eletroforese em sequenciador automático a partir do produto de PCR amplificado com os *primers* Mg_360, Mg_477 e Mg_779 de um clone (estaca 8) e um descendente (semente 2)

É possível observar que no perfil eletroforético da semente 2 amplificado com o marcador Mg_477 (Figura 11), a presença de um pico de tamanho aproximado de 279 pb, o qual não foi considerado na tabela de genotipagem (Tabela 10) pois, quando sobreposto às ampliações do *primer* Mg_455 e Mg_477, verificou-se que por falha no sistema de filtragem do

sequenciador automático para os diferentes fluorocromos (quando utilizado como marcador padrão o LIZ-500), havia sobreposição dos picos dos *primers* acima listados. Foi possível chegar a esse resultado, somente quando foi realizada a mesma análise utilizando o marcador padrão ROX (LI et al., 2001), que não apresentou tal alelo de aproximadamente 279 pb.

Com base em todas as informações evidenciadas acima, obtidas pela análise de fragmentos por meio de marcadores moleculares microssatélites, pode-se afirmar que a planta analisada apresenta fortes indicativos genéticos de que não se trata de uma possível mutante autógama, pois há presença de alelos diferentes dos obtidos nos clones em três *loci*, sendo que um deles é o Mg_779, que na análise anterior, demonstrou-se com baixo potencial informativo de polimorfismo.

Utilizando os dados genotípicos da planta de Robusta, com suspeita de autogamia, foi possível realizar a clusterização por UPGMA (NEI, 1978) em um dendrograma (Figura 11). Objetivando a visualização gráfica da similaridade entre os indivíduos obtidos da planta com suspeita de autogamia.

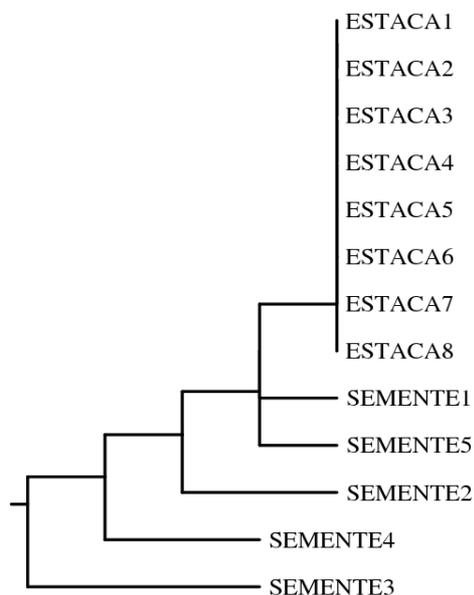


Figura 11 Dendrograma representando os 13 indivíduos descendentes da planta, com suspeita de autofecundação, obtido a partir dos dados de genotipagem clusterizados por UPGMA apresentando a similaridade genética entre os indivíduos

Avaliando o dendrograma (Figura 11), é possível observar que embora as plantas obtidas por sementes da planta com suspeita de autogamia, “sementes 3 e 5” apresentarem na tabela de genotipagem (Tabela3) apenas um alelo distinto dos encontrados nas estacas, as mesmas não foram agrupadas diretamente, sendo a planta “semente 4” agrupada mais próxima. Esse fato pode ser justificado pela ausência de segregação em alguns *loci* (Mg_368, Mg_445, Mg_501 e Mg_753) da planta 4 obtidas por sementes.

6 CONCLUSÕES

- a) As estimativas de parâmetros genéticos dos marcadores moleculares utilizados nesse estudo mostraram que pelo menos oito dos onze marcadores microssatélites são informativos e adequados para os estudos realizados neste trabalho;
- b) As estimativas de parâmetros forenses dos marcadores moleculares utilizados neste estudo, também confirmaram a sua eficiência para a realização dos estudos de paternidade deste trabalho;
- c) Os estudos de diversidade genética mostraram que a população estudada neste trabalho, contém considerável variabilidade genética;
- d) Os resultados das análises realizadas com o *software Structure 2.3.4* confirmaram estudos prévios de uma similaridade de *C. canephora* var. Conilon com membros do grupo de diversidade SG1;
- e) Os resultados das análises de paternidade foram eficientes em identificar os prováveis parentais de cada indivíduo da população, assim como descrever parentais com maior ocorrência;
- f) O parental “PAR60” é a planta mais recorrente na população, indicando que o mesmo tem elevada taxa de polinização e fecundação, sendo talvez uma planta recomendável para compor uma variedade clonal;
- g) O conjunto de 8 marcadores moleculares microssatélites utilizado nas análises apresentadas, foi capaz de analisar geneticamente o genótipo de 8 plantas oriundas de estacas e de 5 plantas descendentes de sementes obtidas a partir de uma planta de *Coffea* considerada como apresentando alogamia;

- h) As análises genéticas das estacas apresentaram-se idênticas entre elas, comprovando que as mesmas têm como origem a mesma planta;
- i) Para essas estacas, os *loci* Mg_445 e Mg_753 apresentaram-se homozigotos enquanto os demais *loci* apresentaram-se heterozigotos
- j) Nas plantas obtidas a partir de sementes da planta mãe, os *loci* Mg_360, Mg_477 e Mg_779 apresentaram alelos diferentes dos encontrados nas estacas;
- k) Embora haja fortes indícios fenotípicos que essa planta realmente seja uma planta autógama pela grande quantidade de frutos obtidos a cada safra, os dados genotípicos apresentados evidenciam que não se trata de uma planta autógama;
- l) Estudos posteriores (citometria, nova análise genética com material vegetal coletados de todos os ramos da planta da planta matriz separadamente, aumentar o número de marcadores moleculares) devem ser realizados para descartar todas as hipóteses anteriormente levantadas.

7 PERSPECTIVAS

A técnica bem como os marcadores microssatélites utilizados neste estudo apresentaram-se eficientes, cumprindo com os objetivos propostos neste trabalho, que é um real auxílio/necessidade para o programa de melhoramento genético do café. Entretanto, estudos a respeito de custos devem ser realizados para avaliar a viabilidade financeira para implantação desta metodologia na rotina do programa de melhoramento. Se viável, pode ser levada em consideração também a possibilidade da síntese de novos marcadores fluorescentemente marcados, inclusive ligados à QTLs, para que ao mesmo tempo em que é estudada a diversidade genética, avalia-se geneticamente também características de interesse.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, K. et al. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 2, p. 359-372, Jan. 2007.
- AGUIAR, A. T. da E. et al. Diversidade química de cafeeiros na espécie *Coffea canephora*. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 577-582, 2005.
- ALVARENGA, S. M. Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 890-898, ago. 2011.
- ALVARENGA, S. M. et al. In silico identification of coffee genome expressed sequences potentially associated with resistance to diseases. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 4, p. 795-806, 2010.
- ANTHONY, F. et al. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 118, n. 1, p. 53-65, 2001.
- ASQUINI, E. et al. S-RNase-like Sequences in styles of *Coffea* (Rubiaceae): evidence for S-RNase based gametophytic self-incompatibility? **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 3/4, p. 237-249, 2011.
- BARUAH, A. et al. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 647-650, 2003.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 513-520, 1997.
- BERTHAUD, J. **Les ressources génétiques pour l'amélioration des cafeiers africains diploïdes**: evaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs: conséquences pour l'application. 1984. 373 f. Thèse (Doctorat en Sciences Naturelles) - Université de Paris, Paris, 1984.

BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Breeding for resistance to Meloidogy neexigua in *Coffea arabica* by introgression of resistance gene of *Coffea canephora*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 50, n. 5, p. 637-643, 2001.

BORÉM, A.; MILACH, S. C. K. Melhoramento de plantas: o melhoramento de plantas na virada do milênio. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 7, p. 68-72, 1999.

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

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BRONDANI, R. P.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**, Natick, v. 31, n. 4, p. 793-800, Oct. 2001.

CAPUCHO, A. S. et al. Resistência do conilon vitória 8142 à raça i de *Hemileia vastatrix*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2001, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2001. p. 6. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/3893/100.pdf?sequence=2>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

CARPENIERI-PÍPOLO, V.; GARCIA, J. E.; RIVALDI, D. A. Desenvolvimento e aplicações de marcadores moleculares. In: _____. **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: COODETEC, 2006. p. 392-400.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M. N.; WILSON, K. C. (Ed.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Helm, 1985. p. 13-47.

COMBES, M. C. et al. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 1178-1180, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café safra 2013 primeira estimativa**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_43_49_boletim_cafe_janeiro_2013.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2013.

CONAGIN, C. H. C. T.; MENDES, A. J. T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. auto incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre, ex Froehner. **Bragantia**, Campinas, v. 20, n. 34, p. 277-804, 1961.

CUBRY, P. et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome**, Ottawa, v. 51, n. 1, p. 50-63, 2008.

_____. Global analysis of *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (*Rubiaceae*) from the Guineo-Congolese region reveals impacts from climatic refuges and migration effects. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 2, p. 483-501, 2012.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, Cary, v. 5, n. 93, p. 504-509, 2004.

DAMATTA, F. M. et al. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 1, p. 111-117, 2003.

DAVIS, A. P. Six species of *Psilanthus* transferred to *Coffea* (*Coffeae*, *Rubiaceae*). **Phytotaxa**, Auckland, v. 10, n. 1, p. 41-45, Oct. 2010.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). **Botanical Journal of The Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, 2006.

DEVREUX, M. et al. **Recherches sur l'autofertilité du caféier robusta (*C. canephora* Pierre)**. Bruxelles: INEAC, 1959. 44 p. (Série Scientifique, 78).

DIAS, F. P. et al. Desenvolvimento de cafeeiros enxertados em Apoatã IAC 2258 cultivados no campo isento de nematóides. **Coffee Science**, Lavras, v. 6, n. 3, p. 203-211, 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

DUFOUR, M. et al. Potential use of SSR markers for *Coffea* spp. genetic mapping. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 19., 2001, Trieste. **Proceedings...** Trieste: ISCC, 2001. 1 CD-ROM.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

FARIA, D. A. et al. Genotyping systems for *Eucalyptus* based on tetra, penta and heanucleotide repeat EST microsatellites and their use for individual fingerprinting and assignment tests. **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v. 7, n. 1, p. 63-77, 2011.

_____. Selected set of EST-Derived microsatellites, polymorphic and transferable across 6 species of *Eucalyptus*. **Journal of Heredity**, Washington, v. 101, n. 4, p. 512-520, 2010.

FAZUOLI, L. C. et al. A ferrugem alaranjada do cafeeiro e a obtenção de cultivares resistentes. **O Agrônômico**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 48-53, 2007.

FERRÃO, R. G. et al. **Café Conilon**. Vitória: INCAPER, 2007. 702 p.

_____. **Robustão Capixaba, variedade clonal de café Conilon tolerante à seca**. Vitória: INCAPER, 1999. 10 p.

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G. Banco ativo de germoplasma de *Coffea canephora*, variedade Conilon, no estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: EMBRAPA Café; MINASPLAN, 2000. p. 405-408.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (Documento, 20).

FONSECA, A. F. A. et al. Melhoramento genético de *Coffea canephora* no estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória: EMBRAPA Café, 2001. p. 1379-1384.

GARCIA-VALLVE, S.; PUIGBO, P. **DendroUPGMA**: a dendrogram construction utility. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili, 2009. Disponível em: <<http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php>>. Acesso em: 11 fev. 2013.

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

GUERREIRO FILHO, O. Coffee leaf miner resistance. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goytacases, v. 18, n. 1, p. 109-117, 2006.

HENDRE, P. S. et al. Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, n. 51, p. 1-19, 2008.

IVOGLO, M. G. et al. Divergência genética entre progênies de café robusta. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 823-832, 2008.

KALINOWSKI, S. T. et al. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.

KIRST, M. et al. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **Journal of Heredity**, Washington, v. 96, n. 2, p. 161-166, 2005.

KOCHKO, A. de et al. Advances in *Coffea* genomics. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 53, n. 1, p. 23-63, Mar. 2010.

KY, C. L. et al. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 4, p. 669-676, 2000.

LAMBOT, C. et al. Evaluation of Conilons for genetic diversity, cup quality and biochemical composition. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 22., 2008, Zurich. **Proceedings...** Zurich: ASIC, 2008. p. 14-19.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, Austin, v. 124, n. 3, p. 743-756, 1990.

LASHERMES, P. et al. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 458-462, Aug. 1996.

LEFEBVRE-PAUTIGNY, F. et al. High resolution synteny maps allowing direct comparisons between the coffee and tomato genomes. **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v. 6, n. 4, p. 565-577, 2010.

LEROY, T. et al. Construction and characterization of a *Coffea canephora* BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, n. 6, p. 1032-1041, 2005.

_____. Improving the quality of African robustas: QTLs for yield- and quality-related traits in *Coffea canephora*. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 7, n. 4, p. 781-798, 2011.

LI, J. et al. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**, Natick, v. 31, n. 4, p. 793-800, 2001.

LÓPEZ-GARTNER, G. et al. Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 5, n. 3, p. 435-446, 2009.

MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 11, p. 4191-4212, 2012.

MELO, B. de; SOUSA, L. B. de. Biologia da reprodução de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora*. **Revista Verde**, Limoeiro, v. 6, n. 2, p. 1-7, 2011.

MIRANDA, J. M.; PERECIN, D.; PEREIRA, A. A. Produtividade e resistência à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk, et Br.) de progênies F5 de Catuaí amarelo com híbrido de timor. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1195-1200, nov./dez. 2005.

MISHRA, M. K. et al. Genome organization in coffee as revealed by EST PCR-RFLP, SNPs and SSR analysis. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, London, v. 14, n. 1, p. 25-37, Mar. 2011.

MISSIAGGIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 1, p. 72-78, 2006.

MISSIO, R. F. et al. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 573-581, 2009.

_____. Genetic characterization of an elite coffee germplasm assessed by gSSR and EST-SSR markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 2366-2381, 2011.

MONTAGNON, C.; CUBRY, P.; LEROY, T. Amélioration génétique du caféier *Coffea canephora* Pierre: connaissances acquises, stratégies et perspectives. **Cahiers Agricultures**, Madrid, v. 21, n. 2/3, p. 143-153, 2012.

MONTAGNON, C.; LEROY, T.; ESKE, A. B. Amélioration variétale de *Coffea canephora* I: critères et méthodes de sélection. **Plantations, Recherche, Développement**, Paris, v. 5, n. 1, p. 18-33, 1998.

MONTAGNON, C.; LEROY, T.; YAPO, A. B. Diversité génotypique et phénotypique de quelques groupes de caféiers (*Coffea canephora* Pierre) en collection: conséquences sur leur utilisation en sélection. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 36, n. 3, p. 187-198, 1992.

MORAIS, T. P. de; MELO B. de. Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 753-760, 2011.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

NEILAN, B. A.; WILTON, A. N.; JACOBS, D. A universal procedure for primer labeling of amplicons. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 14, p. 2938-2939, 1997.

NETTANCOURT, D. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 10, n. 4, p. 185-199, 1997.

OROZCO-CATILLO, C. et al. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, n. 8, p. 934-940, 1994.

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

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlex 6.5: genetics analysis in Excel: population genetic software for teaching and research: an update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

PEREIRA, G. S. et al. Microsatellite markers in analysis of resistance to coffee leaf miner in Arabica coffee. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1650-1656, dez. 2011.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 1, p. 101-108, 2005.

_____. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 6, p. 1307-1314, 2004.

PINTO, F. O. et al. Study of simple sequence repeat markers from coffee expressed sequences associated to leaf miner resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 377-384, mar. 2007.

PLECHAKOVA, O. et al. MoccaDB: an integrative database for functional, comparative and diversity studies in the Rubiaceae family. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 123-125, Sept. 2009.

PONCET, V. et al. Development of genomic microsatellite markers in *Coffea canephora* and their transferability to other coffee species. **Genome**, Ottawa, v. 50, n. 12, p. 1156-1161, 2007.

_____. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). **Genome**, Ottawa, v. 47, n. 6, p. 1071-1081, 2004.

_____. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 276, n. 5, p. 436-449, 2006.

PRAKASH, N. S. et al. 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**, Dordrecht, v. 52, n. 3, p. 333-343, 2005.

PRAXEDES, S. C. et al. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 56, n. 3, p. 263-273, 2006.

PRIYONO, B. F. et al. Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 4, p. 343-357, 2010.

PRIYONO, B. F.; SUMIRAT, U. Mapping of Quantitative Trait Loci (QTLs) controlling cherry and green bean characters in the robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre). **Journal of Agricultural Science and Technology**, London, v. 2, n. 9, p. 1029-1039, Sept. 2012.

RESENDE, M. D. V. de et al. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento. **Brazilian Journal of Forestry Research**, Colombo, v. 56, n. 1, p. 63-77, 2008.

REZENDE, J. C. et al. **Biotecnologia em cafeeiro: biotecnologia aplicada à agropecuária**. Caldas: EPAMIG, 2012. 648 p.

ROVELLI, P. et al. Microsatellites in *Coffea arabica* L. In: SERA, T. et al. (Ed.). **Coffee biotechnology and quality**. London: Kluwer Academic, 2000. p. 123-133.

SANSALONI, C. P. **Desenvolvimento, caracterização e mapeamento de microssatélites de tetra e pentanucleotídeos em *Eucalyptus* spp.** 2008. 104 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SILVESTRINI, M. et al. Genetic diversity of a *Coffea* germplasm collection assessed by RAPD markers. **Genetic Resources Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, n. 6, p. 901-910, 2008.

STEIGER, D. L. et al. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 2/3, p. 209-215, 2002.

VIDAL, R. O. et al. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 154, n. 3, p. 1053-1066, 2010.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goytacases, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

_____. Development of microsatellite markers for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 507-514, 2010.

ANEXOS

Em anexo é possível observar os eletroferogramas obtidos pelas ampliações do *primer* Mg_360 para as estacas (1 até 8) propagadas a partir da planta de *C. canephora* suspeita de se reproduzir por autofecundação (Figura 12).

Os eletroferogramas obtidos com os pares de *primers* Mg_360, Mg_368, Mg_445, Mg_461, Mg_477, Mg_501, Mg_753 e Mg_779 para as plantas oriundas de sementes (semente 1 até 5) e a planta de referência (estaca 8) estão também demonstrados nas Figuras 13 até 20, respectivamente. As plantas que apresentaram alelos diferentes aos encontrados nas plantas obtidas por estaquia, quando analisados com os marcadores Mg_360, Mg_477 e Mg_779 estão identificados (com uma estrela) nas figuras (14, 18 e 21, respectivamente).

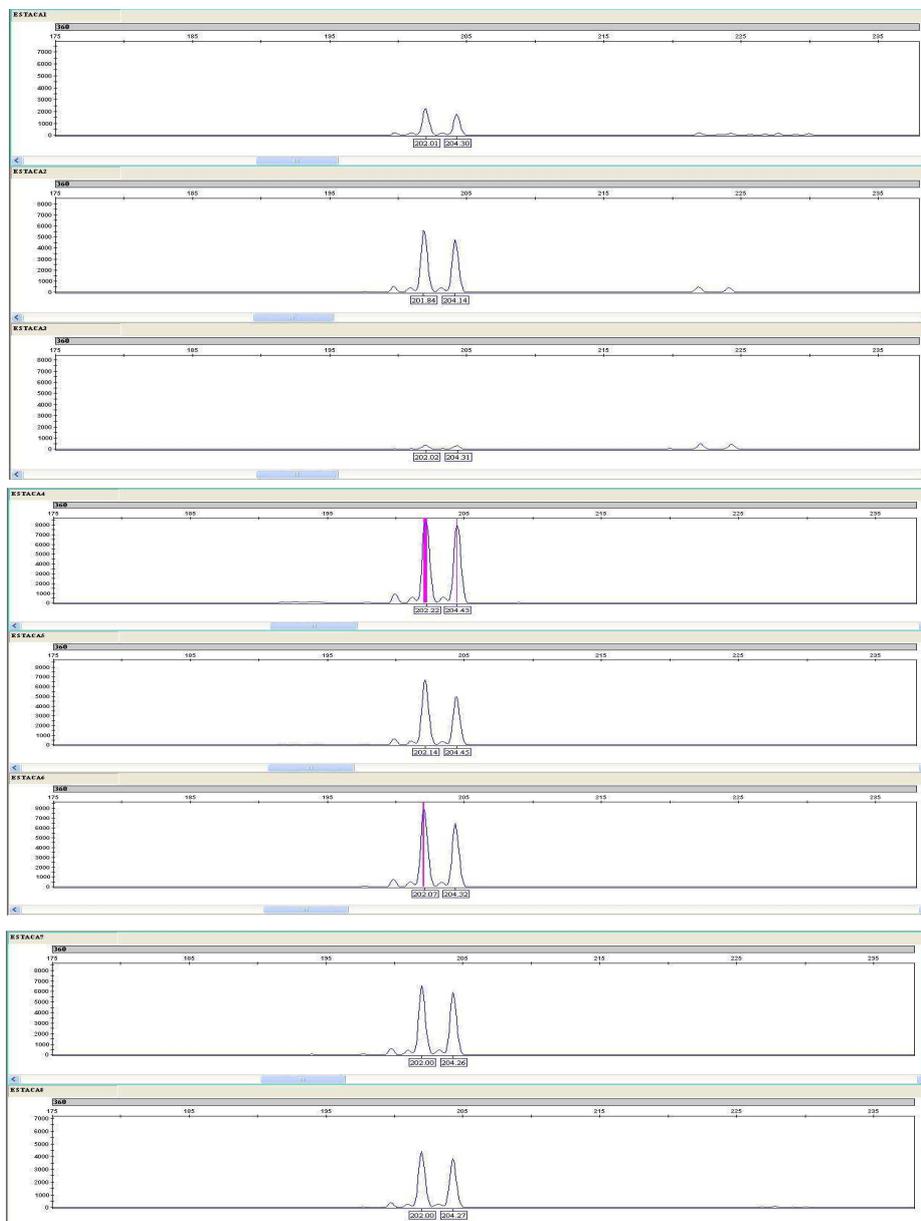


Figura 1 Eletroferograma obtido pela análise de fragmentos realizado em sequenciador automático ABI 3130xl, representando as 8 plantas (estaca 1 acima ate estaca 8 abaixo) obtidas por estaquia e amplificadas com o *primer* Mg_360

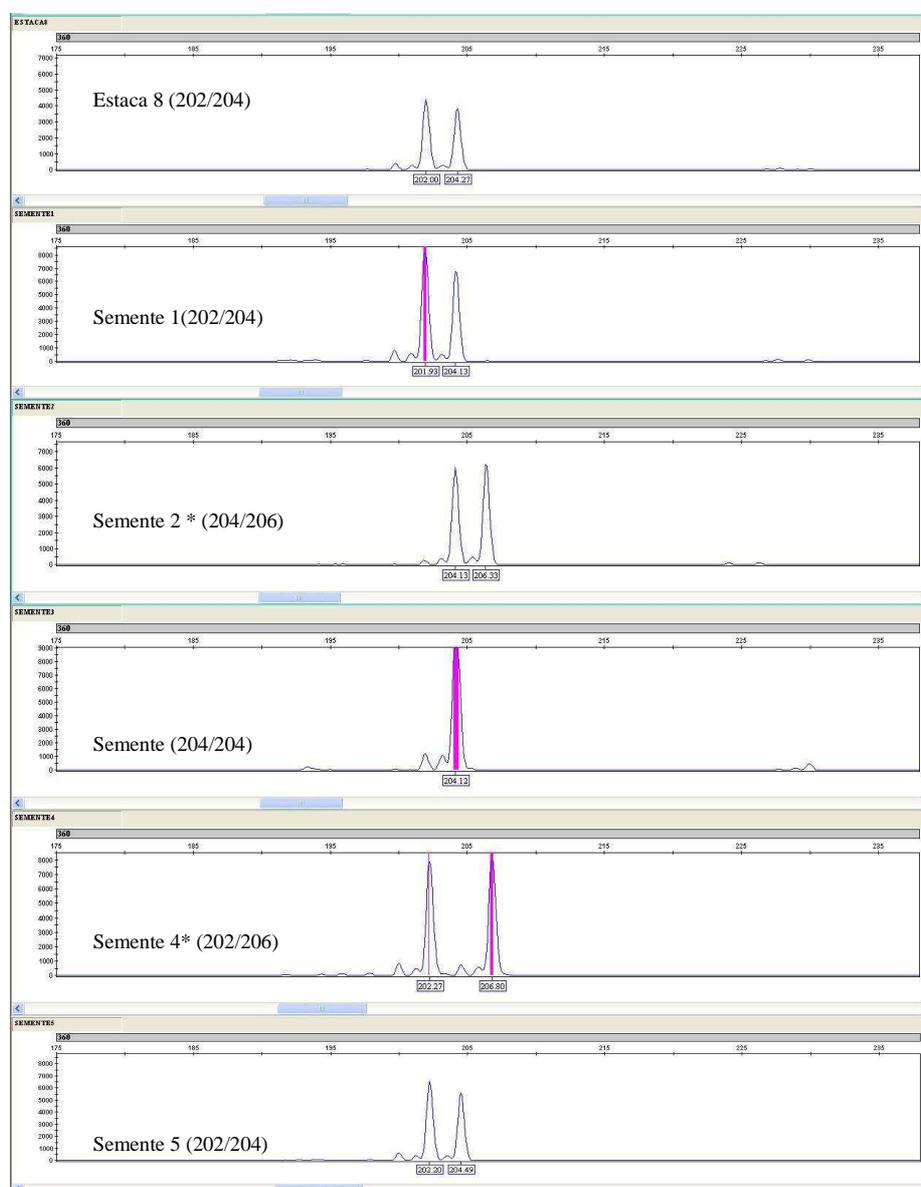


Figura 2 Perfil eletroforético da estaca 8 e todas as plantas oriundas de sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o *primer* MG_360

Nota: As sementes apresentando perfis diferentes da estaca 8 são identificadas com uma estrela (*).

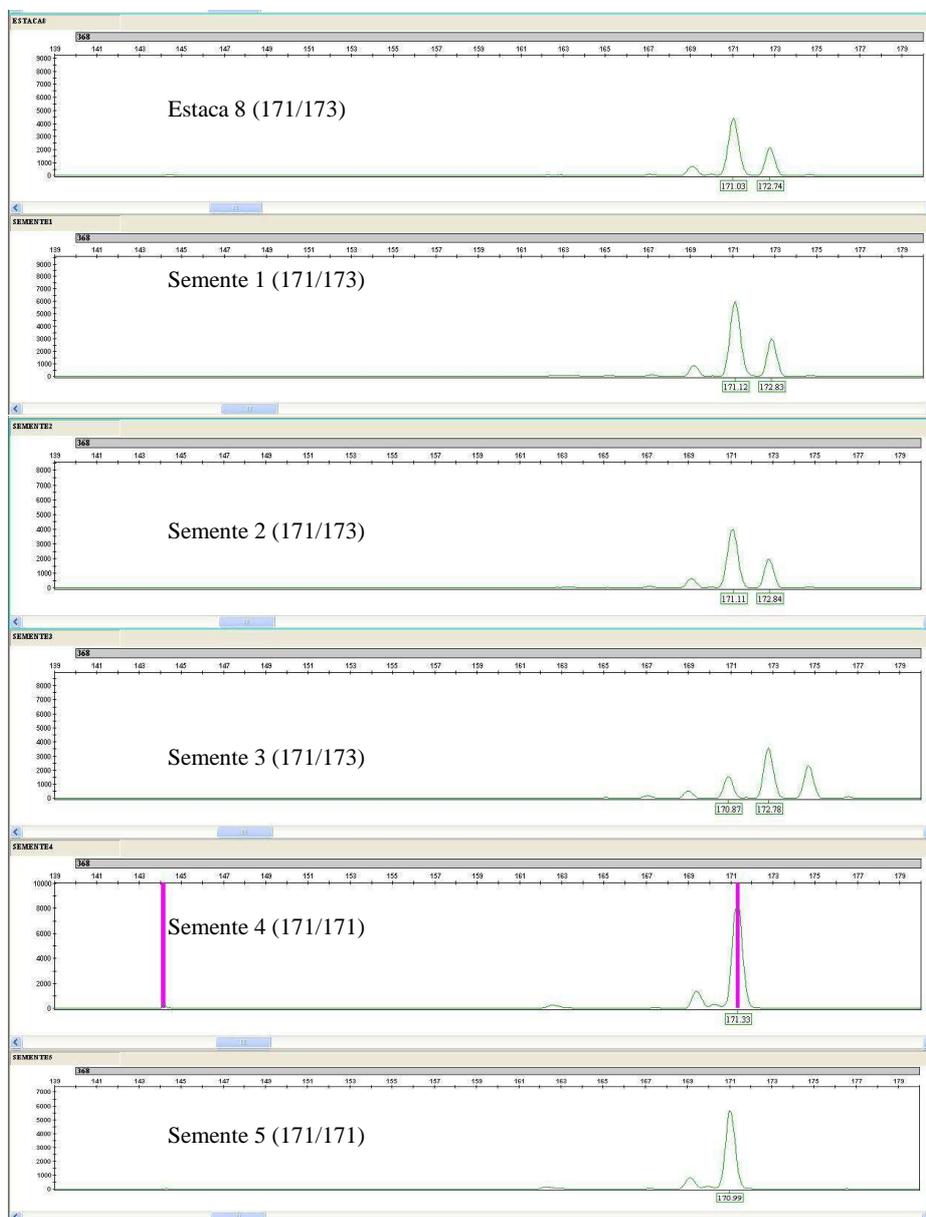


Figura 3 Perfil eletroforético da estaca 8 e de todas as plantas oriundo de sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o *primer* MG_368

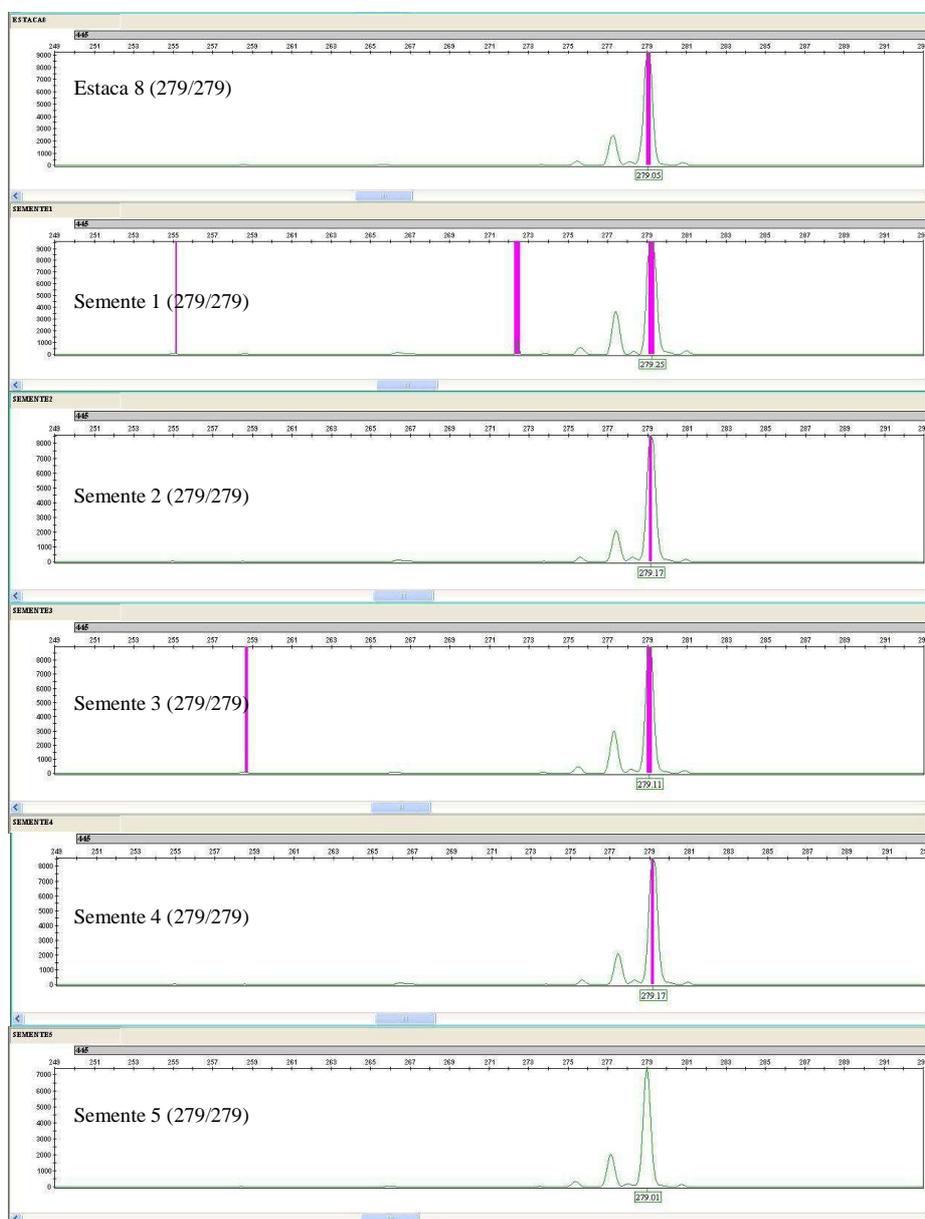


Figura 4 Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o *primer* MG_445

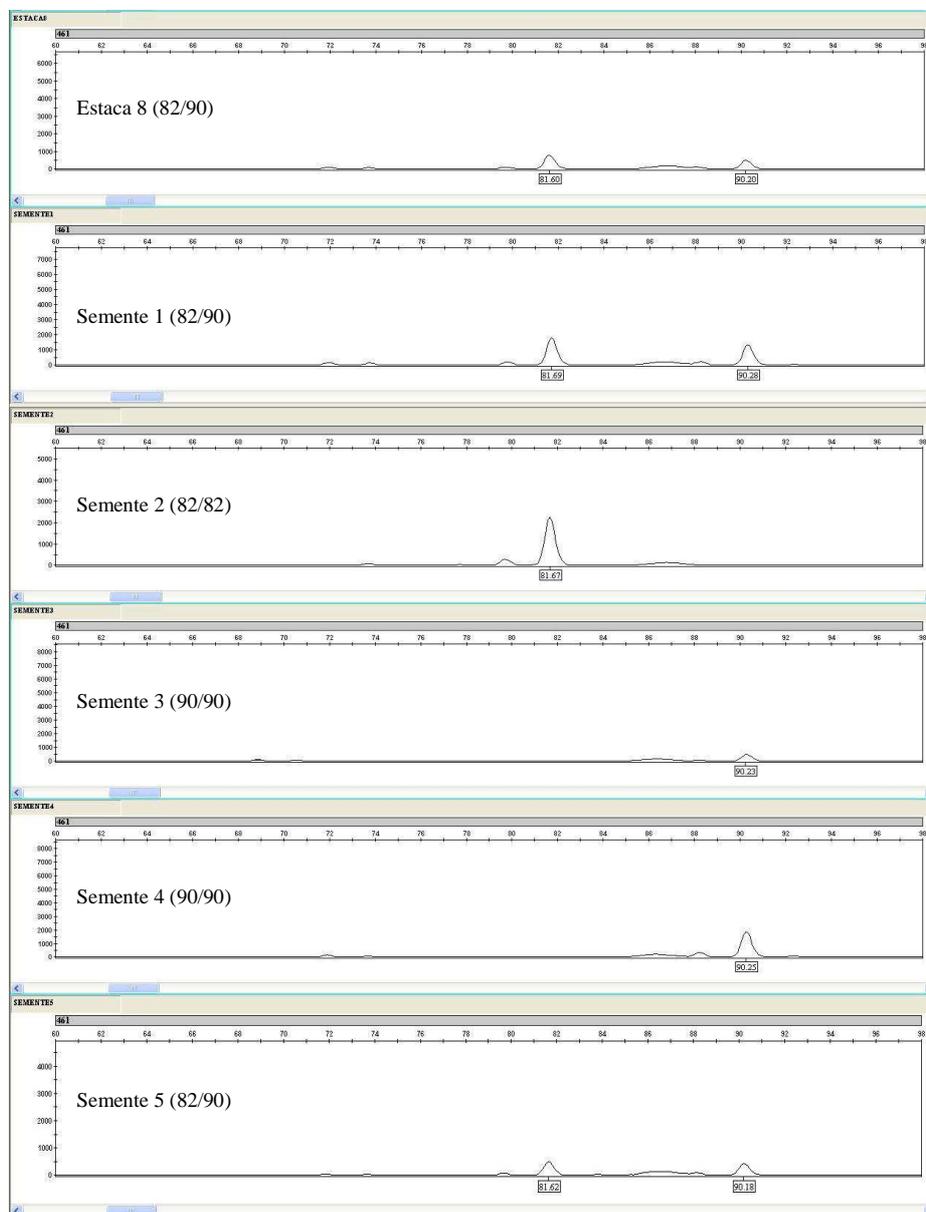


Figura 5 Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o *primer* MG_461

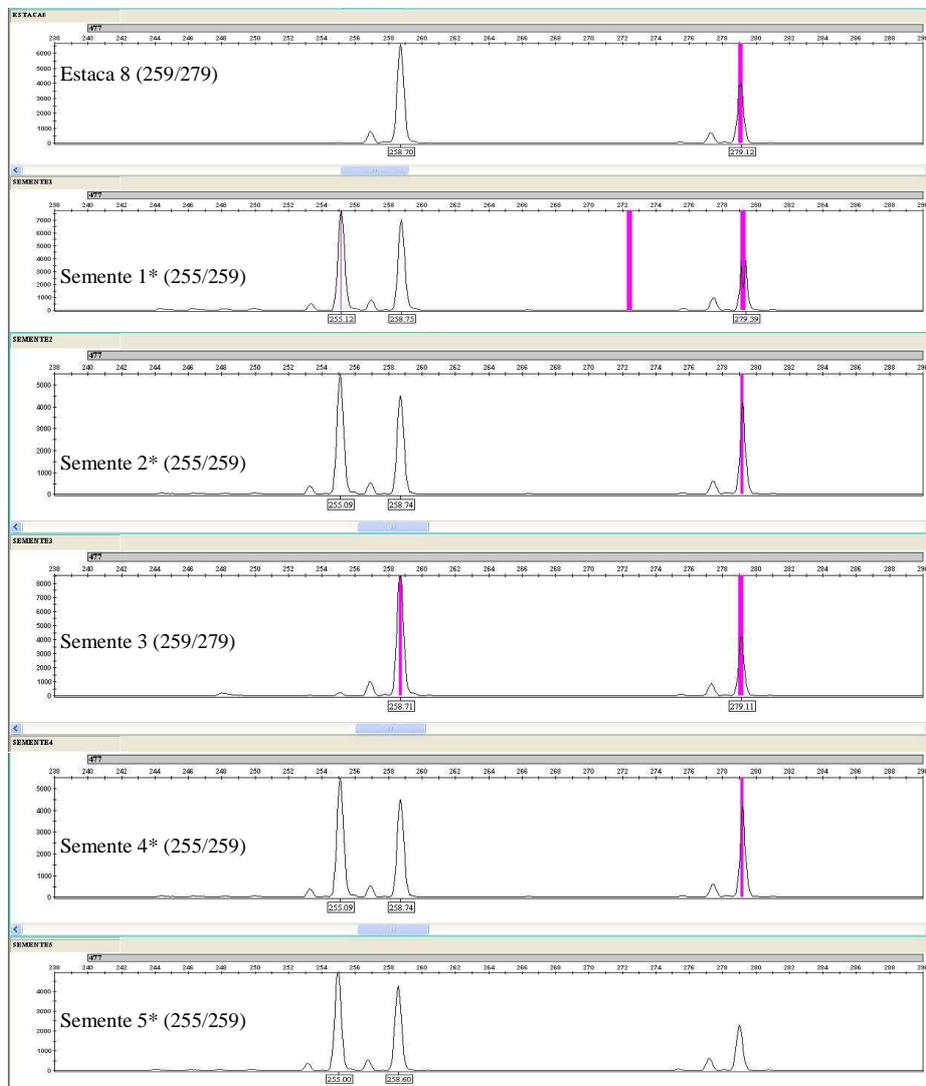


Figura 6 Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o *primer* MG_477

Nota: As sementes apresentando perfis diferentes da estaca 8 são identificadas com uma estrela (*).

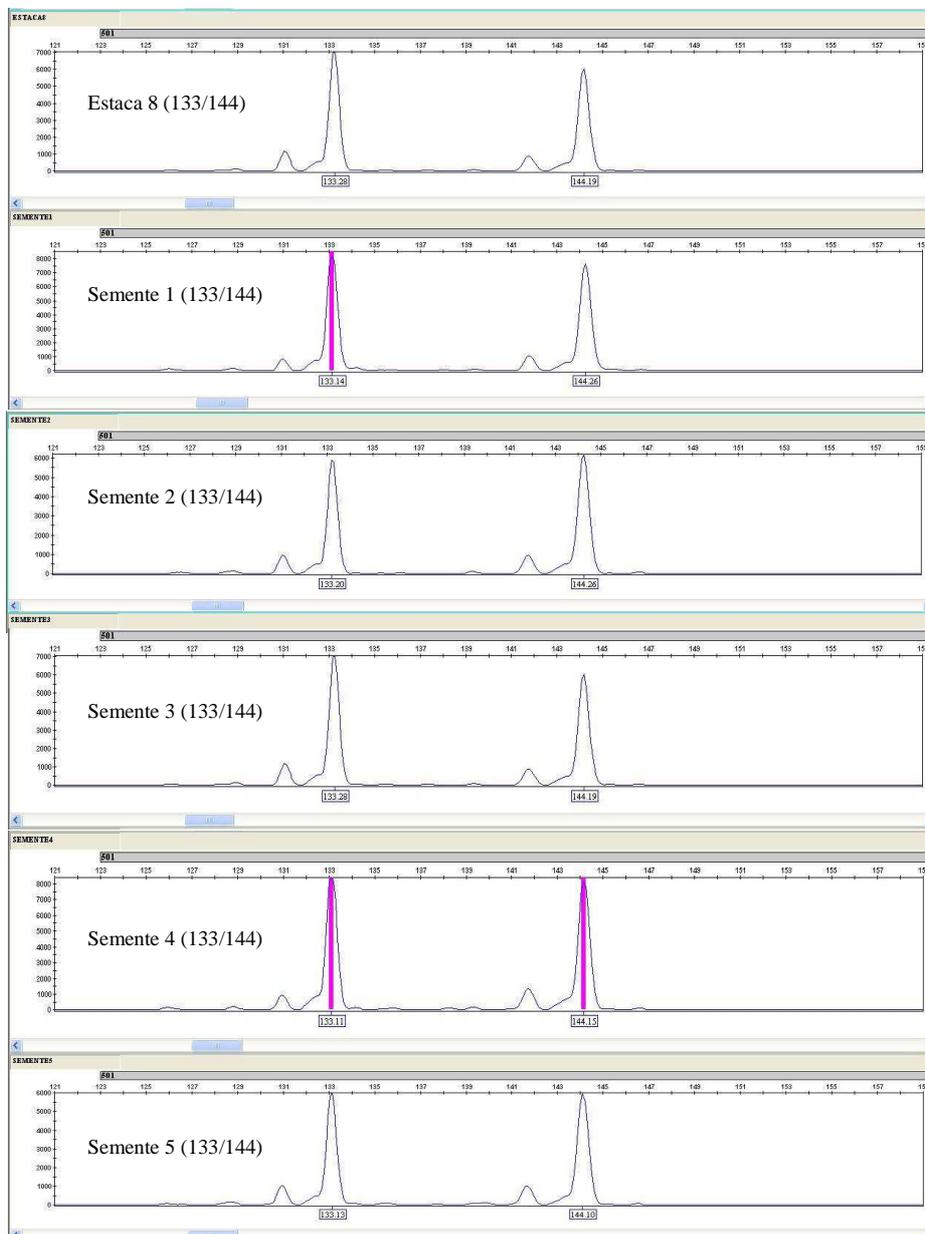


Figura 7 Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o *primer* MG_501

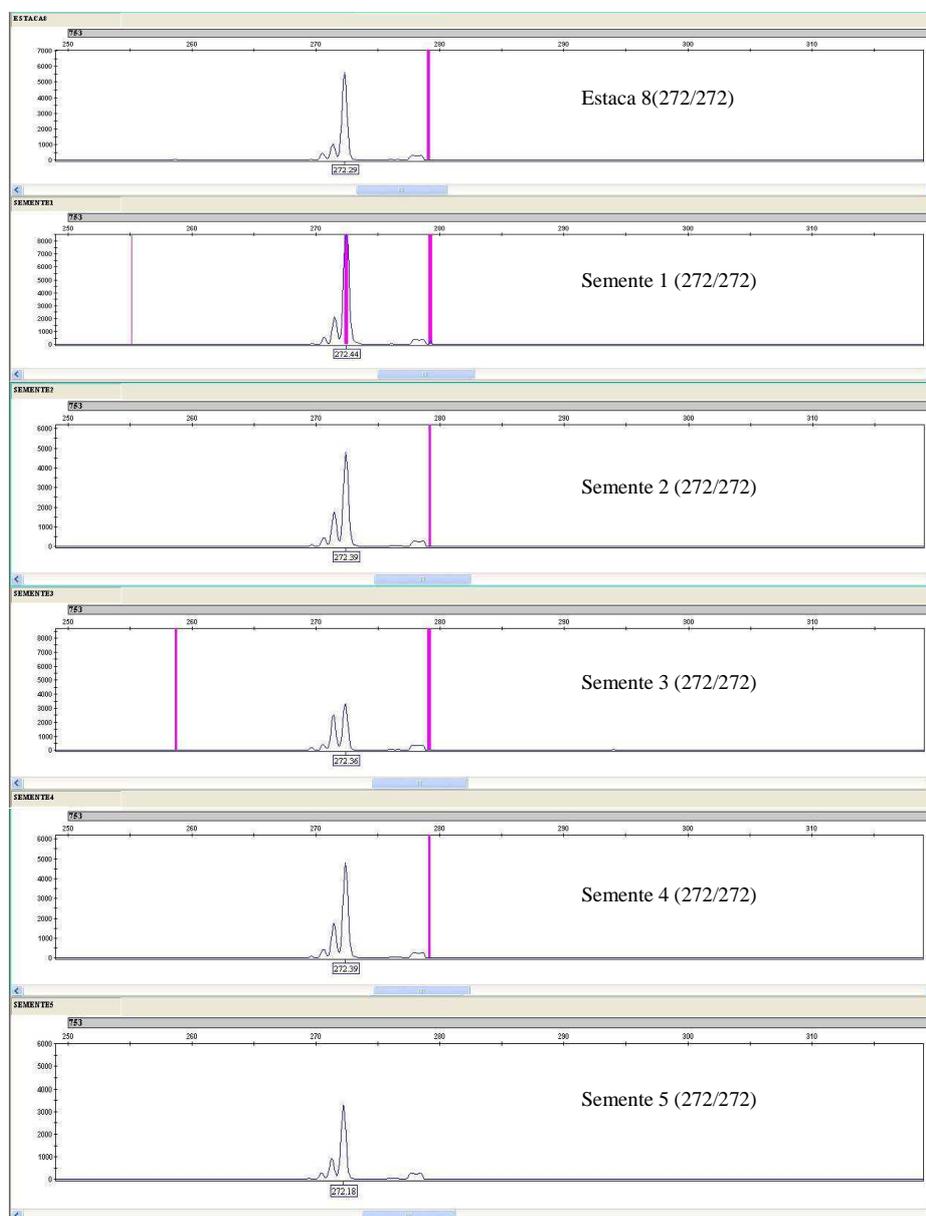


Figura 8 Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o *primer* MG_753

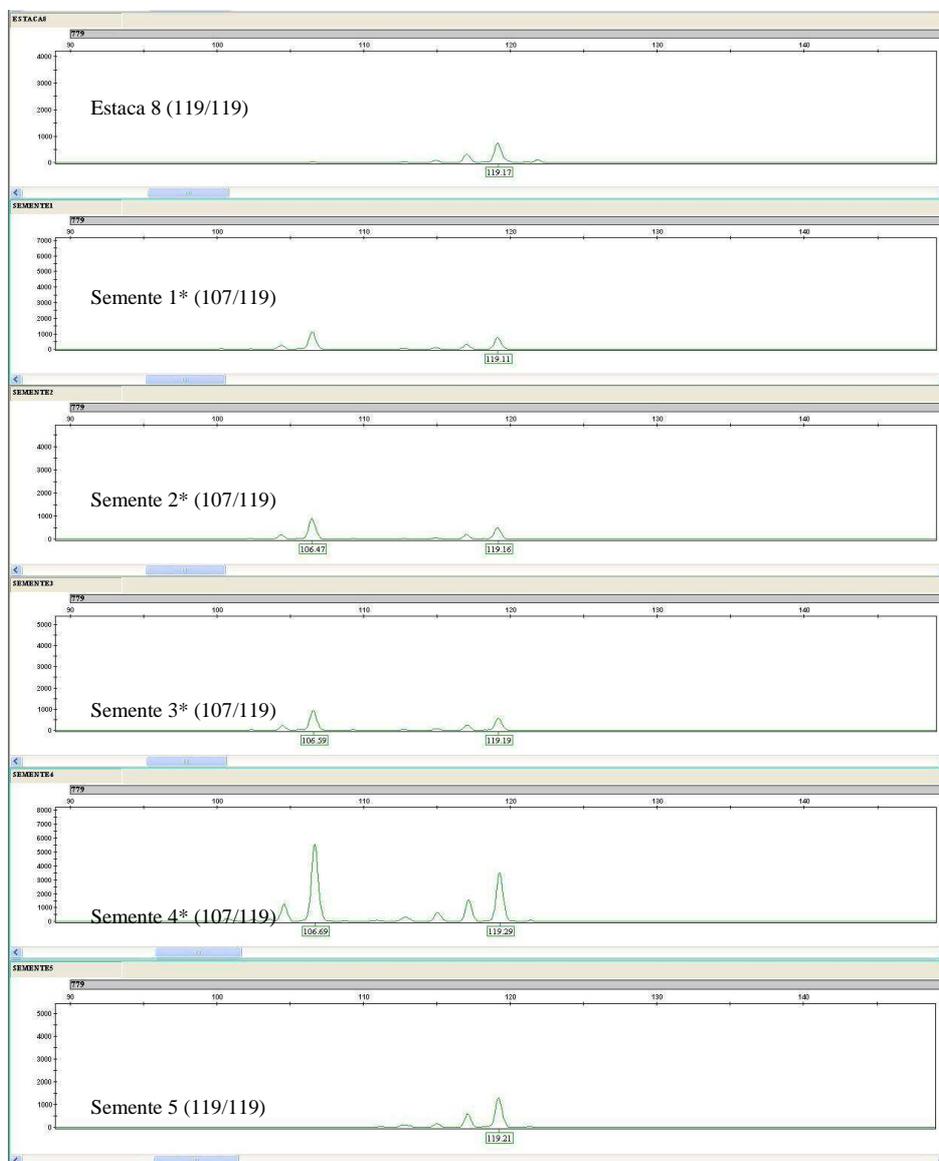


Figura 9 Perfil eletroforético da estaca 8 e todos representantes da plantas obtidas por sementes da planta com possível autofecundação amplificadas com o *primer* MG_779

Nota: As sementes apresentando perfis diferentes da estaca 8 são identificadas com uma estrela (*).