

AValiação de híBRIDOS F₁ DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) E RESPECTIVOS PROGENITORES COM MARCADORES RAPD¹

José Roberto Macedo Fontes²
Ney Sussumu Sakiyama²
Antônio Américo Cardoso²
Laércio Zambolim³
Antônio Alves Pereira⁴

RESUMO

Foi utilizado neste estudo uma população do programa de melhoramento do cafeeiro do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa descendente de cruzamentos entre linhagens de Catuaí (Vermelho e Amarelo) e seleções do Híbrido de Timor. Um estudo com marcadores RAPD foi realizado para avaliação de híbridos F₁ de café e respectivos progenitores. Analisaram-se 51 genótipos (10 progenitores Catuaí, 12 progenitores Híbrido de Timor e 29 híbridos F₁). Para a certificação da natureza híbrida de 12 híbridos F₁ estudados, a análise RAPD também foi utilizada. No estudo da diversidade genética, realizaram-se 157 reações, com 86 *primers*, tendo 53,5% deles apresentado polimorfismo, totalizando 108 bandas polimórficas, com média de 2,35 bandas polimórficas/*primer*. Dentre os *primers* que apresentaram maior número de bandas polimórficas estão: OPA-8, OPC-10, OPA-5 e OPA-10. Com um limite de dissimilaridade genética de 54%, o Híbrido de Timor UFV 427-15 permaneceu no grupo dos cultivares Catuaí. Dos 12 genótipos mais produtivos na geração F₁, 11 tiveram sua natureza híbrida confirmada. Marcadores RAPD foram eficientes na avaliação de diversidade genética em *C. arabica* e na certificação da natureza híbrida de materiais genéticos obtidos por cruzamentos artificiais.

Palavras-chaves: diversidade genética, melhoramento genético.

¹ Aceito para publicação em 26.04.2002.

² Departamento de Fitotecnia. Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.
E-mail: sakiyama@mail.ufv.br

³ Departamento de Fitopatologia. Universidade federal de Viçosa. E-mail: zambolim@ufv.br

⁴ EPAMIG. Vila Gianneti, 47. 36570-000 Viçosa, MG.

ABSTRACT

EVALUATION OF F₁ COFFEE HYBRIDS (*Coffea arabica* L.) AND THEIR RESPECTIVE PROGENITORS WITH RAPD MARKERS

This study used a population owned by the coffee breeding program of the Plant Pathology Department of the Federal University of Viçosa, descendant of crossings between ancestries of Catuaí with red and yellow berries and Timor Hybrid selections. RAPD markers were used to evaluate the F₁ coffee hybrids and their respective progenitors. To study the genetic diversity, 51 genotypes were analyzed (10 Catuaí ancestors, 12 Timor Hybrid ancestors and 29 hybrids F₁). To determine the hybrid nature of the 12 F₁ genotypes, the RAPD analysis was used. In the study of genetic diversity, a total of 157 reactions, with 86 primers were carried out, with 53.5% of them presenting polymorphic bands, totalizing 108 with an average of 2.35 polymorphic bands/primer. The primers presenting the greatest number of polymorphic bands were: OPA-8, OPC-10, OPA-5 and OPA-10. Limited to a genetic distance of 54%, the Timor Hybrid UFV 427-15 remained in the group of Catuaí. Eleven of the twelve more productive genotypes in the generation F₁ confirmed their hybrid nature. RAPD markers were efficient to evaluate the genetic diversity in *C. arabica*, and to certify the hybrid condition of the genetic materials obtained by artificial crosses.

Key words: genetic diversity, coffee breeding.

INTRODUÇÃO

Os marcadores de DNA são, em vários aspectos, muito superiores aos marcadores genéticos clássicos, por apresentarem herança mendeliana simples, ausência de efeitos de epistasia e resultarem de estudos com o próprio DNA (genótipo) e não com seus produtos (fenótipos), apresentando resultados experimentais consistentes, independentemente das condições de ambiente, do órgão ou do estágio de desenvolvimento das plantas amostradas. As avaliações com marcadores de DNA podem, por exemplo, ser realizadas em estádios iniciais de desenvolvimento da planta ou até mesmo na semente, apresentando resultados idênticos aos que seriam obtidos na fase adulta. Considerando que o café é uma cultura perene, de ciclo longo e que o melhoramento é efetuado ao longo de várias gerações de autofecundações ou retrocruzamentos, com avaliações em várias safras numa mesma geração, o desenvolvimento de variedades melhoradas é bastante demorado. Além disso, os genótipos a serem comparados muitas vezes podem ter idades diferentes e estarem localizados em ambientes distintos e, mesmo assim, os resultados de marcadores podem ser comparados; sobretudo os marcadores de DNA, que podem ser obtidos em grande número (milhares), possibilitando a obtenção de *fingerprinting* detalhado, útil para o estudo de diversidade genética, mapeamento genético, ligação gênica, programas de melhoramento que utilizam o retrocruzamento, entre outros. Desta forma, a incorporação de

técnicas avançadas de biotecnologia aos métodos tradicionais de melhoramento poderá ser de grande valia para o melhoramento do cafeeiro (2, 9, 11, 12, 15, 18, 19).

A utilização de marcadores moleculares em café tem dado grandes contribuições aos estudos sobre a caracterização, análise e utilização de recursos genéticos desta cultura (6, 7, 8). Dentre os marcadores moleculares de DNA, a técnica de polimorfismo de segmentos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) é uma das opções disponíveis (4). Orozco-Castillo et al. (10) concluíram que os marcadores RAPD são eficientes na obtenção de *fingerprinting* de acessos de café, sendo muito útil nos estudos de variabilidade, identificação de acessos duplicados em coleções, estabelecimento de *core collection* e melhoramento por retrocruzamento assistido por marcadores.

No Brasil, paralelamente aos programas de melhoramento do cafeeiro, foram implantados bancos de germoplasma em instituições como o IAC, UFV e IAPAR, com o objetivo de coletar, caracterizar e conservar o máximo de variabilidade genética, fundamental para o sucesso dos referidos programas. O banco de germoplasma da UFV/EPAMIG foi implantado a partir da década de 70 e está atualmente em fase de reorganização, possuindo um programa de pesquisa, em andamento, visando à caracterização da variabilidade genética por meio de marcadores de DNA.

A UFV/EPAMIG possui, em andamento, um programa de melhoramento visando resistência à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). Com a utilização das técnicas de marcadores de DNA, será possível identificar rapidamente plantas geneticamente superiores em cada geração, reduzindo, assim, o tempo necessário para a obtenção de linhagens melhoradas, além de diminuir o tamanho da população a ser conduzida em cada geração. Estudos recentes têm demonstrado que os marcadores de DNA podem ser de grande valor para caracterização, análise e utilização de recursos genéticos de café (8, 10, 16, 17). Assim sendo, o uso de marcadores de DNA pode facilitar a avaliação da diversidade genética entre os acessos de café e auxiliar na escolha de progenitores dos programas de melhoramento por hibridação, possibilitando a obtenção de novos cultivares resistentes à ferrugem num menor período de tempo.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética presente entre vários acessos do Híbrido de Timor e do Catuaí, pertencentes ao programa de melhoramento do cafeeiro da UFV/EPAMIG, e a certificação da natureza híbrida dos genótipos F₁ resultantes de seus cruzamentos, por meio da técnica RAPD, visando à seleção de híbridos para futuros testes de resistência a doenças e mapeamento dos genes de interesse.

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado neste trabalho faz parte do banco de germoplasma do programa de melhoramento do cafeeiro do Departamento de Fitopatologia da UFV. Os progenitores Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo que participaram dos cruzamentos fazem parte do grupo de linhagens avaliado desde 1978 pela UFV e EPAMIG.

Realizou-se um estudo da diversidade genética de 51 genótipos: 10 progenitores Catuaí, 12 progenitores Híbrido de Timor e 29 híbridos resultantes de diferentes combinações entre Catuaí e Híbrido de Timor, na geração F₁ (Quadro 1). Foram utilizadas informações de marcadores moleculares RAPD para a obtenção das medidas de dissimilaridade, expressas pelo complemento aritmético do índice de Jaccard. Foram realizadas 157 reações, com 86 *primers*.

| QUADRO 1 – Lista dos 51 genótipos de café estudados | | |
|---|-------------------------|-----------------------------|
| Catuaí | Híbrido de Timor | Híbridos F ₁ |
| UFV 2143-193, | UFV 376-2, UFV 427-15, | H 332-1, H 332-3, H 332-5, |
| UFV 2143-235, | UFV 435-1, UFV 438-52, | H 332-6, H 341-11, H 342-1, |
| UFV 2143-236, | UFV 439-2, UFV 440-22, | H 342-2, H 342-5, H 342-7, |
| UFV 2144-32, | UFV 441-1, UFV 442-108, | H 342-8, H 348-2, H 348-3, |
| UFV 2144-35, | UFV 443-3, UFV 445-46, | H 348-4, H 348-7, H 348-9, |
| UFV 2144-36, | UFV 446-8, UFV 529 | H 415-1, H 415-2, H 415-4, |
| UFV 2144-260, | | H 418-6, H 419-8, H 419-10, |
| UFV 2145-79, | | H 421-5, H 427-2, H 429-1, |
| UFV 2145-113, | | H 430-1, H 505-9, H 506-3, |
| UFV 2148-57 | | H 511-1, H 513-5 |

Para a certificação da natureza híbrida dos genótipos mais produtivos na geração F₁ foram também utilizadas informações de marcadores moleculares RAPD. Empregaram-se 30 *primers*, sendo escolhidos os 12 melhores quanto à nitidez das bandas de DNA obtidas. São eles: OPA-4; OPA-8; OPA-10; OPA-16; OPA-17; OPB-19; OPB-20; OPC-9; OPC-10; OPC-13; OPF-2; e OPG-6.

Para extração do DNA, foi seguido um protocolo semelhante ao usado por Silva (14). Imediatamente após a colheita das folhas, estas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, num gral de porcelana, para romper as paredes e membranas celulares do tecido fresco. Em seguida, foi realizada a ressuspensão do tecido vegetal em 800 µl do tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4M; detergente catiônico CTAB (brometo de amônio trimetilhexadecil catiônico) 1%; β-mercaptoetanol 0,2%; e PVP (polivinilpirrolidone) 1,5%), previamente

aquecido a 65°C, visando à solubilização de membranas lipoprotéicas e desnaturação de proteínas enquanto o DNA é protegido da ação de enzimas de degradação. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65°C, por uma hora, sendo levemente agitadas a cada 10 min. Após serem resfriadas à temperatura ambiente, foram centrifugadas em microcentrífuga DUPONT (Sorvall MC 12V), a 12.000 rpm, por 5 min.

O sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde foram adicionados 650 µl do solvente orgânico clorofórmio:álcool isoamílico, numa proporção de 24:1, e misturado suavemente, por 10 min, até a formação de emulsão uniforme. A fase orgânica inferior (lipídios, proteínas e a maioria dos polissacarídios) foi, então, separada da fase aquosa superior (DNA, RNA e alguns polissacarídios) por centrifugação (10 min a 12.000 rpm). A fase aquosa foi transferida para novo tubo.

O processo de desproteinização foi executado apenas uma vez. Na etapa seguinte, foram adicionados 800 µl de isopropanol para precipitação do DNA/RNA. Após homogeneização, as amostras foram mantidas durante a noite a -20°C. No dia seguinte, foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 minutos, e o sobrenadante eliminado, permanecendo o precipitado no fundo do tubo. Em seguida, as amostras de DNA foram lavadas com adição de 300 µl de etanol 70% e, posteriormente, com adição de 300 µl de etanol 95%. Depois de centrifugadas, as amostras de DNA foram secas à temperatura ambiente, por 15-20 min, ressuspendidas em 300 µl de TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), com 3 µl de RNase 10 µg/ml, e incubadas a 37°C, por 1 hora, e a 65°C, por 5 min. As amostras foram centrifugadas e acrescidas de 600 µl de acetato de sódio 3M e 500 µl de isopropanol, permanecendo a -20 °C, por duas horas, e novamente centrifugadas. Após descartar o sobrenadante, foram novamente lavadas com etanol 70 e 95% e secas à temperatura ambiente por quatro horas, e o DNA foi ressuspendido com 300 µl de TE, com aquecimento, por 5 min, a 65°C. Ao final, as amostras foram armazenadas em geladeira a 4 °C.

A concentração de DNA foi determinada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm. Foi também realizada a leitura a 280 nm para se ter uma idéia da contaminação da amostra com proteínas. Além disso, fez-se a verificação da integridade do DNA por meio de eletroforese em gel de agarose 1,4%. As amostras foram diluídas para uma concentração de trabalho de 10 ng/µl.

A amplificação de fragmentos de DNA foi realizada em termociclador PERKIN ELMER 9600, seguindo o protocolo para o ensaio RAPD, utilizando um programa composto por quatro etapas: primeira - um ciclo de 1 min a 95°C; segunda - 39 ciclos de 15 s. a 94°C, 30 s. a 35°C e 1 min a 72°C; terceira - um ciclo de 15 s. a 94 °C, 30 s. a 35°C e 7 min a 72°C; quarta - resfriamento a 4°C. Foram utilizados 119 *primers* de 10

bases da "Operon Technologies" (OP). Cada reação de 25 µl possuiu 2,5 µl de KCl 50 mM; 2,5 µl de Tris-HCl 10 mM; 2 µl de MgCl₂ 2 mM; 1,25 µl de dNTPs 100 µM (contendo os desoxirribonucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 1 µl de *primer* 0,2 µM (oligonucleotídeo iniciador); 1 U de Taq DNA polimerase; 25 ng de DNA; e o volume completado com água ultrapura.

A análise dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,4%, a 100V, por quatro horas, em média. Após eletroforese, o gel foi colocado em solução diluída de brometo de etídio (1 µg/ml), por 20 min, para coloração, e em água, por 40 min, para descoloração. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas, utilizando-se o aparelho EAGLE EYE D55.

Os dados foram tabulados considerando a presença (1) ou ausência (0) das bandas amplificadas (reprodutíveis e mais intensas), originando uma matriz que foi usada para calcular as distâncias genéticas. Utilizando-se o Programa GENES (3), estes dados foram submetidos à análise. Estimou-se o grau de dissimilaridade genética pelo complemento aritmético do índice de Jaccard. A partir da matriz de dissimilaridade genética, utilizando o método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*), fez-se o dendrograma das relações entre os genótipos avaliados, resultando nos grupos de genótipos e suas respectivas distâncias genéticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões de bandas (presença e ausência) foram utilizados para determinar o grau de dissimilaridade genética entre os genótipos estudados. Foram empregados, neste trabalho, 86 *primers*, dos quais 46, ou seja, 53,5%, evidenciaram polimorfismo. Obtiveram-se 108 bandas polimórficas (média de 2,35 bandas polimórficas/*primer*).

Dentre os *primers* que apresentaram maior número de bandas polimórficas encontram-se o OPA-8, OPC-10, OPA-5 e OPA-10 com nove, seis, cinco e cinco bandas polimórficas, respectivamente.

A matriz de distâncias genéticas revelou a existência de distâncias reduzidas (até 0%), por exemplo: entre os genótipos de Catuaí UFV 2144-32 e UFV 2143-193, Híbrido de Timor UFV 435-1 e planta híbrida F₁ H332-1, plantas híbridas H 332-3 e H 342-5, e H 342-7 e H 342-2. No entanto, grandes distâncias também foram observadas entre os genótipos de Catuaí, UFV 2143-235, UFV 2144-260, UFV 2145-79, UFV 2145-113 e UFV 2148-57, e vários plantas híbridas F₁ e entre a planta H 513-5 e várias outras.

Como pode ser visto no dendrograma da Figura 1, considerando um valor de 74% de dissimilaridade, dois grupos de genótipos se distinguem: grupo A, com 15 genótipos (14 híbridos F₁ e 1 Híbrido de Timor), e grupo B, com os outros 36 genótipos restantes.

Considerando o limite de 60% de dissimilaridade genética como nível de corte, um terceiro grupo é formado pela divisão do grupo B. Este grupo é formado apenas por um genótipo, a planta H 513-5.

Se o limite de dissimilaridade genética for reduzido para 54%, o grupo B passa a apresentar três subgrupos. O primeiro formado pela planta H 513-5, o segundo por 23 genótipos (13 híbridos F₁ e 10 Híbridos de Timor) e o terceiro por 12 genótipos (10 de Catuaí, 1 Híbrido de Timor e 1 híbrido F₁).

No terceiro subgrupo encontram-se todos os progenitores Catuaí estudados e também o Híbrido de Timor UFV 427-15. Segundo Pereira (13), o Híbrido de Timor UFV 427-15 apresenta apenas um gene dominante segregante conferindo resistência à ferrugem. Pelas avaliações realizadas no campo, este genótipo já vem apresentando, há algum tempo, sintomas de suscetibilidade à ferrugem do cafeeiro. Além disso, foi também observado que o fenótipo do UFV 427-15 se assemelha muito ao fenótipo de *C. arabica*.

Se for considerado um limite de 44% de dissimilaridade genética, haverá uma subdivisão em nove subgrupos, sendo quatro deles originados do grupo A e os outros cinco do grupo B. Neste aparece o primeiro subgrupo formado pela planta H 513-5; o segundo pela planta híbrida H 341-11 e o Híbrido de Timor UFV 529; o terceiro por oito Híbridos de Timor; o quarto por 12 híbridos F₁ e um Híbrido de Timor (UFV 376-2); e o quinto pelos 10 Catuaí (todos), o Híbrido de Timor UFV 427-15 e a planta H 415-2.

Ao confrontar as distâncias genéticas no presente trabalho com dados de campo dos 51 genótipos estudados (5), observa-se que o grupo dos híbridos F₁ mais produtivos, que apresentaram também elevada heterose, situa-se numa posição intermediária aos dois grupos em que estão os seus progenitores (grupo dos Catuaí e grupo dos Híbridos de Timor) e que o grupo dos híbridos menos produtivos localiza-se à esquerda do grupo dos Híbridos de Timor.

Lashermes et al. (8), por meio da análise da diversidade genética pela técnica RAPD, evidenciaram uma base genética estreita entre cultivares comerciais (três Typica e três Bourbon) e larga entre outros acessos da Etiópia e Quênia.

O Híbrido de Timor UFV 529 no limite de 49% de dissimilaridade já se situa fora do grupo formado pelos outros acessos do Híbrido de Timor. Este genótipo corresponde ao CIFC 832/1, um dos descendentes do Híbrido de Timor pertencente ao grupo fisiológico A, resistente a todas as raças conhecidas do fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.

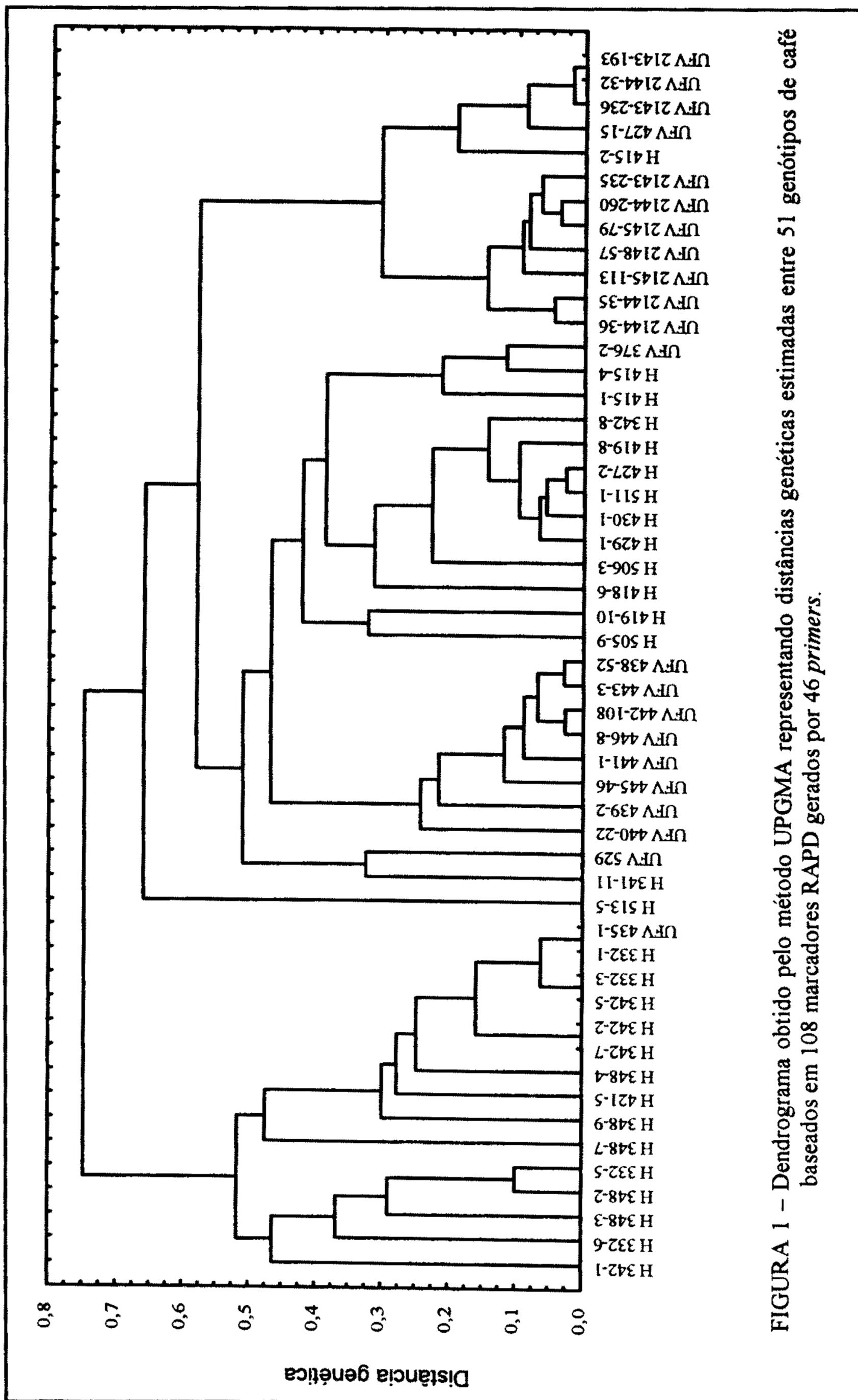


FIGURA 1 – Dendrograma obtido pelo método UPGMA representando distâncias genéticas estimadas entre 51 genótipos de café baseados em 108 marcadores RAPD gerados por 46 primers.

O baixo polimorfismo molecular observado em *C. arabica* por outros autores (1, 6, 8) está provavelmente relacionado à origem desta espécie. A busca da diversidade genética dentro da coleção do germoplasma arábica observado neste estudo e a realização de hibridações entre este germoplasma e deste com outros afins foram de vital importância na obtenção de genótipos superiores.

Foi realizado também um estudo para certificação da natureza híbrida de alguns genótipos F₁ estudados. Utilizaram-se 15 marcadores RAPD gerados por 12 *primers*, cujo polimorfismo caracterizou-se pela presença de banda no progenitor masculino e ausência no feminino. Foram estudados os 12 híbridos mais produtivos, segundo avaliações de campo realizadas por Fontes (5). Observou-se que 11 deles apresentaram bandas presentes também no progenitor masculino (Híbrido de Timor), confirmando a ocorrência de cruzamento e, portanto, atestando a natureza híbrida dos materiais estudados. Apenas um dos híbridos não mostrou as bandas polimórficas presentes no progenitor masculino; pelo contrário, o mesmo apresentou padrão de bandas semelhante ao do progenitor feminino (Catuaí).

Dentre aqueles que confirmaram a natureza híbrida estão as plantas H341-11, H342-8, H418-6, H419-8, H419-10, H427-2, H429-1, H430-1, H505-9, H506-3 e H511-1. Estas plantas apresentaram elevada heterose, confirmando o seu vigor híbrido (5).

A natureza híbrida da planta H 513-5 não foi confirmada pelos marcadores utilizados; não se pode, entretanto, concluir que esta planta tenha se originado por autofecundação do UFV 2148-57 (progenitor feminino – Catuaí), uma vez que ela, apesar de não apresentar as bandas polimórficas presentes nos outros híbridos e possuir padrão de banda similar ao progenitor feminino, permaneceu isolada dos grupos em que se encontram os progenitores Catuaí no estudo da diversidade genética (Figura 1). Logo, novos experimentos deverão ser realizados com a utilização de outros marcadores para verificação da real natureza híbrida da planta H 513-5.

A Figura 2 mostra uma das bandas polimórficas, obtida com o *primer* OPC-9, que atesta a natureza híbrida de 11 dos 12 híbridos estudados (do número 1 ao 11), pela presença de banda no híbrido F₁, ausência no progenitor feminino e presença no progenitor masculino. Apenas a planta híbrida H 513-5 (número 34) não seguiu o padrão dos outros híbridos (presença de banda no progenitor masculino e ausência no híbrido F₁ e progenitor feminino).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 B

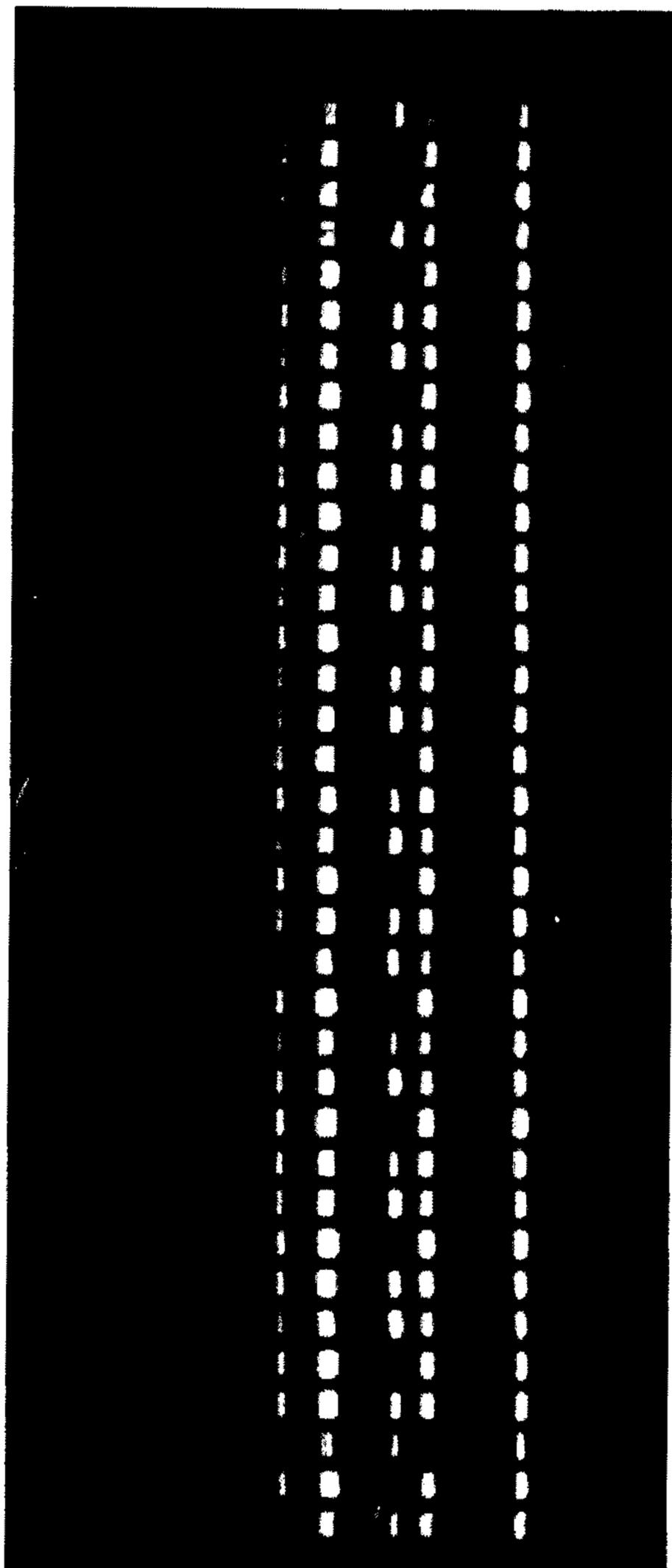


FIGURA 2 - Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido com o *primer* OPC-9 dos 12 melhores híbridos F_1 e seus respectivos progenitores (progenitor feminino Catuai e progenitor masculino Híbrido de Timor). A seta indica o polimorfismo mais evidente. A seqüência de genótipos (híbrido F_1 , progenitor feminino e progenitor masculino) partindo da esquerda é a seguinte: (1) H341-11, (2) UFV2144-35, (3) UFV435-1, (4) H342-8, (5) UFV2144-35, (6) UFV445-46, (7) H418-6, (8) UFV2143-235, (9) UFV443-3, (10) H419-8, (11) UFV2143-235, (12) UFV445-46, (13) H419-10, (14) UFV2143-235, (15) UFV445-46, (16) H427-2, (17) UFV2144-260, (18) UFV439-2, (19) H429-1, (20) UFV2145-113, (21) UFV441-1, (22) H430-1, (23) UFV2145-113, (24) UFV442-108, (25) H505-9, (26) UFV2145-79, (27) UFV438-52, (28) H506-3, (29) UFV2145-79, (30) UFV446-8, (31) H511-1, (32) UFV2148-57, (33) UFV443-3, (34) H513-5, (35) UFV2148-57, (36) UFV529 (= CIFC832/1) e (B) Branco.

CONCLUSÕES

1) O agrupamento com base em marcadores RAPD é consistente com as informações prévias sobre a genealogia do material estudado, possibilitando também a certificação da natureza híbrida dos materiais genéticos obtidos por cruzamentos artificiais.

2) No estudo da diversidade genética, os *primers* que apresentam maior número de bandas polimórficas são: OPA-8, OPC-10, OPA-5 e OPA-10.

3) Com um limite de dissimilaridade genética de 54%, o Híbrido de Timor UFV 427-15 permanece no grupo dos cultivares Catuaí.

4) Dos 12 genótipos mais produtivos na geração F₁, 11 têm sua natureza híbrida confirmada.

REFERÊNCIAS

1. ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P. & CHARRIER, A. La biologie moléculaire en appui à l'amélioration génétique du caféier Arabica. *Plantations, Recherche Développement*, 4:369-77, 1997.
2. BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F. & CARVALHO, F. I. F. de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciência Rural*, 27:513-20, 1997.
3. CRUZ, C. D. Programa GENES; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, UFV, 1997. 442p.
4. FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p. (Documento 20).
5. FONTES, J. R. M. Heterose, capacidade combinatória e divergência genética estimada por análise de marcadores RAPD em cruzamentos entre cafeeiros Catuaí (*Coffea arabica* L.) e Híbrido de Timor. Viçosa, UFV, 2001. 122p. (Tese de Doutorado).
6. LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; CROS, J.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F. & CHARRIER, A.. Origin and genetic diversity of *Coffea arabica* L. based on DNA molecular markers. In: Colloque Scientifique International Sur Le Café, 16^o, Kioto, 1995. Resumos, Paris, Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), 1995. p. 528-36.
7. LASHERMES, P.; CROS, J.; MARMEY, P. & CHARRIER, A.. Use of random amplified DNA markers to analyze genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 40:91-9, 1993.
8. LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBES, M. C. & CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica*, 87:59-64, 1996.
9. OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G. & BEAVIS, W. D.. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium on Analysis of Molecular Marker, Corvallis, 1994. Abstracts, Corvallis, ASHS/CSSA, 1994. p. 41-3.
10. OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K. J.; WAUGH, R. & POWELL, W.. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 87:934-40, 1994.

11. PARAN, I. & MICHELMORE, R. W.. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85:985-93, 1993.
12. PATERSON, A. H.; DEVERNA, J. W.; LANINI, B. & TANKSLEY, S. D.. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecies cross of tomato. *Genetics*, 124:735-42, 1990.
13. PEREIRA, A. A.. Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. Viçosa, UFV, 1995. 66p. (Tese de Doutorado).
14. SILVA, D. G. da. Levantamento de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* e resistência de clones de *Coffea canephora* var. Conillon à ferrugem. Viçosa, UFV, 2000. 67p. (Tese de Doutorado).
15. TANKSLEY, S.D.; MEDINA-FILHO, H. & RICK, C. M.. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity*, 49:11-25, 1982.
16. TEIXEIRA, A. T.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A. & SAKIYAMA, C. C. H. Characterization of *Coffea* species by RAPD markers. In: International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry, III, Londrina, 1999. Resumos, Londrina, UFPR/IAPAR/IRD, 1999. p. 82.
17. TEIXEIRA, A. T.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A. & SILVA, D. G. da. Fingerprinting of coffee tree differential hosts of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. In: International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry, III, Londrina, 1999. Resumos, Londrina, UFPR/IAPAR/IRD, 1999. p. 75.
18. WELSH, J.; HONEYCUTT, R. J.; McCLELLAND, M. & SOBRAL, B. W. S.. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theoretical and Applied Genetics*, 82:473-6, 1991.
19. WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 22:6531-5, 1990.