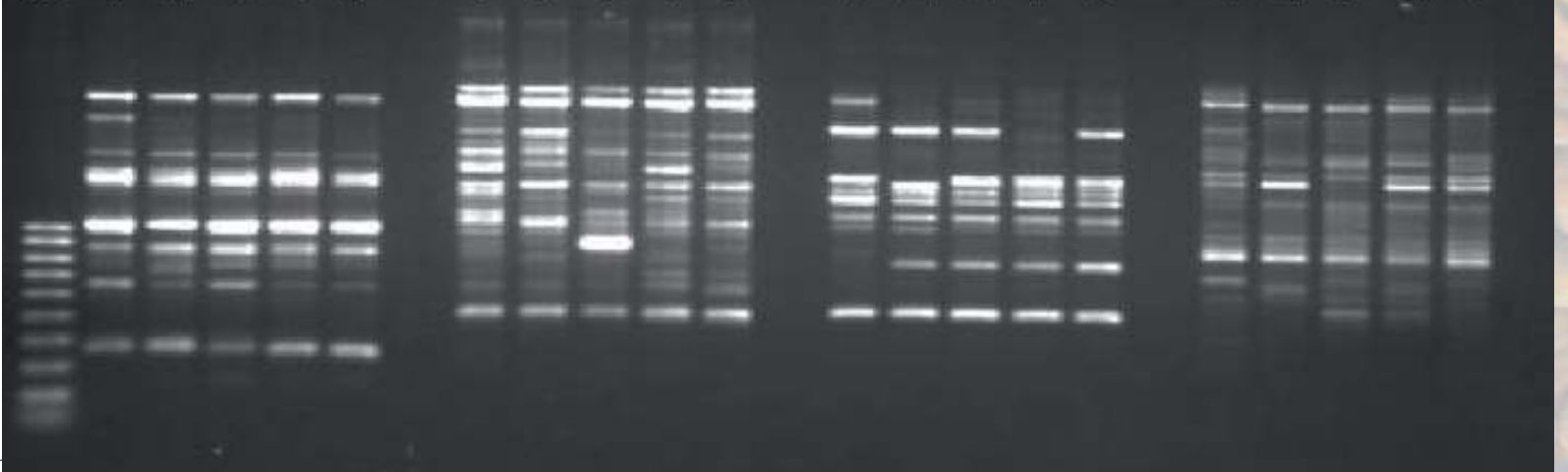




M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5





Capítulo 6

# Técnicas Moleculares e Biotecnológicas Aplicadas ao Café

Maria Amélia Gava Ferrão,  
Aymbiré Francisco Almeida da Fonseca, Romário Gava Ferrão,  
Marcos Atayde de Oliveira, Wellington Marota Barbosa,  
Márcia Silva Pereira D'Isep e Renata Pasini Barbosa





## 1. INTRODUÇÃO

No melhoramento genético do cafeeiro, é de fundamental importância o uso de técnicas que acelerem a avaliação e a seleção de genótipos superiores, visto a sua importância social e econômica e o tempo demandado de pesquisa, por se tratar de uma cultura perene que requer, muitas vezes, anos para que a característica de interesse possa ser expressa. Muitas características desejáveis no cafeeiro conilon, como em outras espécies, resultam da ação conjunta de mais de um gene e das interações deste com o ambiente, sendo, às vezes, de difícil compreensão, avaliação e seleção. O sequenciamento de genomas e o advento dos marcadores moleculares trazem abordagens complementares às da genética clássica para o entendimento desta complexa relação.

Os conhecimentos gerados a partir dos marcadores moleculares, combinados com informações das características fenotípicas, fornecem dados básicos para a avaliação da variabilidade genética, agrupamento de genótipos, seleção e planejamento de cruzamentos.

Neste contexto, o emprego da biotecnologia tem-se mostrado um importante instrumento nos programas de melhoramento genético, em que as técnicas moleculares e de cultura de tecidos vieram contribuir com um novo impulso nas pesquisas de café.

Neste capítulo, será realizada uma abordagem no tema biologia molecular, focando a discussão nos seguintes aspectos: marcadores moleculares, Projeto Genoma Café e técnicas de culturas de tecidos e suas aplicações no cultivo do cafeeiro.

## 2. MARCADORES MOLECULARES

Marcadores podem ser definidos como instrumentos capazes de mapear e caracterizar um fenótipo. Denominam-se os marcadores de genéticos, os quais podem ser divididos em dois tipos básicos: morfológicos e moleculares. Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1997).

Quando um marcador apresenta comportamento de acordo com as leis básicas de herança enunciadas por Mendel, ele é considerado um marcador genético e pode ser monitorado ao longo das gerações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores genéticos identificam regiões dos cromossomos que diferenciam um ou mais indivíduos e são transferidos aos descendentes de acordo com as leis de Mendel.

Até pouco tempo atrás, existiam apenas os marcadores morfológicos, que contribuíram de forma efetiva para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligações gênicas. As análises genéticas eram, inicialmente, realizadas com a utilização de marcadores morfológicos de fácil identificação e geralmente controladas por um único gene, como cor da flor e resistência a algumas doenças. Marcadores morfológicos são frequentemente controlados por genes dominantes, o que não permite a distinção entre heterozigotos e homozigotos (CAVALLI, 2003). A cor das flores e a forma da semente, por exemplo, são marcadores morfológicos expressos somente na planta adulta, sendo necessária a avaliação por um tempo relativamente grande.

A partir da descoberta das técnicas de biologia molecular, surgiram novos métodos para detecção

de polimorfismo<sup>1</sup> genético ou variações genéticas dentro de uma mesma população (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), denominados de marcadores moleculares (marcadores de DNA). Os marcadores moleculares podem ser divididos naqueles baseados nos produtos da expressão dos genes, como proteínas e enzimas, e naqueles baseados em fragmentos específicos das moléculas de DNA e RNA.

Marcadores bioquímicos ou de proteínas são marcadores que analisam o produto da expressão gênica. Os mais utilizados são as isoenzimas. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), esta técnica é eficaz para identificar a variabilidade genética das populações, o fluxo gênico e os processos de hibridização natural. As isoenzimas continuam sendo uma importante ferramenta para identificação das variedades, avaliação de germoplasma e para a detecção de ligação gênica, entre outros. Apesar do seu alto custo, os marcadores bioquímicos, assim como acontece com os marcadores morfológicos, possuem a desvantagem de apresentarem pouca variabilidade. Isto porque não apresentam marcadores suficientes para marcar um grande número de alelos de vários genes de interesse. Outra limitação desta técnica é a baixa estabilidade das enzimas, grande influência ambiental na atividade enzimática e expressão diferenciada associada aos diferentes estágios de desenvolvimento vegetal.

Os marcadores moleculares estão ligados a características do DNA, que servem para diferenciar os indivíduos e são geneticamente herdáveis (MILACH, 1998a). Isto porque marcam regiões do genoma associadas à uma característica específica de interesse, representando estritamente a variação genética, não sofrendo influência ambiental. O polimorfismo observado com o uso de marcadores de DNA é oriundo da seqüência de DNA. Dessa forma, os marcadores de DNA independem do estágio de desenvolvimento da planta, do tipo de tecido da planta e das variações ambientais. Outra vantagem desses marcadores é a alta estabilidade do DNA, o qual, depois de extraído, pode ser estocado para reutilização.

Os marcadores morfológicos foram grandemente utilizados até os anos 60 e eram as principais fontes de seleção utilizadas pelos melhoristas de plantas, além de terem contribuído para o conhecimento inicial de ligação gênica e para construção dos primeiros mapas genéticos. Com o desenvolvimento de marcadores mais modernos, os marcadores morfológicos ficaram em desvantagem por se apresentarem em número limitado nas espécies, o que reduz a possibilidade de associações entre esses marcadores e características de importância econômica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Contudo, apesar dessas limitações, continuam sendo utilizados em combinações com outros mais precisos, como os moleculares, conciliando os resultados obtidos em laboratório e/ou estatísticos com os observáveis em campo a partir dos marcadores morfológicos.

Existem, atualmente, diversos marcadores moleculares que podem ser utilizados na seleção de características genéticas de interesses agrônômicos, com diferentes finalidades no melhoramento genético do cafeeiro, destacando as fontes de resistência a patógenos e pragas, tolerância a fatores abióticos, como seca, uniformidade de maturação, época de maturação, teor de cafeína nos grãos, entre outros.

<sup>1</sup>O termo polimorfismo refere-se à presença de mais de uma forma alélica, seja ela detectada fenotipicamente, por meio de um marcador morfológico, seja genotipicamente, por meio de marcadores moleculares.

### 3. PRINCIPAIS TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares são amplamente utilizados na pesquisa agropecuária desde a década de 80, tendo sido desenvolvidas diversas técnicas úteis para detectar ambigüidades em coleções vegetais, relacionar parentesco entre genótipos, determinar a identidade de um cultivar e construir mapas genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; GUERREIRO FILHO; COLOMBO, 2005). Há várias técnicas disponíveis, cada uma utilizando uma estratégia particular para detectar polimorfismos de DNA. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos: marcadores baseados na hibridização e nos baseados na amplificação de DNA por PCR (Reação de Polimerização em Cadeia). Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minisatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e Microsatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*).

Assim, os marcadores moleculares estão agrupados conforme os métodos utilizados para sua identificação. Aspectos como custo da técnica, facilidade de uso, tempo necessário para obtenção de resultados, polimorfismo detectado, consistência e repetibilidade dos dados influenciam na escolha do tipo de marcador a ser adotado (MILACH, 1998b).

A técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) é uma das mais antigas e utilizadas no melhoramento vegetal, a qual baseia-se na digestão de DNA genômico com enzimas de restrição. Posteriormente, promove a separação dos fragmentos gerados em gel de agarose e os transfere para membranas de celulose, onde serão hibridizados com sondas de DNA. As sondas são fragmentos de DNA cópia única, que antes de serem usadas na hibridização são marcadas com nucleotídeos radioativos ou luminescentes para detectarem seqüências genômicas homólogas a elas. Neste processo, ocorre o pareamento das seqüências homólogas de DNA presentes na membrana e o polimorfismo entre genótipos é detectado a partir da presença ou ausência de DNA, marcado com radioatividade ou por luminescência emitida devida ao pareamento dessas seqüências, o que gera bandas em diferentes regiões da membrana (YAMANE, 2006). A partir da construção de diferentes bibliotecas de sondas, é possível cobrir, potencialmente, todo o genoma da espécie a ser estudada. A grande vantagem da técnica RFLP é a sua codominância, que favorece a distinção de um genótipo heterozigoto de um homozigoto (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Em comparação com as isoenzimas, RFLP possui a vantagem de se utilizar diferentes enzimas de restrição e, assim, detectar um maior número de polimorfismo na espécie estudada. Porém, este tipo de marcador vem perdendo espaço para aqueles baseados em PCR, em virtude do investimento necessário em equipamentos, reagentes químicos e pessoal.

Locos VNTR, ou minisatélites, são seqüências adjacentes de DNA que se repetem em número variável. Um loco VNTR é constituído de um número variável de seqüências idênticas repetidas lado a lado, as quais possuem de 15 a 100 pares de bases e, em cada loco, são repetidas até 50 vezes. É uma técnica semelhante ao RFLP, variando basicamente no tipo de sonda utilizado.

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação de Polimerização em Cadeia) tem como finalidade sintetizar bilhões de cópias de um fragmento de DNA por meio de reações de

amplificação na presença da enzima DNA polimerase. Assim, esta técnica consiste na síntese enzimática *in vitro* de um segmento de DNA de interesse, que é usado como “molde”, e de *primers* (iniciadores), que são seqüências específicas de nucleotídeos de fita simples. PCR foi desenvolvido por Kary Mullis, ao final da década de 80, tendo como base a utilização da enzima DNA polimerase, que é termoestável e possui a capacidade de sintetizar uma região específica do genoma utilizando *primers*. Os *primers* são sintetizados artificialmente com diferentes seqüências de nucleotídeos.

Para que esta amplificação *in vitro* ocorra, são necessários os mesmos componentes envolvidos na replicação genética do DNA, ou seja, o DNA alvo da espécie estudada, um par de *primers* (que irão delimitar a região a ser amplificada), a enzima DNA polimerase e seus co-fatores e os nucleotídeos que irão constituir a nova fita de DNA. A partir de diferentes ciclos de temperatura, o DNA será desnaturado, os *primers* reconhecerão sua seqüência complementar na fita simples de DNA e se anelarão a ela e, ao final, uma nova fita de DNA será sintetizada. Cada ciclo envolve três fases: 1. desnaturação da fita dupla de DNA, 2. pareamento dos *primers* com as seqüências complementares, e 3. síntese de nova fita de DNA. Esses ciclos serão repetidos por muitas vezes, e a amplificação do DNA ocorrerá por progressão geométrica e resultará em bilhões de cópias de DNA. As técnicas baseadas em PCR requerem pequena quantidade de DNA inicial, o que favorece os casos em que se tem pouco material genético disponível. Essa técnica constitui-se em uma ferramenta indispensável no programa de melhoramento por ser de alta velocidade, facilidade e confiabilidade, com inúmeras aplicações que vão desde a identificação de espécies até o seu uso combinado com diversos marcadores moleculares, havendo hoje vários marcadores de DNA derivados da técnica de PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) é uma técnica derivada do protocolo de PCR, com duas características distintas: 1) utiliza um *primer* único em vez de um par de *primers* e 2) o *primer* único tem seqüência arbitrária. Dois grupos de pesquisadores americanos (WILLIAMS et al., 1990; WELSH; McCLELLAND, 1990) desenvolveram, independentemente, a tecnologia baseada em PCR, que utilizava *primers* curtos e de seqüência arbitrária na reação de amplificação, denominada RAPD. A partir do desenvolvimento dessa técnica, conseguiram-se progressos na análise genética e no melhoramento de diferentes espécies vegetais, tanto as que já vinham sendo tradicionalmente estudadas, quanto aquelas que foram favorecidas com o novo método, pois este era de baixo custo, rápido e dispensava conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O RAPD teve aplicações desde a obtenção e análise de bancos de germoplasma até a construção de mapas genéticos e localização de genes de interesse. Uma desvantagem do RAPD é a sua dominância, não favorecendo a distinção do polimorfismo entre um genótipo heterozigoto e um homozigoto dominante. Assim, é obtida pouca informação genética por loco. Essa característica, no entanto, pode não ser importante numa pesquisa ou ser uma limitação que impede uma análise genética mais aprofundada.

Uma derivação do RAPD foi proposta com a denominação de SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), ou seja, regiões amplificadas caracterizadas por seqüências. SCAR são fragmentos de DNA genômico localizado em loco geneticamente definido, que são identificados por amplificação via RAPD, utilizando um par de oligonucleotídeos específicos como *primers* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Assim, marcadores SCAR são oriundos do sequenciamento de marcadores

RAPD objetivando a síntese de *primers* específicos para amplificação por PCR. A grande vantagem da técnica SCAR sobre RAPD é a sua maior reprodutibilidade, pois a técnica de RAPD é sensível a qualquer variação de protocolo, como a quantidade de DNA utilizada e as diferentes marcas de reagentes e de termocicladores (RANDIG; CARNEIRO; CASTAGNONE-SERENO, 2004).

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) é outra técnica baseada na amplificação via PCR, porém combinada com a obtenção de fragmentos de extremidades coesivas a partir da clivagem do DNA por enzimas de restrição de corte raro e de corte freqüente. Assim, são construídos adaptadores que são seqüências de nucleotídeos de fita dupla os quais se ligam a essas extremidades (LOPES et al., 2002). Por esta metodologia obtém-se grande variabilidade genética, detectada pelo polimorfismo tanto de restrição quanto de amplificação, sendo interessante para caracterização do genoma (GUIMARÃES, 2006). Em relação à técnica RAPD, o marcador AFLP possui maior especificidade devido à utilização de *primers* mais longos. A desvantagem desta técnica é a sua dominância, como ocorre no RAPD, reduzindo o nível de informação genética detectado por loco. Além disso, é considerada uma técnica de custo elevado, necessitando de etapas adicionais para a digestão do DNA por enzimas de restrição e do uso de todo o aparato de seqüenciamento, que utiliza radioatividade ou fluorescência e que não está disponível para muitos laboratórios.

A técnica de microsatélites, também chamada SSR (*Simple Sequence Repeats* ou *Seqüências Simples Repetidas*), é muito utilizada para estudar polimorfismo do DNA em estudos de mapeamento genético e na discriminação de genótipos. Nesta técnica, um par de *primers* específicos (de 20 a 30 bases) amplifica regiões complementares repetitivas do genoma através da reação de PCR. A variação em número dessas repetições leva à alteração no comprimento do segmento a ser amplificado. Essas regiões flangeadoras dos *primers* são conservadas, levando à uma alta reprodutibilidade da técnica. Assim, amplifica-se apenas a região desejada (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; BUSO et al., 2003).

A grande vantagem do marcador SSR consiste no fato de ser codominante, ou seja, diferencia os genótipos homozigotos dominantes do heterozigoto, e de apresentarem grande polimorfismo. Dessa maneira, um loco SSR gera muito mais informação do que o de um marcador dominante, mesmo em germoplasma de base genética estreita (BUSO et al., 2003). O que limita em parte a utilização em maior escala do SSR é a obtenção dos *primers*, pois é um processo oneroso e demorado, considerando-se desde a construção de biblioteca genômica até o desenho e testes dos *primers*. Mesmo assim, apenas 10 a 20% desses *primers* são informativos, o que pode ser minimizado pelo intercâmbio de informações entre os pesquisadores e institutos, utilizando-se, inclusive, *primers* desenvolvidos para espécies correlacionadas (processo de transferibilidade ou amplificação cruzada) (HOSHINO et al., 2002).

#### 4. ALGUMAS APLICAÇÕES DOS MARCADORES MOLECULARES

Cada vez mais, exige-se do mercado agropecuário uma maior produtividade, com produtos de melhor qualidade, durabilidade e preços mais baixos. Para que isso ocorra, são aliadas técnicas tradicionais de produção com as pesquisas inovadoras, desenvolvendo-se melhores métodos de se



conseguir maior produção em áreas menores.

As instituições de pesquisas ligadas a este setor estão atentas ao desenvolvimento de novas tecnologias que beneficiem, além dos cafeicultores e consumidores, a área de melhoramento genético. Assim, técnicas biotecnológicas como a dos marcadores moleculares oferecem aos pesquisadores possibilidades de melhor compreensão e de manutenção da variabilidade genética a ser explorada em um programa de melhoramento a partir de genes que apresentem características de importância agrônoma para serem utilizados como ferramentas de seleção antecipada (RUAS et al., 2000). Os melhoristas têm interesse na transferência de determinada característica para materiais elites, podendo-se utilizar os marcadores moleculares em programas de hibridação para seleção das progênies com o(s) gene(s) do genitor de interesse. Outro papel dos marcadores moleculares na pesquisa do café é a organização de um banco de germoplasma que ofereça as diferenças genéticas entre cada variedade da espécie para futuros programas de seleção (MILACH, 1998a). Para a espécie *Coffea canephora* as principais aplicações dos marcadores moleculares serão descritas a seguir.

#### 4.1 QUANTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE E DETERMINAÇÃO DA DISTÂNCIA GENÉTICA

Os marcadores genéticos fornecem informações a respeito da variabilidade genética e do grau de relacionamento genético tanto dentro como entre populações de *Coffea canephora*. A quantificação da variabilidade é de fundamental relevância no melhoramento, pois constitui ferramenta potente na escolha dos materiais genéticos a serem utilizados nos cruzamentos, os quais, além de possuírem características de interesse, devem ser dissimilares para obtenção de ganhos genéticos significativos pela exploração da heterose (FONSECA, 1999; FERRÃO et al., 2005). Também serve de base para os melhoristas com relação à orientação da necessidade de ampliação da base genética de sua coleção ou de seu banco de germoplasma.

#### 4.2 CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS E DE LIGAÇÃO

A obtenção de mapas genéticos possibilita a análise do genoma e a localização das regiões que controlam caracteres de importância agrônoma. Para a construção dos mapas genéticos é necessária a utilização de população com elevado polimorfismo, oriunda de progenitores contrastantes. A população segregante e os progenitores devem ser analisados por um maior número possível de marcadores. O método consiste em verificar, utilizando programas computacionais apropriados, se cada dois marcadores, ou um marcador e um gene de interesse, segregam independentemente ou são transmitidos juntos, neste caso por estarem ligados no mesmo cromossomo.

#### 4.3 SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES - SAM

Neste processo de seleção, também conhecido por *Marker Assisted Selection* (MAS), inicialmente, através do mapeamento genético, identificam-se marcadores associados à característica de interesse. Posteriormente, seleciona-se o indivíduo com o marcador de interesse, em estádios iniciais de

desenvolvimento das plantas.

As principais vantagens da seleção assistida são as seguintes: seleção de indivíduo sem a necessidade de avaliar o fenótipo; redução do tamanho da população de plantas no processo de avaliação e, conseqüentemente, redução do tempo para as avaliações, de área para o trabalho e de custo de condução do trabalho; redução do tempo para a seleção, visto que dispensa a necessidade de se esperar por algumas características vários anos até que ela se expresse.

Tendo-se disponíveis essas informações, podem-se selecionar os indivíduos sem que se avalie o seu fenótipo. Para isso, aplica-se a seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM), técnica que apresenta grande vantagem quando a característica de interesse é de difícil identificação. Também é interessante aplicar essa técnica nas espécies perenes, como o café, quando é preciso esperar anos para que a característica possa ser avaliada. Uma eficiente SAMM será determinada se um alto grau de associação entre o marcador e a característica de interesse for verificado. Os melhoristas de plantas esperam que a seleção assistida por marcadores moleculares reduza o tempo para transferência de genes de interesse (MILACH,1998b).

#### 4.4. FINGERPRINTING DAS VARIEDADES CLONAIS

Com base em marcadores de DNA, realiza-se a caracterização molecular das variedades clonais desenvolvidas e recomendadas pelas instituições de pesquisa através do *fingerprinting* dos clones correspondentes, principalmente naqueles em que é difícil a sua identificação apenas pela diferenciação de atributos fenotípicos, ou seja, de características agronômicas, principalmente daquelas controladas por muitos genes e que sofrem maior influência das condições ambientais. Essa caracterização molecular é particularmente relevante no processo de proteção de cultivares. A tecnologia de marcadores moleculares pode ser empregada de forma objetiva, rápida e segura na comparação de diferentes cultivares.

#### 4.5 MONITORAMENTO DA PUREZA GENÉTICA

Realizada a caracterização molecular dos clones componentes das variedades clonais, é possível monitorar os jardins clonais quanto à pureza genética dos clones de cada variedade recomendada e saber se o total de clones em campo corresponde à constituição da variedade recomendada. Os clones componentes de cada variedade, multiplicados nos jardins clonais, poderão ser monitorados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e em qualquer local em que estejam implantados, até mesmo após anos de trabalho. Vale ressaltar que jardins clonais são campos de multiplicação de estacas dos clones componentes das variedades clonais de café conilon.

### 5. RESULTADOS COM MARCADORES MOLECULARES FOCADOS NA ESPÉCIE *Coffea canephora*

Marcadores moleculares têm sido utilizados com diferentes finalidades no cafeeiro, e os trabalhos de pesquisa citados na literatura estão centrados na espécie *Coffea arabica*, não havendo, até então,

muitos resultados específicos com *Coffea canephora*.

Para as análises moleculares são utilizadas populações segregantes, cruzamentos, materiais clonais, entre outros. Orozco-Castillo, Chalmers e Powell (1994), trabalhando com diferentes materiais genéticos, verificaram produtos de amplificação específicos para *Coffea canephora* em *Coffea arabica*, indicando fluxo gênico interespecífico e introgressão no café. Observou-se que a técnica RAPD foi eficiente para diferenciar subgrupos de *Coffea arabica*, útil inclusive para detectar introgressão e caracterizar a origem geográfica do café. Os marcadores RAPD foram, inicialmente, amplamente utilizados na pesquisa com café arábica, e são inúmeros os trabalhos de caracterização de germoplasmas e identificação de genes de interesse, entre outros (OROZCO-CASTILLO; CHALMERS; POWELL, 1994; AGWANDA et al., 1997; DINIZ et al., 2000; SILVESTRINI et al., 2000; SERA et al., 2003). Em *Coffea canephora*, a técnica de RAPD tem sido utilizada na análise da diversidade genética e caracterização de germoplasma (SILVA et al., 2000; FERRÃO et al., 2005).

Paillard, Lashermes e Petiard (1996), trabalhando com café robusta, obtiveram um mapa parcial de ligação, com 15 grupos de ligação, utilizando 100 marcadores RAPD e 47 marcadores RFLP. Posteriormente, Lashermes et al. (2001) desenvolveram outro mapa de ligação parcial para a espécie *Coffea canephora* com 11 grupos de ligação, utilizando 11 marcadores RAPD, 97 AFLP, 18 microsátélites e 36 RFLP. Com café arábica, foram obtidos três mapas de ligação, sendo dois com marcadores RAPD e em um com marcador AFLP (CABRAL, 2001; OLIVEIRA et al., 2003; PEARL et al., 2004). O ponto de partida para se construir um mapa de ligação consta da disponibilidade de uma população segregante polimórfica, oriunda de genitores contrastantes. Podem ser utilizados marcadores RAPD, RFLP, ou qualquer outro marcador, e até vários deles de forma integrada. O desenvolvimento de um mapa de ligação oferece condições para a avaliação dos marcadores distribuídos por todo o genoma da espécie em estudo, maximizando a probabilidade de se encontrar associações significativas. Quando identificadas essas associações, os marcadores podem ser utilizados na seleção indireta das características de interesse.

Marcadores ligados a genes associados a características qualitativas de importância agrônômica para o cafeeiro foram identificados, como para a auto-incompatibilidade em café robusta (LASHERMES; COUTURON; MOREAU, 1996a), resistência a *Hemileia vastatrix* (TEDESCO et al., 1999; MORENO et al., 2000), porte da planta (RUAS, et al., 2000) e resistência a nematóides do gênero *Meloidogyne* (LASHERMES, 2002; 2003; DINIZ, 2004).

Combes et al. (2000) desenvolveram um conjunto de marcadores SSR para o café. Avaliaram também o potencial desses marcadores na discriminação de genótipos de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e de outras espécies de café, obtendo como resultado polimorfismo na maioria das espécies diplóides de café.

O modo de herança em café arábica e dos chamados arabustas (*Coffea canephora* x *Coffea arabica*) foi investigado por Lashermes et al. (2000a). A análise foi realizada através do uso de marcadores RFLP, e os resultados indicaram que os cromossomos homólogos de *Coffea arabica* se pareiam devido a reguladores de pareamento, os quais poderiam ser controlados por um ou mais genes. Também os cromossomos de *Coffea arabica* se comportam diferentemente em *Coffea arabica* e em arabusta.

O híbrido de Timor, resultante do cruzamento interespecífico espontâneo entre *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, e os seus progenitores foram avaliados por Lashermes et al. (2000b) quanto à

similaridade genética utilizando a técnica de AFLP. A partir de marcadores introgressivos, verificou-se de 9 a 29% do genoma de *Coffea canephora* em genótipos introgressivos de *Coffea arabica*. Esse estudo foi importante para a área de melhoramento do café arábica, já que o AFLP forneceu a análise do nível de introgressão gênica do híbrido a partir da obtenção de marcadores para o café, também sendo uma técnica apropriada para a caracterização do seu germoplasma.

Na América Latina, o nematóide das galhas, *Meloidogyne exigua*, causa grande prejuízo agrônomico na maioria das lavouras de café arábica. Curie et al. (1970) verificaram que variedades de *Coffea canephora* são resistentes a esse nematóide, ao contrário das variedades de *Coffea arabica*, que são suscetíveis. O híbrido de Timor, variedade reconhecidamente resistente a pragas e doenças, demonstrou resistência à *M. exigua*, como a observada em *Coffea canephora*. Noir et al. (2003) desenvolveram um trabalho em que, com a aplicação dos marcadores AFLP ligados ao loco de resistência à *M. exigua* (Mex-1), avaliaram a origem de introgressão dessa resistência entre o híbrido de Timor e seus progenitores (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*). A confirmação da maior resistência dos acessos de *Coffea canephora* foi a partir da detecção dos marcadores AFLP de resistência nesta espécie, enquanto nenhum marcador foi detectado em *Coffea arabica*. A resistência à *M. exigua* nas linhagens do híbrido de Timor foi conferida ao loco Mex-1. A identificação de marcadores moleculares ligados à resistência à *M. exigua* contribuiu, como uma grande ferramenta, em programas de melhoramento do café e na seleção de materiais mais resistentes. Dentro dessa abordagem, Randig, Carneiro e Castagnone-Sereno (2004) desenvolveram marcadores SCAR para as três principais espécies de *Meloidogyne* existentes no Brasil: *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis*.

No contexto de mapeamento de *loci* gênicos responsáveis por características quantitativas (QTLs), sabe-se que ocorre a ação de vários genes, o que torna o processo mais complexo. Para tanto, o mapeamento é baseado em testes de associação entre marcadores moleculares e características fenotípicas, utilizando procedimentos estatísticos e programas computacionais adequados. Machado (2005) utilizou marcadores do tipo RAPD para construção de dois mapas de ligação em populações segregantes oriundas de cruzamentos com o híbrido de Timor. As metodologias de mapeamento de QTLs, marca simples, mapeamento por intervalo simples e mapeamento por intervalo composto foram empregadas para detectar e mapear regiões genômicas associadas a nove características agrônomicas analisadas. Um total de 1.080 *primers* RAPD foram avaliados entre os genitores e híbridos F<sub>1</sub>. As três metodologias de mapeamento identificaram marcadores moleculares ligados a características de importância em cafeeiro.

Materiais genéticos de *Coffea canephora* do programa de melhoramento genético do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper) que apresentam alguma característica relevante são conservados *ex situ*, na forma de plantas em um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da espécie, na Fazenda Experimental de Marilândia, município de Marilândia/ES (FERRÃO; FONSECA; FERRÃO, 2000). Esse BAG é representado atualmente por 375 acessos e cada acesso, por 10 plantas. Na conservação e exploração desses recursos genéticos, a precisa detecção e quantificação da variação genética é um pré-requisito fundamental. Em razão de sua grande variabilidade e do grande número de acessos, a caracterização morfológica torna-se difícil e demorada, pois é necessário grande número de descritores para representar esta variabilidade e especialmente pela plasticidade genética apresentada pelos acessos sob efeito ambiental. O uso de marcadores moleculares, em associação

com descritores morfológicos, tem sido utilizado para analisar a diversidade genética. As etapas para a avaliação molecular constam de: 1. coleta do material de trabalho; 2. extração de DNA; 3. quantificação e controle do DNA genômico; 4. reação RAPD para amplificação do DNA; e 5. eletroforese e visualização do produto da reação. A descrição sumarizada de cada uma dessas etapas, baseada no protocolo utilizado no Incaper, é apresentada a seguir.

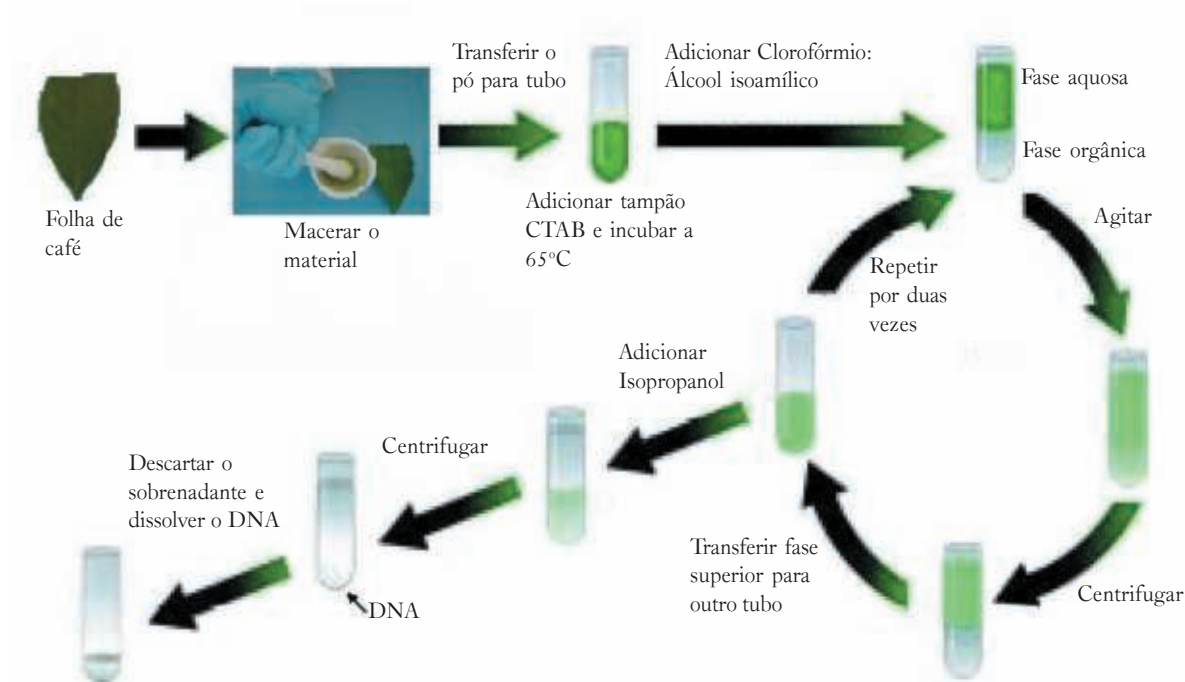
**1. Coleta do material de trabalho:** amostras de folhas saudáveis de plantas adultas de cada um dos materiais do BAG são coletadas na Fazenda Experimental do Incaper, localizada no município de Marilândia/ES, inseridas em sacolas plásticas devidamente etiquetadas e conduzidas em isopor com gelo ao laboratório de biologia molecular do Centro Regional de Desenvolvimento Rural Centro Serrano/Incaper, onde são acondicionadas à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Um ponto relevante nesse processo é a conservação do material desde a coleta, o transporte e o armazenamento em laboratório, de modo que não ocorra murcha das folhas e atuação de enzimas que poderão contribuir para a degradação do DNA. Vale ressaltar que a coleta pode ser feita em plantas de qualquer idade, pois o DNA é o mesmo em todas as partes da planta e em todos os estádios de desenvolvimento.

**2. A extração do DNA:** é efetuada com base na metodologia de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Cerca de 2 g de folhas de cada acesso são maceradas em gral de porcelana, com nitrogênio líquido. O pó obtido é transferido para tubos de 2 mL, onde são adicionados 900  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (CTAB 5%, NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, Tris – HCl 1 M pH 8,0, PVP 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%) e incubados por 40 minutos, em banho-maria, a  $65^{\circ}\text{C}$ , sendo agitados suavemente três vezes durante o tempo de incubação. Após a incubação, efetua-se a desproteínização por duas vezes, com clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1), e as amostras são submetidas à centrifugação por aproximadamente 5 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa obtida dessa centrifugação é transferida para outros tubos e adiciona-se 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado, para precipitação dos ácidos nucleicos, deixando a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por três horas. Posteriormente, realiza-se a centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos, e os *pellets* são lavados com etanol 70% e 95%, secos e ressuspensos em tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Após a ressuspensão dos ácidos nucleicos, adiciona-se RNase A numa concentração final de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e as amostras são incubadas por 30 minutos, a  $37^{\circ}\text{C}$ . A seguir, adiciona-se 600  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto gelado, para precipitar o DNA, e procede-se a uma centrifugação a 14.000 rpm, para separá-lo da fase aquosa. O DNA é então lavado com etanol 70% e 95% e ressuspensão com TE (Figura 01).

**3. Quantificação e controle do DNA genômico:** a quantificação do DNA é realizada a partir de amostras padrões com concentrações conhecidas. Esta técnica baseia-se na comparação de amostras de DNA de concentração desconhecida (amostras de DNA extraídas) com um DNA padrão (de concentração conhecida). Para que o DNA torne-se visível, utiliza-se o processo de coloração de minigel de agarose com brometo de etídio e a eletroforese<sup>2</sup>, no processo de separação de fragmentos. O DNA apresenta carga negativa em pH neutro, o que faz com que seus fragmentos migrem do pólo negativo para o positivo, durante a eletroforese. Posteriormente, o gel é visualizado em luz ultravioleta. Os DNAs das amostras extraídas são comparados com os DNAs utilizados como padrão,

<sup>2</sup> Eletroforese: processo pelo qual moléculas carregadas migram em um campo elétrico, sendo a razão de migração determinada pelo tamanho da molécula e sua carga elétrica.

de concentração conhecida. Ao mesmo tempo, é detectado se o DNA apresenta boa qualidade ou não. Se o DNA estiver intacto, ou seja, não ocorrer degradação ou essa for mínima, observa-se apenas a banda no topo do gel, enquanto se o DNA estiver degradado, observa-se um rastro de fragmentos em toda a linha do gel.



**Figura 1.** Ilustração do processo de extração de DNA pelo método CTAB, adaptado de Romano e Brasileiro (2006).

**4. Reação de RAPD:** A reação é realizada em um volume de  $25 \mu\text{L}$ . Os componentes básicos utilizados são tampão,  $\text{MgCl}_2$ , enzima, *primers* e DNA. A reação consiste de ciclos repetidos de desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão do DNA. Após 40 ciclos, o DNA amplificado pode ser visualizado em gel de agarose. Assim, no trabalho de caracterização molecular do Incaper, cada reação de amplificação de  $25 \mu\text{L}$  tem 25 ng de DNA, 0,1 mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl; 0,4 pM de um oligonucleotídeo iniciador ou *primer* e uma unidade de Taq polimerase. As reações de amplificação são efetuadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), de acordo com Williams et al. (1990). Os ciclos de amplificação constituem-se de uma etapa de desnaturação a  $94^\circ\text{C}$ , por 15 segundos, uma etapa de ligação do *primer* ao DNA molde a  $35^\circ\text{C}$ , por 30 segundos, e uma etapa de extensão a  $72^\circ\text{C}$ , por um minuto. Depois de 40 ciclos, ocorre a última etapa de extensão a  $72^\circ\text{C}$ , por sete minutos.

**5. Eletroforese e visualização do produto da reação:** Os produtos de amplificação são separados em gel de agarose 1,2% imerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), e posteriormente corados em solução contendo 10 mg/mL de brometo de etídio. A corrida de eletroforese é conduzida sob voltagem constante de 110 Volts durante aproximadamente três horas. As bandas de DNA são visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Eagle

Eye II (Stratagener). Este sistema captura, com uma câmera, a imagem do gel do transluminador de luz U.V. em um sistema de fotodocumentação através de programa apropriado no computador e sua impressão. A avaliação do gel é feita pela presença ou ausência de bandas, utilizando-se o número 1 à presença e 0 à ausência de determinada banda. Esses dados são tabulados e utilizados nos procedimentos genético-estatísticos para as análises de interesse. As Figuras 2 e 3 ilustram, respectivamente, as etapas da reação RAPD e os produtos de amplificação de DNA de 40 diferentes germoplasma de café conilon do BAG do Incaper, analisados pela técnica de RAPD.

O laboratório de biologia molecular do Incaper está instalado no Centro Regional de Desenvolvimento Rural Centro Serrano, localizado na BR 262, Km 94, município de Domingos Martins. Atualmente, os trabalhos laboratoriais estão focados na pesquisa com a espécie *Coffea canephora* e na utilização dos marcadores RAPD e Microsatélites como técnicas moleculares. O dendrograma da Figura 4 mostra a variabilidade genética baseada em marcadores RAPD de 49 clones de *Coffea canephora*, do programa de melhoramento genético da espécie, no Incaper, sendo 45 deles componentes das cinco variedades clonais de café conilon desenvolvidas e recomendadas pelo Instituto para o Espírito Santo (FERRÃO et al., 2005). Para análise, utilizaram-se 31 *primers*, que apresentaram padrões de polimorfismo entre os genótipos de *Coffea canephora* analisados, os quais geraram 233 produtos de amplificação polimórficos, com uma média de 7,516 bandas/*primer*. Verificou-se que os clones componentes de cada variedade clonal do Incaper encontram-se distribuídos em vários grupos geneticamente dissimilares, apesar de possuírem características fenotípicas em comum. A diversidade genética observada neste estudo demonstra a importância da realização de hibridações entre esses germoplasmas.

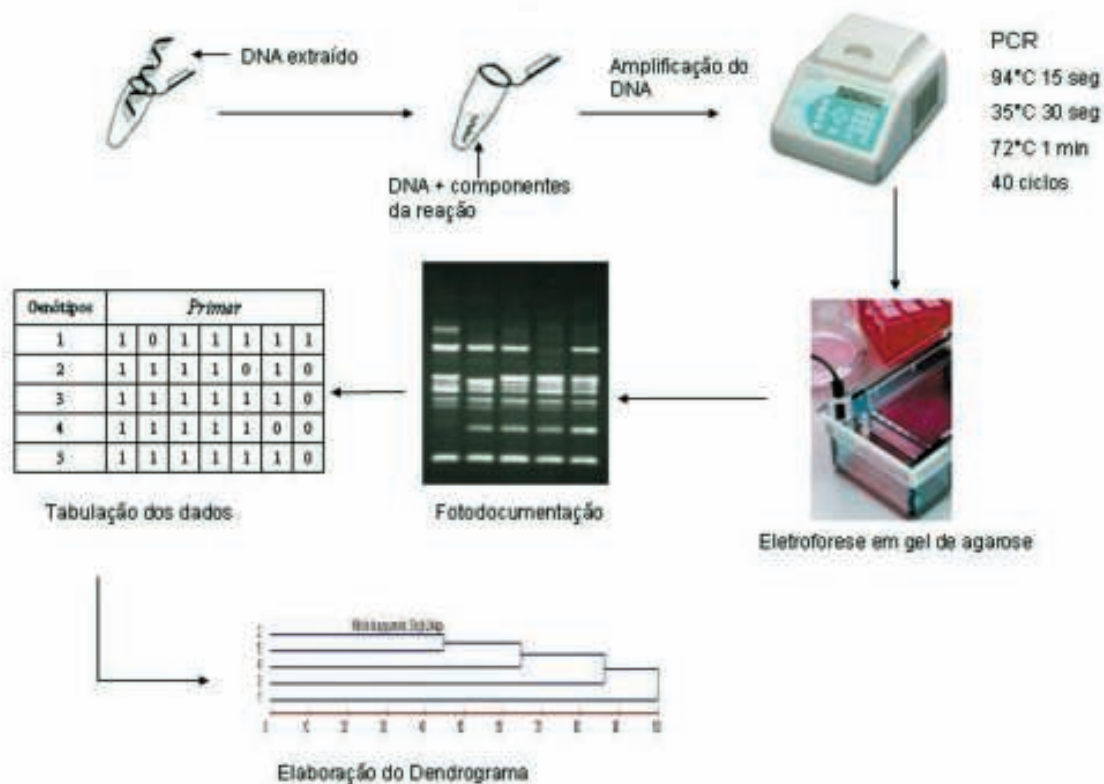
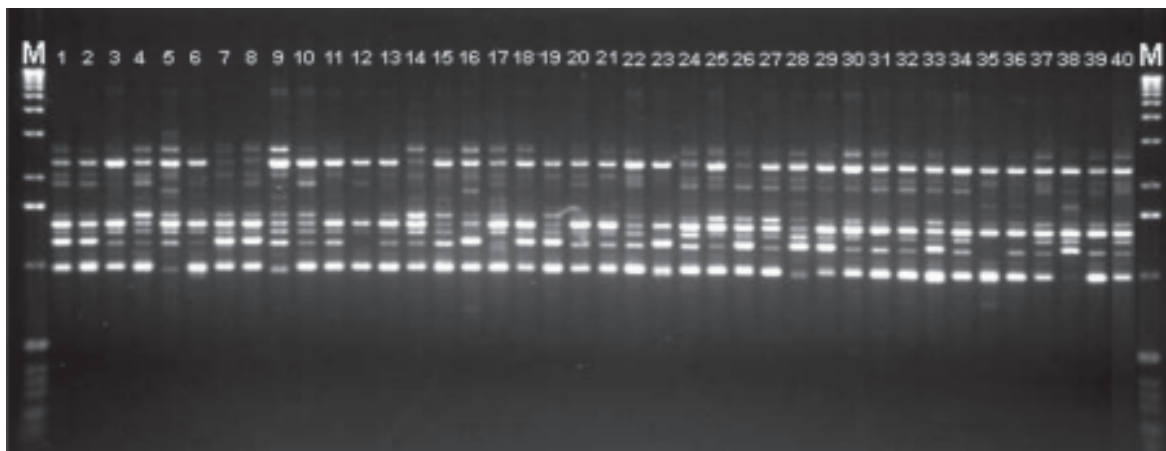


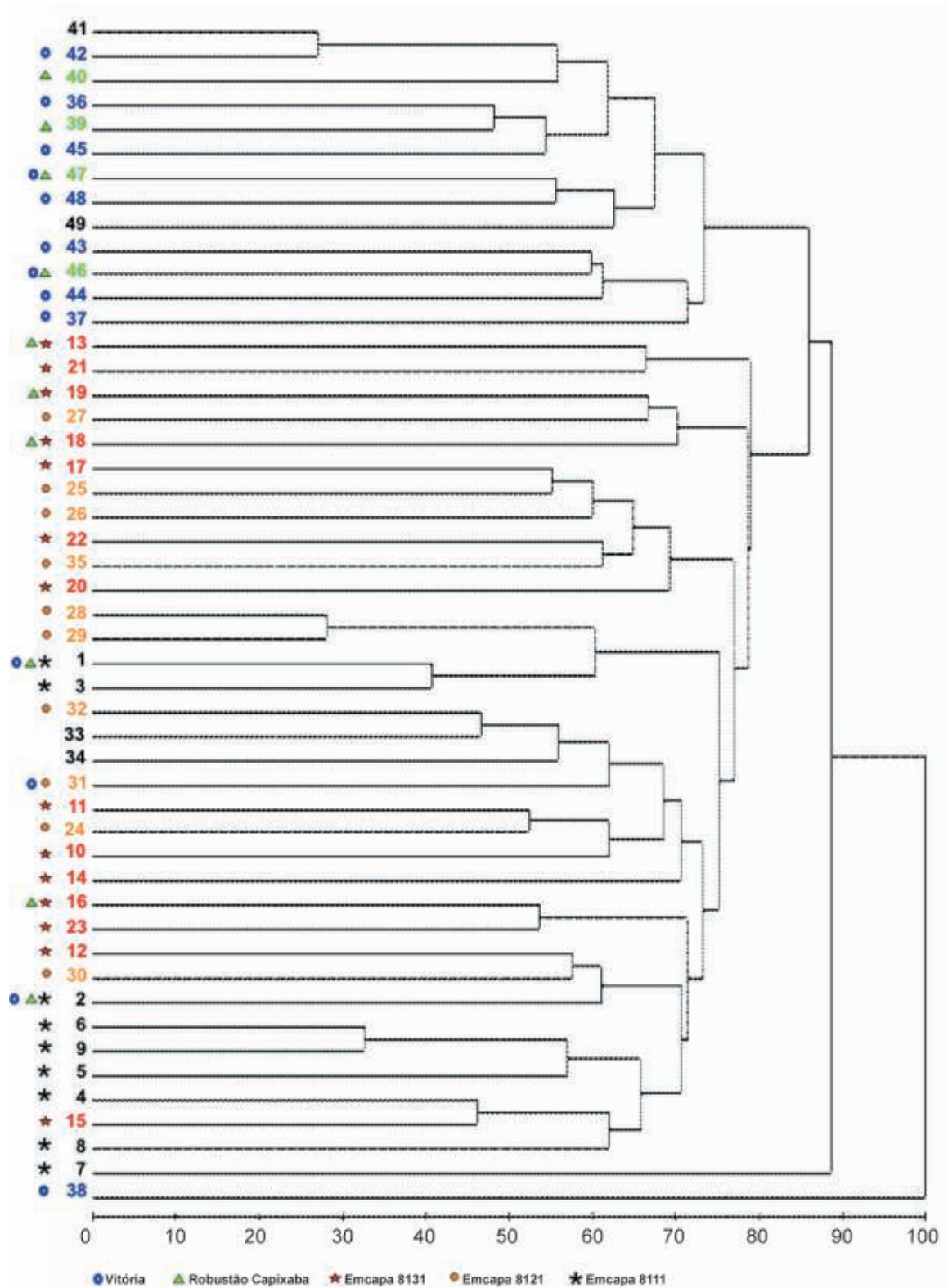
Figura 2. Protocolo ilustrativo utilizado para as reações RAPD.



**Figura 3.** Visualização de produtos de amplificação de DNA de 40 diferentes germoplasmas de café Conilon do BAG do Incaper, analisados pela técnica de RAPD, utilizando-se o *primer* AF-07.

Dentro dessa abordagem de discussão, é importante reforçar que a avaliação da variabilidade genética de germoplasmas depende da disponibilidade de marcadores polimórficos e neutros do ponto de vista do efeito ambiental. Os conhecimentos gerados com marcadores moleculares em café conilon fornecem informações básicas da diversidade e distância genética, que são imprescindíveis no conhecimento da base genética, bem como na redundância de germoplasma e/ou ausência de variabilidade genética, gerando dados sobre a necessidade de manutenção e ampliação do Banco de Germoplasma de café Conilon no Estado do Espírito Santo. Além disso, a caracterização molecular do germoplasma é fundamental no processo de proteção de cultivares, visto a elevada precisão da tecnologia. A identificação de marcadores genéticos ligados a características de interesse, como a resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e tolerância à seca em *Coffea canephora* variedade Conilon, contribuirá de forma eficaz para a seleção de germoplasmas em menor período de tempo e com maior eficácia (seleção assistida por marcadores).





**Figura 4.** Dendrograma construído usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) para agrupamento de 49 clones de *Coffea canephora*, com base em marcadores RAPD e de acordo com a dissimilaridade genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard.

## 6. ANÁLISE GENÔMICA

Os métodos para se analisar a estrutura e função de genes em larga escala, denominados coletivamente de tecnologia genômica, têm proporcionado uma enorme produção de informações e a geração de bancos de dados de seqüências de DNA, que possibilitam a identificação dos fatores genéticos determinantes e/ou associados com características de interesse agrônômico.

Segundo Meidanis (2005), seqüenciar um genoma é obter a seqüência literal das bases nitrogenadas que constituem o genoma inteiro, ou, pelo menos, de grandes trechos dele. Usam-se as expressões genoma estrutural e genoma funcional para designar, respectivamente, projetos de seqüenciamento completo e de seqüenciamento amostral de genomas. Ambas as estratégias exigem que sejam coletados grandes volumes de dados, em forma de seqüências. O alto custo para seqüenciar o genoma inteiro muitas vezes é fator limitante.

Para seqüenciar o genoma total do cafeeiro, o custo seria muito elevado, devido à sua complexidade e ao seu tamanho. Por isso, no Projeto Genoma Café optou-se em seqüenciar apenas parte do genoma, ou seja, realizou-se o seqüenciamento amostral do genoma, conhecido como Etiquetas de Seqüências Expressas (ESTs – do inglês *Expressed Sequence Tags*), sendo seqüenciados apenas genes expressos pelo organismo. Genes expressos são aqueles que se encontram ativos no momento e nas condições da análise. Desta forma, ESTs são seqüências de DNA que representam pedaços de RNA mensageiro (mRNA), que revelam os genes expressos em um tecido ou órgão em determinada situação fisiológica ou patológica (VIEIRA, 2003).

Assim, o primeiro passo do Projeto Genoma Café foi a obtenção de bibliotecas de ESTs, as quais foram desenvolvidas de mRNAs extraídos e isolados de células e tecidos de diferentes plantas em diferentes estádios de desenvolvimento e condições ambientais das espécies *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea racemosa*. Esta estratégia, apesar de não abranger todo o genoma da espécie, permite a identificação de genes relacionados com processos biológicos de interesse, de maneira mais rápida e eficiente. Em *Coffea canephora*, por exemplo, trabalhou-se mais especificamente com tecidos de plantas tolerantes e sensíveis à seca. Dessa forma, genes diretamente relacionados com mecanismos de tolerância à seca poderão ser isolados a partir das seqüências específicas obtidas de plantas resistentes e suscetíveis e poderão ser utilizados tanto como marcadores moleculares durante o processo de seleção, quanto como genes candidatos a participar de um programa de pesquisa envolvendo a transformação genética de plantas. A expressão dos genes de interesse é comparada em genótipos que apresentam diferenças fenotípicas para a característica em estudo.

A primeira etapa do Projeto Genoma Café, realizada no período de fevereiro de 2002 a fevereiro de 2004, foi liderada e coordenada pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D - Café<sup>1</sup>) e executado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do São Paulo (Fapesp). O projeto contou também com intensa

<sup>1</sup> O Consórcio, criado em 1997, envolve 12 Estados da Federação, sendo composto por 40 instituições de Pesquisa e Desenvolvimento, entre elas as fundadoras a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agropecuário (EBDA), o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epmig), o Instituto Agronômico de Campinas (IAC), o Instituto Agronômico do Paraná (Iapar), a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-RIO), a Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo (MA/SARC), a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV).

participação da Unicamp, USP, Unesp, Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) e Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper) nas discussões técnicas e no fornecimento de material genético para a construção das bibliotecas gênicas. Os materiais utilizados para a construção das bibliotecas de cDNA de *Coffea arabica* e *Coffea racemosa* são oriundos da coleção de germoplasma do IAC e os de *Coffea canephora*, do Incaper (VIEIRA et al., 2005).

O projeto resultou na construção de um banco de dados com mais de 200 mil seqüências de DNA e foi o primeiro seqüenciamento mundial do genoma funcional do cafeeiro. Isso permitiu a identificação de mais de 30 mil genes, responsáveis pelos diversos mecanismos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento do cafeeiro. O banco de dados obtido é o resultado do seqüenciamento de várias bibliotecas de cDNA, ou seja, seqüências de DNA correspondentes aos genes expressos nos vários tecidos da planta (folhas, raízes, frutos, flores e ramos – sadios e submetidos a estresses bióticos e abióticos – pragas, doenças, frio, calor, seca) em diversos estágios de desenvolvimento.

Conforme já citado, o seqüenciamento do genoma café consistiu-se no primeiro passo no projeto. Contudo, apenas o seqüenciamento não revela as posições dos genes e as variações encontradas dentro dos indivíduos de uma espécie. Também não elucidada quais os genes estão envolvidos no comportamento do organismo em questão e como o ambiente influencia a atuação dos genes. A informação fundamental refere-se ao entendimento de como os genes são organizados dentro do genoma, suas funções bioquímicas e fisiológicas e a interação dos genes com os diferentes processos biológicos (VIEIRA, 2003).

Dessa forma, após o seqüenciamento, iniciou-se o segundo passo do projeto, chamado de “anotação”, que consiste em delimitar os genes e atribuir funções às seqüências. Este processo visa agregar valor à base de dados gerada no âmbito do projeto Genoma Café, através da realização do processo de anotações das mais de 30.000 seqüências gênicas diferentes identificadas, de forma a facilitar o acesso e a utilização dos dados pelos diversos pesquisadores envolvidos nos programas de melhoramento genético do cafeeiro (CAIXETA et al., 2003). O processo de anotação de uma seqüência baseia-se em comparação via programa informatizado com volumosos bancos de dados contendo milhões de outras seqüências. Se uma similaridade significativa for encontrada, há indícios de que a seqüência a ser anotada pode ter a mesma função. Posteriormente, as informações geradas são cuidadosamente examinadas por vários laboratórios que se dedicam à mineração ou prospecção dos dados (nesta fase, são comparadas semelhanças entre genes da espécie de interesse e genes de outras espécies, previamente identificadas).

Essa análise comparativa, geralmente, não é suficiente para definir com confiabilidade a função do gene, sendo necessários outros estudos adicionais, como os experimentais e/ou a utilização de outras ferramentas biotecnológicas de alto desempenho, denominadas de transcriptoma, proteoma e metaboloma, em que:

- transcriptoma: realiza estudos sobre a expressão gênica, que mede a concentração de RNA do tecido ou organismo em questão; compreende o conjunto de moléculas de RNA provenientes de um genoma ou tecido;
- proteoma: realiza estudos sobre o perfil protéico de um organismo; refere-se a proteínas

expressas por um genoma ou tecido;

- metaboloma: objetiva identificar e quantificar a composição total de metabólitos de um organismo; metabólitos podem ser definidos como produtos finais da expressão de genes.

Essas etapas de estudo são, muitas vezes, necessárias, visto que a atividade de um gene é expressa em diferentes níveis, incluindo RNA, proteínas e metabólitos. O papel fundamental do DNA é armazenamento da informação genética. Para tal, regiões específicas do DNA, os genes, são copiados em moléculas de RNA, mais especificamente em mRNA, por um processo conhecido como transcrição. Esses RNAs sofrem modificações, e a informação contida na molécula de RNA é então traduzida para uma seqüência de aminoácidos, formando as proteínas, que podem também sofrer modificações (CAIXETA et al., 2003; LEE, 2001).

No Projeto Genoma do cafeeiro, os principais objetivos definidos no plano de pesquisa inicial foram determinar os genes expressos nos diversos tecidos e órgãos, assim como em situações de estresses bióticos e abióticos, e construir mapas genéticos de café com alta qualidade, visando aumentar a densidade de marcadores moleculares para auxiliar o melhoramento de novas variedades. Espera-se que os resultados obtidos no Projeto Genoma permitam a geração de novos e eficientes marcadores moleculares (VIEIRA, 2003).

A partir dos genes e marcadores identificados será possível maior rapidez e eficiência no desenvolvimento de variedades mais produtivas, tolerantes à seca, resistentes ao ataque de pragas e doenças, com qualidades superiores, entre outras.

## 7. TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS E SUAS APLICAÇÕES

A seleção e a reprodução de plantas possuidoras de características desejáveis têm sido utilizadas desde os tempos antigos para atender à necessidade de produzir quantidades crescentes de alimentos e matérias-primas para a indústria.

O advento da área biotecnológica possibilitou avanço significativo dos resultados em prazos relativamente mais curtos nos programas de melhoramento das espécies. Uma das áreas mais promissoras na Biotecnologia é a da cultura de células e de tecidos. É uma área já antiga, datando dos anos 20, mas que só alcançou progressos razoáveis a partir do fim da década de 60.

Nos tecidos e nas células cultivadas *in vitro*, pode-se introduzir alterações por ação de agentes físicos ou químicos com maior eficiência do que em plantas inteiras. Assim, as taxas de alterações (mutações) podem ser grandemente aumentadas e, a partir dessas culturas, pode-se conseguir a regeneração de plantas com características diferentes. Existe também a possibilidade de fusão de protoplastos de células geneticamente diferentes, possibilitando as novas combinações, ou combinação de material genético de células provenientes de espécies muitas vezes diferentes. Uma das vantagens é que, através dessa técnica, pode-se gerar um grande número de material clonado em curto espaço de tempo e em ambientes reduzidos, sendo ainda indicada para a eliminação de doenças.

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Em geral, essas técnicas são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento genético.

## 7.1 MICROPROPAGAÇÃO

Micropropagação é a multiplicação ou regeneração *in vitro* de material vegetal sob condições assépticas em meios especiais que contenham nutrientes e reguladores de crescimento exigidos para o desenvolvimento normal das atividades vitais das plantas. Esta é a base de procedimentos tomados por centenas de indústrias, envolvendo uma rede de laboratórios, na comercialização de plantas em nível mundial. Esta técnica pode ser usada com maior eficácia na multiplicação de variedades de clones vegetais. Além de rápida propagação das plantas, ela permite regeneração do material vegetal tratado e livre de doenças, especialmente quando combinada com o uso de kits diagnósticos.

O domínio da técnica, aliado a razões econômicas, promoveu grande avanço com as espécies herbáceas. Considerando a facilidade de regeneração de raízes e o grande benefício que representa a limpeza de clones de doenças sistêmicas, fez com que fossem concentrados esforços na otimização de sistemas de micropropagação para essas espécies, tornando-os economicamente viáveis. Por outro lado, as dificuldades enfrentadas na propagação de espécies lenhosas, entre as quais a perda da capacidade morfogênica dos tecidos, fizeram com que o investimento na determinação de sistemas comerciais para essas espécies fosse comparativamente menor.

No uso da técnica de micropropagação, a variabilidade na resposta morfogênica *in vitro*, que existe não apenas entre espécies do mesmo gênero mas também entre genótipos da mesma espécie, leva freqüentemente à necessidade de se definir protocolos diferenciados.

A micropropagação pode ser representada por três maneiras, de acordo com o explante utilizado e sua condução no ambiente *in vitro*:

- multiplicação por meio de gemas axilares: nesta situação, os explantes são gemas pré-formadas que são inoculadas em meio de cultivo dando origem a novas partes aéreas;
- multiplicação por meio de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta: na organogênese direta, as gemas surgem diretamente do tecido vegetal inoculado em meio de cultivo, enquanto na indireta a formação de gema é precedida pela formação de calo;
- embriogênese somática: a embriogênese somática pode ocorrer por via direta ou indireta.

De acordo com Almeida et al. (2001), a micropropagação de plantas de cafeeiro representa uma via tanto para a propagação vegetativa quanto para a preservação de germoplasma. Conforme o tipo de explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ocorrer através da proliferação de gemas axilares e da embriogênese somática direta ou indireta.

A embriogênese somática a partir de explantes foliares de *Coffea* pode ocorrer por via indireta, havendo inicialmente formação de calo, que, posteriormente, ao ser transferido para o meio de diferenciação morfológica, originará os embriões; ou via direta, sendo os embriões formados diretamente de células da borda do explante.

Dentre as modalidades da cultura de tecidos em café, a embriogênese somática tem sido freqüentemente citada no esforço por estabelecer um protocolo de micropropagação clonal para *Coffea*.

Balbino, Athayde e Ferrão (2002), em conformidade com os autores supracitados, relatam a ocorrência de embriogênese indireta em 10 clones de *Coffea canephora* cv. Conilon, os quais apresentaram rendimento médio de 60 embrióides por explante. A formação dos embrióides ocorreu seis meses após a inoculação. Utilizou-se o meio de cultivo Murashige e Skoog, acrescido de 1,5 mg de BAP e

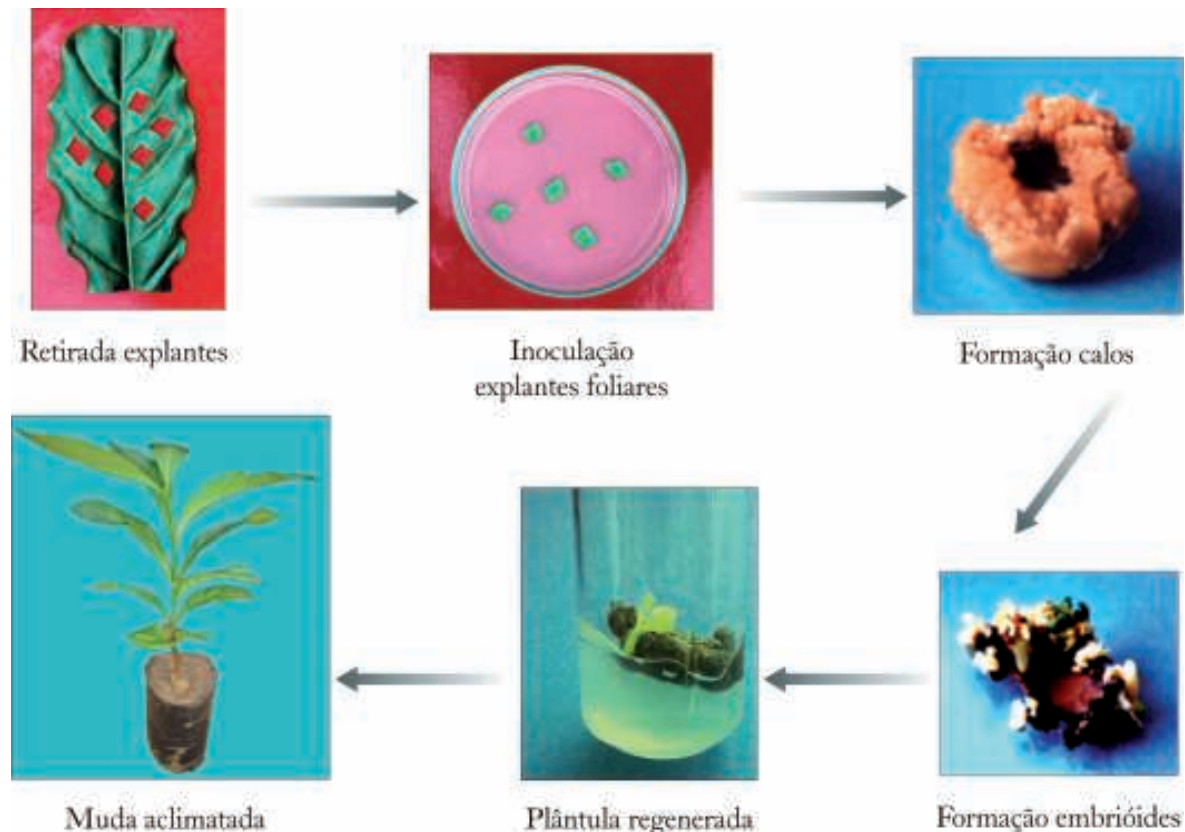
10 mg de GA<sub>3</sub> por litro. Correlacionaram a capacidade de formação de calos e embriogênese somática com o estágio fenológico da planta. Os autores observaram que a formação de embriões/explante/clone foi variável de acordo com a fase fenológica da planta. A Figura 5 ilustra as etapas do processo de multiplicação *in vitro* do café conilon.

Almeida et al. (2001) obtiveram resultado similar quando trabalharam com oito genótipos de *Coffea*, no IAC. Observou-se que os genótipos apresentaram respostas diferenciadas conforme as épocas de coleta das folhas. Sendo assim, os autores prospectaram que o estágio fisiológico da planta pode influenciar a capacidade de embriogênese somática dos genótipos estabelecidos *in vitro*.

## 7.2 CULTURA DE EMBRIÕES

A técnica é utilizada para superar dormência de sementes devida à imaturidade do embrião ou à presença de substâncias inibidoras no endosperma, além de para estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião. A técnica também é aplicada para testar a viabilidade de sementes e recuperar híbridos raros de cruzamento entre espécies incompatíveis.

Um dos objetivos do melhoramento genético do cafeeiro está na redução do tempo gasto na identificação de um genótipo promissor e sua multiplicação para teste de campo, uma vez que o período de tempo entre o florescimento e a produção de sementes leva meses.



**Figura 5.** Etapas do processo de multiplicação *in vitro* do café conilon no Incaper.

A utilização da cultura de embriões garantiu 100% de germinação para as cultivares de *Coffea canephora* cv. Apoatã e *Coffea arabica* cv. Acaíá Cerrado, Rubi e Topázio, quando comparados com as sementes desprovidas de pergaminho, que não germinaram *in vitro*. E, ainda, observou-se que as cultivares de *Coffea* exigiram concentrações de 9 a 12mg/l de BAP para brotação e crescimento da parte aérea, enquanto o desenvolvimento radicular se deu na ausência do regulador de crescimento. A técnica de cultura de embriões faculto a diminuição do tempo necessário para a obtenção de novas progênes e a garantia da uniformidade genética do material (SANTOS et al., 2001).

### 7.3 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*

Na preservação do germoplasma *in vitro*, pode-se utilizar diferentes explantes, como ápices caulinares, hastes, embriões zigóticos e somáticos, além de calos. Esta técnica é aplicada, principalmente, para espécies propagadas vegetativamente. No caso do café, pode ser dinamizada a partir da manutenção de plântulas, embrióides e calos. Viabiliza o incremento e intercâmbio das redes de pesquisa, uma vez que a troca de material poderá ocorrer por meios mais rápidos, minimizando as tarefas dos serviços de quarentena e vigilância sanitária.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da reunião dos esforços e dos conhecimentos resultantes do melhoramento clássico e das técnicas mais recentes de biologia molecular, objetiva-se chegar a uma cafeicultura focada em uma eficiente conservação e utilização dos recursos genéticos, com ganhos significativos na produtividade, na qualidade e na sustentabilidade da atividade. A seleção de genótipos assistida por marcadores moleculares pode acelerar o progresso genético através do aumento da eficiência da seleção, com redução do tempo para o desenvolvimento de novas variedades.

## 9. REFERÊNCIAS

- AGWANDA, C. O.; LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; COMBES, M. C.; E CHARRIER, A. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. *Euphytica*, 97, p. 241-248, 1997.
- ALMEIDA, J. A. S.; SIMIONI, K. C. M.; FAZUOLI, L. C.; RAMOS, L. C. S. Obtenção de embriões a partir de calos de genótipos de *Coffea*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 2., 2001, Vitória, ES. *Anais ...* Brasília: Embrapa Café, 2002. p. 305-309.
- BORÉM, A. *Melhoramento de plantas*. Viçosa, MG: UFV, 1997. 574p.
- BALBINO, J. M. S.; ATHAYDE, M.; FERRÃO, M. A. G. Propagação *in vitro* do café conilon. *Relatório final do subprojeto 19.1999.075.04*. Incaper, 2002.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores Microsatélites em espécies vegetais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 30, p. 46-50, 2003.
- CABRAL, T. A. T. *Padrões moleculares, diversidade genética e mapa parcial de ligação do cafeeiro*. 2001. 108f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; ZAMBOLIM, E. M.; DINIZ, L. E. C. Avanços tecnológicos em biologia molecular: projeto genoma no melhoramento de plantas. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). *Produção integrada de café*. Viçosa, MG: UFV, DFP, 2003. Cap. 9.
- CAVALLI, S. C. Polimorfismos moleculares. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (eds.). *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: UFRGS, 2003. Cap. 18.
- COMBES, M. C.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; ROVELLI, P.; GRAZIOSI, G.; LASHERNES, P. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology*, n. 9, p. 1178-1180, 2000.
- CURI, S. M.; CARVALHO, A.; MORAES, F. P.; MONACO, L. C.; ARRUDA, H. V. Novas fontes de resistência genética de *Coffea* no controle de nematóide do cafeeiro *Meloidogyne exigua*. *Biológico*, n. 36, p. 293-295, 1970.
- DINIZ, L. E. C.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; SERA, T. O uso de RAPD associado a enzimas de restrição para detectar variabilidade genética no Banco de Germoplasma de *Coffea arabica* L. do IAPAR. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000. Poços de Caldas, MG. *Resumos expandidos ...* Brasília: Embrapa Café e MINASPLAN. v. 1. p. 550-556. 2000.
- DINIZ, L. E. C. *Mapeamento físico da região cromossômica próxima ao gene de resistência a Meloidogyne exigua (MEX-1) em Coffea arabica*. 2004, 1001 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.



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

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da; 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, MG. *Anais...* Brasília: Embrapa Café e MINASPLAN, v. 1. p. 405-407. 2000.

FERRÃO, R. G. *Biometria aplicada ao melhoramento genético do café conilon*. 2004. 256f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2004, Viçosa, MG, 2004.

FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A. da; BARBOSA, W. M.; FERRÃO, R. G. Variabilidade Genética em *Coffea canephora* com base em marcadores RAPD. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina, PR. *Anais ...* Embrapa Café: Núcleo Biotecnologia Aplicada à Cadeia Agroindustrial do Café, 2005. p.3 1 CD ROOM.

FONSECA, A. F. A. da. *Análise biométrica em café conilon (Coffea canephora Pierre)*. 1999. 124f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: Embrapa/Cenargen 1998, 220p.

GUERREIRO FILHO, O.; COLOMBO, C. A. Biotecnologia na Cafeicultura Coffee Break: *O portal do Agronegócio Café*. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=58>>. Acesso em: 20 dez. 2005.

GUIMARÃES, C. T. *Técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento do milho*. Disponível em: <<http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/eventos/simposios/5simpo/resumos/clauidiateixeira.ht>>. Acesso em: 7 fev 2006.

HOSHINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES C. R.; GIMENES, M. A. Marcador microssatélite na conservação vegetal. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 29, p. 146-150, 2002.

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

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. 1996b.

LASHERMES, P.; PACZEK, V.; TROUSLOT, P.; COMBES, M.C.; COUTURON, E. CHARRIER, A. Single –locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interespecific hybrid *C. arabica* x *C. canephora*. *The journal of heredity*. 91 n. 1, p. 81-85, 2000a.

- LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B.; COMBES, M.C., DUSSERT, S.; GRASIOZI, G.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica*). *Theoretical Applied Genetics*, n. 100, p. 139-146, 2000b.
- LASHERMES, P. Breeding tools for durable resistance to nematodes (*Meloidogyne* spp). IN: PROC. EEPF 2002 (6<sup>TH</sup> Conference of European Foundation for Plant Pathology): *Disease Resistance in Plant Pathology* (September 8-14, 2002, Prague, République Tchèque), Résumé W-4, page 120, 2002.
- LASHERMES, P. Breeding tools for durable resistance to nematodes (*Meloidogyne* spp) of coffee varieties. *Plant Protection Science*, sous presses, 2003.
- LEE, K. H. Proteomics: a technology-driven and technology-limited Discovery science. *Trends in Biotechnology*, v. 19, n. 6, p. 217-222, 2001.
- LOPES, R.; LOPES, M. T. G., FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO M. S., VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 29, p. 56-60, 2002.
- MACHADO, C. F. *Repetibilidade, correlações fenotípicas e mapeamento de QTLs em populações segregantes de café arábica*. 2004. 188f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- MALUF, M. P.; SILVESTRINI, M.; RUGGIERO, L. M. C.; GUERREIRO FILHO, O.; COLOMBO, C. A. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* imbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR markers systems. *Scientia Agricola*, v. 62, n. 4, p. 366-373, 2005.
- MEIDANIS, J. Análise genômica, mapeamento e análise de QTLs. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2003, Gramado, RS. *Curso...* Gramado: Embrapa, 2005. 1 CD ROM.
- MILACH, S. C. K. *Marcadores moleculares em plantas*. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). Porto Alegre, 1998a. 141p.
- MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 5, p. 14-17, 1998b.
- MORENO, G.; CORTINA, H.; ALVARADO, G.; GAITAN, A. Utilizacion de los recursos genéticos de café en el programa de melhoramento genético de *C. arabica*, en Colombia. In: *Atelier sur l'amélioration durable du caféier Coffea arabica*, 2000, CATIE, Turrialba, Costa Rica, p. 33-38.
- MOSS, DW. *Isoenzymes*. Capman & Hall, London & New York. 1982.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 33, p. 10-13, 2004.

- NOIR, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; COMBES, M. C.; LASHERMES, P. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in (*Coffea arabica*). *Plant Pathology* n. 52. p. 97-103, 2003.
- OLIVEIRA, A. C. B.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; DINIZ, L. E. C. Avanços tecnológicos em biologia molecular: marcadores de DNA no melhoramento do café. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). *Produção integrada de café*. Viçosa, MG: UFV; DFP, 2003. Cap. 9.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K. J.; POWELL, W. Detection of genetic diversity and selective gene intogression in coffee using RAPD markers *Theoritcal Applied Genetics*, n. 87, p. 934-940, 1994.
- PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PETIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theoritcal Applied Genetics*, 93:41-47. 1996.
- PEARL, H. M.; NAGAI, C.; MOORE, P. H.; STEIGER, D. L.; OSGOOD, R. V.; MING, R. Construction of a genetic map for Arabica coffee. *Theoritcal Applied Genetics*, v. 1008, p. 829-835, 2004.
- PRIOLLI, R. H. G.; MÖLLER, N.; RAMOS, L. C.; ZUCCHI, M. I.; MAZZAFERA, P.; COLOMBO, C. A. *Polimorfismo de locos SSR e coeficiente de similaridade genética em populações segregantes de C. arabica x C. canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina, PR. *Anais...* Brasília: Embrapa Café: CBP&D/Café. 2005.
- RANDIG, O., CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira*, n. 28, v. 1, p. 1-10, 2004.
- RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; AZEVEDO, L. B.; CARVALHO, V. P. RUAS, E. A. e SERA, T. Identificação de marcador molecular ligado ao porte de planta em *C. arabica*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 1., 2000, Poços de Caldas, MG. *Anais...* Brasília: Embrapa Café e MINASPLAN. 2000. v. 1., p. 142-144.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. *Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados*. Disponível em: <[http://www.biotechnologia.ciência & desenvolvimento.htm](http://www.biotechnologia.ciência&desenvolvimento.htm)>. Acesso em: 20 mar. 2006.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R. ; GOMES, G. A. C.; PAIVA, P. D. O. Germinação *in vitro* de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 2., 2001. Vitória, ES. *Anais...* Brasília: Embrapa Café, 2002. p. 283-285.
- SERA, T.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; DINZ, L. E. C.; CARVALHO, V. P.; RAMPIM, L.; RUAS, E. A.; SILVEIRA, S. R. Genetic polymorphism among 14 elite *Coffea arabica* L. cultivars using RAPD markers associated with restriction digestion. *Genetics and Molecular Biology*. n. 26,1, p. 59-64, 2003.
- SILVA, D. G.; ZAMBOLIM, L. SAKIYAMA, N. S.; SAKIYAMA C. C. H.; FONSECA.

A. F. A. da; PEREIRA, A. A.; TEIXEIRA, T. A. Uso de marcadores RAPD no estudo de variabilidade em clones de *Coffea canephora* var. Conillon. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1. 2000, Poços de Caldas, MG. *Resumos Expandidos...* Brasília, DF: Embrapa Café e MINASPLAN, v. 1, p.134-137, 2000.

SILVESTRINI, M.; MALUF, M. P.; RUGGIERO, L. M. C. de; GUERREIRO FILHO, O.; COLOMBO, C. A. Caracterização de linhagens comerciais de café através de marcadores moleculares. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 1., 2000. Poços de Caldas, MG. *Resumos expandidos...* Brasília: Embrapa café: MINASPLAN, 2000, v. 1., p. 142-144.

TEDESCO, N. S.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; FONTES, J. R. M.; TEIXEIRA, T. A.; PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, C. C. H. Mapeamento de gene de resistência a ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) com marcador RAPD. *Genet. Molec. Biol.*, v. 22, n. 3, p. 280, 1999.

VIEIRA, L. G. E. Genoma funcional em plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro, BA. *Palestra...2003*. CD-ROM.

VIEIRA, L. G.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; PEREIRA, G. A. G. Coffee genome project: a resource for functional genomics. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZES, V. M. P. (Eds.). *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa, MG: UFV, DFP, 2005, p. 363-396.

WEISING, K.; WOLFF, K.; MEYER, W.; NYBOM, H. *DNA Fingerprinting in plants and fungi*. New York: CRC Press, 1995. 332 p.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, n. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G.; KUBELINK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, n. 18, p. 65531-6535, 1990.

YAMANE, R. S. *Marcadores Moleculares*. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL003.htm>>. Acesso em: 5 jan. 2006.