

DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA INTERESPECÍFICA E ANÁLISE DE PEDIGREE EM *COFFEA* IDENTIFICADA COM MARCADORES ISSR (INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS)

RAMPIM, L.¹; RUAS, P.M.¹; RUAS, C.F.¹; CARVALHO, V.P.¹; SERA, T.²; SILVEIRA, S.R.¹ e TORRES, F.M.¹

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina; ² Instituto Agronômico do Paraná, <ruas@sercomtel.com.br>; Depto. Biologia Geral Univ. Estadual de Londrina, 86065-990 Londrina-PR.

RESUMO: Marcadores moleculares contidos entre seqüências curtas de DNA repetitivo (ISSRs) foram utilizados para análise da distância genética entre espécies e para determinação da origem de sete híbridos interespecíficos de *Coffea*. Um total de 14 *primers*, contendo diferentes seqüências simples repetidas (SSR) de DNA, foram combinados dois a dois e usados para amplificação em reações de PCR. As combinações contendo o *primer* (GA)₉+T produziram maior número de marcadores e maior polimorfismo, sugerindo maior freqüência desta classe de dinucleotídeo nos genomas de *Coffea*. Cento e setenta marcadores foram obtidos. Os produtos de amplificação foram analisados pelo método de agrupamentos UPGMA, construído a partir de uma matriz de distância genética. A variação genética interespecífica foi alta, com os valores de distância genética variando de 0,15 entre *C. eugenioides* e *C. kapakata* e 0,66 entre *C. congensis* e *C. liberica* var. *dewevrei*. A espécie *C. arabica* apresentou vários marcadores considerados como diagnósticos, sugerindo que esta espécie é um dos progenitores de cinco dos seis híbridos analisados. Os resultados mostram que marcadores ISSR são úteis para diferenciar espécies e para determinar a paternidade de híbridos interespecíficos de *Coffea*.

Palavras-chave: *Coffea*, híbridos interespecíficos, ISSR, marcadores moleculares, melhoramento genético.

INTERESPECIFIC GENETIC DIFFERENTIATION AND PEDIGREE ANALYSIS IN COFFEA IDENTIFIED USING ISSR MARKERS (INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS)

ABSTRACT: Inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers were used to measure genetic distance among *Coffea* species and for the identification of parentage of interspecific hybrids. A total of 14 simple sequence repeats (SSR) primers were combined in pairs and used for PCR amplifications. The

dinucleotide motif (GA)₉ +T combined with other di- tri- and tetra-nucleotides simple sequence repeats produced greater number of DNA fragments and most of them were polymorphics, suggesting that the poly (GA) is more frequent in the *Coffea* genomes. One hundred and seventy markers were amplified. The products were used to group the *Coffea* species by cluster analysis created from a genetic distance data calculated by UPGMA method. High levels of interspecific genetic variation was revealed. The range of genetic distance was from 0.15 between *C. eugenoides* and *C. kapakata* to 0,66 entre *C. congensis* and *C. liberica* var. *dewevrei*. The specie *C. arabica* shared most of its markers with five of the six hybrids suggesting that this species is one of most likely candidate as a progenitor of these hybrids. These results revealed that ISSR markers can be used to differentiate *Coffea* species and to identification of parentage of *Coffea* interspecific hybrids.

Key words: *Coffea*, intespecific hybrids, ISSR, molecular markers, genetic improvement.

INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* (Rubiaceae) é representado por cerca de 80 espécies, das quais 25 ocorrem na região continental da África Tropical e 55 na ilha de Madagascar (Carvalho et al., 1984), sendo a produção mundial de café concentrada somente nas espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (Berthaud & Charrier, 1988). O estabelecimento de bancos de germoplasmas contendo espécies selvagens e cultivadas, além de diferentes acessos provenientes dos cruzamentos interespecíficos, é de extrema importância para a conservação dos recursos genéticos, assim como para os programas de melhoramento, pois espécies não-domesticadas são geralmente portadoras de genes para características altamente vantajosas, como resistência a doenças e pragas, tolerância a seca, geada, entre outras. Coleções de *Coffea* foram estabelecidas na Costa do Marfim, Madagascar, Costa Rica, Colômbia, Brasil e em outras regiões (Fazuoli et al., 2000).

No Brasil, o Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) mantém um banco de germoplasma com oito espécies de *Coffea* e centenas de acessos de *C. arabica*, *C. canephora* e híbridos interespecíficos. Até recentemente, a diversidade genética em bancos de germoplasma era determinada por marcadores morfológicos ou isoenzimáticos. Entretanto, estes marcadores não se têm mostrado adequados para medir a variabilidade genética de *C. arabica*. A análise de seis padrões isoenzimáticos em acessos de *C. arabica* do Quênia e da Etiópia mostrou ausência de polimorfismo (Louarn, 1978).

Nos últimos dez anos, técnicas que permitem fazer distinção diretamente em nível de DNA têm permitido acessar a variabilidade genética dentro do *pool* gênico das espécies cultivadas, assim como identificar a diversidade disponível dentro de gêneros. Wesh e McClelland (1990) e Williams et al. (1990) introduziram uma técnica em que a detecção de polimorfismo baseia-se na amplificação ao acaso de DNA (RAPD), usando oligonucleotídeos de dez bases. Esta técnica tem se mostrado eficiente na identificação da variabilidade genética em *Coffea* e como uma ferramenta auxiliar em programas de melhoramento. Marcadores RAPD foram usados na análise da diversidade genética em três espécies de *Coffea*, acessos de *C. canephora*, um híbrido interespecífico (híbrido de Timor) (Orozco-Castillo et al., 1994) além de acessos de *C. arabica* (Orozco-Castillo et al., 1994; Lashermes et al., 1996; Anthony et al., 2001). Paillard et al. (1996); utilizando 100 loci de RAPD e 47 loci de RFLP, obtiveram boa cobertura dos principais grupos de ligação de *C. canephora* com 15 grupos de ligação. Ruas et al. (2000), utilizando 150 marcadores de RAPD, mostraram a relação genética entre sete espécies de *Coffea*, bem como a paternidade de seis híbridos interespecíficos. Neste estudo, marcadores ISSR, amplificados a partir de reações com *primers* de seqüências simples repetidas (SSR), foram utilizados para análise da distância genética entre oito espécies de *Coffea* (uma espécie com duas variedades) e para a identificação de possíveis parentais de seis híbridos interespecíficos.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies e os híbridos utilizados neste trabalho fazem parte do banco de Germoplasma mantido no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) de Londrina. Os materiais analisados incluem: *C. arabica* var. *arabica*, *C. canephora* var. *robusta*, *C. canephora* var. *kouillou*, *C. liberica* var. *dewevrei*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. racemosa*, *C. stenophylla*, *C. congensis* e seis híbridos interespecíficos.

Extração, quantificação e amplificação do DNA e Eletroforese

As amostras de folhas jovens de cada espécimen foram coletadas e armazenadas em freezer a -80°C até o uso. Para a extração de DNA, 300 mg de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido seguido da adição de 2,5 mL de tampão de extração, segundo o método do CTAB (Doyle & Doyle, 1987), exceto que o CTAB foi substituído por MATAB (Mixed Alyltrimethylammonium Bromide, Sigma) no tampão de extração. A concentração de DNA foi estimada usando-se um fluorômetro DyNA Quant 200 (Höefer-Pharmacia), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 15 μL contendo 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl); 1,5 mM MgCl_2 ; 0,1 mM de cada dATP, dTTP, dCTP e dGTP; 4 μM de *primer*; 1,8 U de *Taq* polimerase

(Biotoools); e 20 ng de DNA genômico. A amplificação foi feita utilizando um termociclador PTC 100 (MJ Research) 60 tubos, programado com 3 minutos a 94 °C para uma denaturação inicial do DNA, seguida por 39 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 45 segundos a 50 °C e 1 segundo a 72 °C. O ciclo final foi seguido por uma extensão de 7 minutos a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até a eletroforese. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4%, em tampão TAE a uma voltagem constante de 130 V por cerca de duas horas, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV (302 nm).

Análise de dados

Os marcadores obtidos foram avaliados pela presença (1) e ausência (0) de bandas e analisados com o programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses, version 1.3), usando uma matriz de distância genética (Nei, 1978), a partir da qual se contruiu o dendograma utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithemitic Averages). A reprodutibilidade dos padrões de agrupamento foi avaliada com as probabilidades do “bootstrap” calculadas através de 1.000 permutações. A análise da coordenada principal foi feita de acordo com o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers v. 2.1).

Tabela 1 - Sequência e combinações de *primers* SSR utilizados com número total de marcadores amplificados e polimórficos

Relação de Primers	Número de Bandas	Bandas Polimórficas
(GA)9+T + (TC)9	11	11
(GA)9 + (GACA)4	5	5
(TC)9 + (GGAT)4	6	6
(GA)9+C + (TAG)6	8	8
(GACA)4 + (GATA)4	16	16
(AT)9 + (GA)9+T	9	9
(CCTA)4 + (GA)9+T	12	12
(GA)9+T + (TAG)6	11	11
(GA)9+T + (GA)9+C	15	15
(GA)9+T + (GACA)4	7	7
(GA)9+T + (GGAT)4	19	19
(CAG)5 + (GACA)4	5	5
(TTA)6 + (GTG)6	6	6
(GACA)4 + (GTG)6	5	5
(GTG)6 + (GTG)5	8	7
(GA)9+T + (GGTA)4	13	13
(GA)9+C +(GTG)6	4	4
(GA)9+T	3	3
(GA)9+T + (CAG)5	4	4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 170 marcadores ISSR foram obtidos com a amplificação do DNA de oito espécies, sendo uma com duas variedades e seis híbridos interespecíficos de *Coffea* (Tabelas 1 e 2), partir de 19 reações de PCR, envolvendo uso de *primers* de seqüências curtas repetidas (SSR) combinados em pares. O polimorfismo identificado entre as espécies foi alto, com 99,48% dos marcadores se mostrando polimórficos. As relações interespecíficas, bem como a relação entre espécies e híbridos, foram analisadas usando o método de agrupamentos, obtido com base na matriz de distância genética (Nei, 1978) e pela análise da coordenada principal (Tabela 2; Figuras 1 e 2).

Tabela 2 - Distância genética construída com base no coeficiente de Nei (1978), a partir de 170 marcadores ISSR obtidos para espécies e híbridos de *Coffea*.

Nº	População	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Híbrido 1	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Híbrido 2	0.11	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Híbrido 3	0.17	0.17	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Híbrido 4	0.38	0.33	0.30	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Híbrido 5	0.13	0.10	0.19	0.40	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Híbrido 6	0.19	0.19	0.28	0.54	0.19	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>C. arabica</i> v. <i>arabica</i>	0.09	0.07	0.15	0.37	0.07	0.15	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>C. canephora</i> v. <i>robusta</i>	0.19	0.25	0.29	0.52	0.26	0.33	0.22	0.00	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>C. canephora</i> v. <i>kouillon</i>	0.20	0.23	0.26	0.46	0.25	0.27	0.19	0.19	0.00	-	-	-	-	-	-
10	<i>C. liberica</i> var. <i>dewevrei</i>	0.41	0.41	0.28	0.26	0.46	0.59	0.43	0.51	0.47	0.00	-	-	-	-	-
11	<i>C. eugenoides</i>	0.25	0.20	0.34	0.36	0.22	0.37	0.22	0.42	0.42	0.45	0.00	-	-	-	-
12	<i>C. kapakata</i>	0.26	0.26	0.32	0.36	0.29	0.42	0.29	0.40	0.42	0.44	0.15	0.00	-	-	-
13	<i>C. racemosa</i>	0.52	0.48	0.54	0.58	0.45	0.32	0.44	0.51	0.49	0.66	0.45	0.49	0.00	-	-
14	<i>C. stenophylla</i>	0.49	0.47	0.53	0.45	0.45	0.56	0.45	0.52	0.48	0.56	0.44	0.48	0.43	0.00	-
15	<i>C. congensis</i>	0.28	0.36	0.41	0.60	0.36	0.45	0.31	0.22	0.24	0.66	0.47	0.44	0.55	0.60	0.00

A associação entre as espécies mostrou índices de distância genética variando de 0,15 (*C. eugenoides* e *C. kapakata*) a 0,66 (*C. liberica* var. *dewevrei* com *C. congensis* e *C. racemosa*), revelando alto nível de variação genética entre as espécies. A análise dos clusters mostra diferentes índices de distância genética entre *C. arabica* e as outras espécies (Figura 1), sendo as menores distâncias, 0,19 (com *C. canephora* var. *kouillon*) e 0,22 (com *C. canephora* var. *robusta* e *C. eugenoides*). Estes resultados reforçam a hipótese de que *C. canephora* e *C. eugenoides* são os mais prováveis parentais de *C. arabica*. Berthou et al. (1983) sugerem, com base em estudos de DNA de cloroplasto e mitocondrial, uma origem comum para *C. arabica* e *C. eugenoides*. Ruas et al. (2000), utilizando marcadores RAPD, mostraram que *C. eugenoides* pode ser um dos possíveis pais de *C. arabica*, porém não sugerem qualquer relação mais estreita entre *C. arabica* e *C. canephora*. Raina et al. (1998), usando hibridação *in situ* fluorescente

(GISH) com DNA total de várias espécies, mostraram que o DNA genômico de *C. eugenoides* hibridiza-se preferencialmente com 22 cromossomos de *C. arabica*, enquanto os outros 22 cromossomos hibridizaram-se com o DNA genômico de *C. congensis*. Entretanto, Lashermes et al. (1999), utilizando as técnicas de RFLP e GISH, sugerem que *C. eugenoides* e *C. canephora* são os possíveis progenitores de *C. arabica*. *Coffea stenophylla* e *C. racemosa* mostram os maiores índices de distância genética (0,45) com *C. arabica*. Resultados semelhantes foram descritos por Lashermes et al. (1993) e Orozco-Castillo et al. (1994). Estes autores, usando marcadores RAPD, mostraram que *C. arabica* tem baixa afinidade com *C. racemosa* e *C. stenophylla*. Por outro lado, estimativas da distância genética para 3-8 sistemas enzimáticos (Berthou et al., 1980) mostraram que a distância genética entre *C. canephora* e *C. eugenoides* é considerável. Da mesma forma, Charrier e Berthaud (1985) mostraram que *C. eugenoides* apresenta melhor performance em cruzamento com todas as outras espécies de *Coffea* do que com *C. canephora*. Usando 150 marcadores de RAPD, Ruas et al. (2000) mostraram que estas duas espécies apresentam baixa similaridade genética. A análise apresentada no presente estudo é concordante com essas observações, pois mostra uma distância genética de 0,42 entre *C. canephora* e *C. eugenoides* (Tabela 2; Figuras 1 e 2). Assim, os marcadores ISSR podem ser considerados eficientes para estimar a variabilidade genética no gênero *Coffea*.

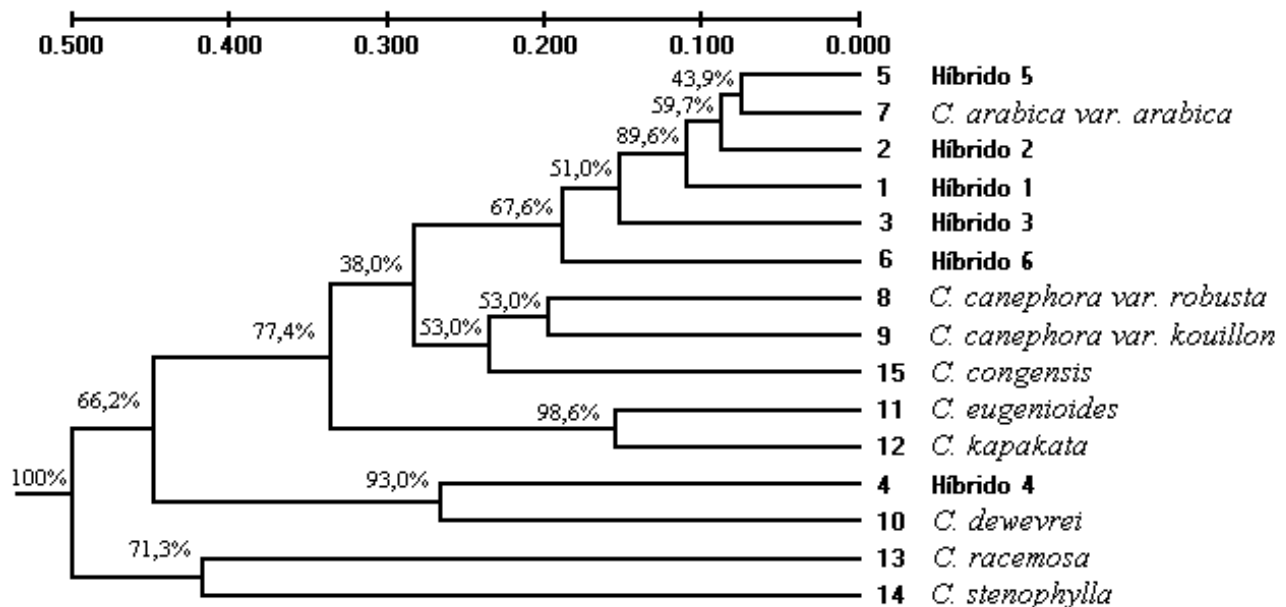


Figura 1 - Dendrograma construído usando o método UPGMA, utilizando 1.000 permutações com o Bootstrap, segundo a distância genética (Nei, 1978) entre as espécies e os híbridos de *Coffea*.

Análise dos híbridos interespecíficos

Os marcadores de ISSR foram também usados na identificação dos prováveis parentais de seis híbridos interespecíficos naturais, identificados pelos números 1 a 6 (Tabela 2). Estes híbridos representam fontes importantes de genes para resistência a várias doenças do café.

Os valores de distância genética mostram alta afinidade entre a espécie *C. arabica* e cinco dos seis híbridos investigados (Tabela 2). Evidências obtidas a partir de características morfológicas sugerem que o híbrido identificado como nº 1 originou-se a partir de cruzamentos entre *C. arabica* e *C. canephora* var. *robusta*. Os dados obtidos com os marcadores ISSR (Tabela 2, Figuras 1 e 2) mostraram que 91% (distância genética de 0,09) dos loci de *C. arabica* e 81% (distância genética de 0,19) dos loci de *C. canephora* var. *robusta* estão representados no híbrido nº 1. O mesmo foi verificado em relação a *C. canephora* var. *kouillou*, que compartilha com este híbrido 80% dos seus loci, deixando evidente que o genoma de *C. canephora* é bem representado no híbrido nº 1. As outras espécies mostraram-se (*C. liberica* var. *dewevrei*, *C. stenophylla* e *C. racemosa*) mais distantes geneticamente deste híbrido (Tabela 2, Figuras 1 e 2). Assim, os dados de ISSR evidenciaram que *C. arabica* e *C. canephora* var. *robusta* são os possíveis progenitores do híbrido nº 1.

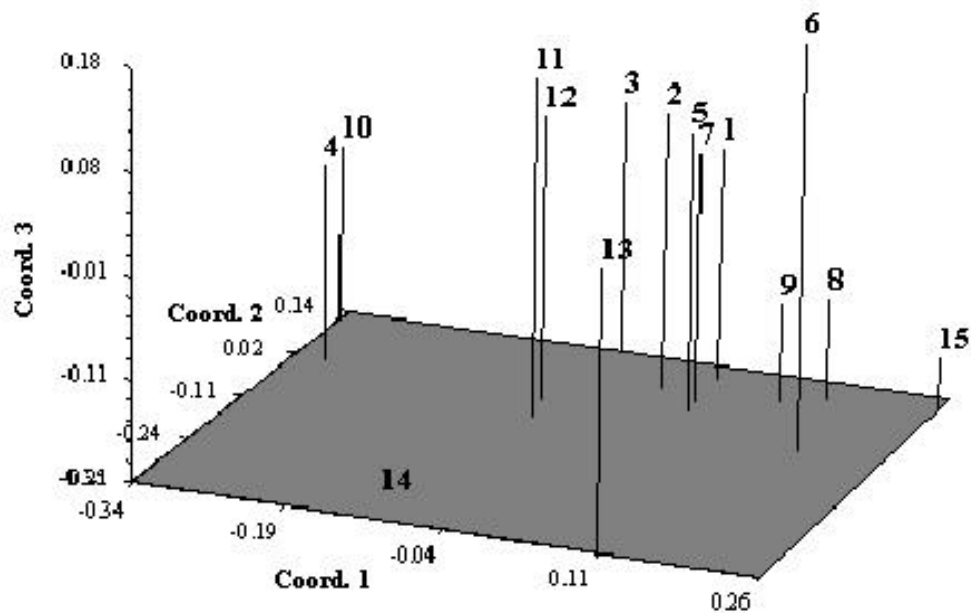


Figura 2 - Coordenada principal mostrando as associações entre espécies e híbridos interespecíficos de *Coffea*. Os números correspondem àqueles citados na Tabela 2.

Os híbridos 2 e 5 mostraram-se altamente relacionados com uma distância genética de apenas 0,10, sugerindo uma origem comum. Os marcadores ISSR mostram que estes híbridos têm uma distância genética de somente 0,07 da espécie *C. arabica* e diferem da espécie *C. eugenioide* em 0,20 e 0,22, respectivamente. Esses resultados são consistentes com os dados de RAPD obtidos por Ruas et al. (2000). Valores superiores de distância genética são observados entre estes híbridos e as outras espécies (Tabela 2, Figuras 1 e 2). O híbrido 5 é um tetraplóide fértil e apresenta padrões morfológicos semelhantes aos de *C. arabica*. Por sua vez, o híbrido 2 é semelhante morfológicamente ao híbrido 5. Portanto, baseado em dados moleculares e morfológicos, pode-se concluir que estes híbridos originaram-se dos cruzamentos entre *C. eugenioides* e *C. arabica*, seguido de recruzamento sucessivos com o parental *C. arabica*.

O híbrido 3 apresentou distância genética de 0,15 com *C. arabica*, 0,26 com *C. canephora* var. *kouillou*, 0,28 com *C. liberica* var. *dewevrei* e 0,29 com *C. canephora* var. *robusta* (Tabela 2, Figuras 1 e 2). Este híbrido é morfológicamente semelhante às espécies *C. arabica* e *C. liberica* var. *dewevrei*, o que está de acordo com os dados de ISSR. Dados de RAPD (Ruas et al., 2000) também mostraram que os possíveis pais deste híbrido são *C. arabica* e *C. liberica* var. *dewevrei*. Assim como *C. liberica* var. *dewevrei*, este híbrido apresenta genes para resistência a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), nematóides (*Meloidogyne* sp) e bicho-mineiro (*Perileucoptera coffeella*), sendo, portanto, uma importante fonte para transferência de genes para as cultivares de *C. arabica*.

O híbrido nº 4 foi o que apresentou maior distância genética com a espécie *C. arabica* (0,37). A maior associação deste híbrido foi com as espécies *C. liberica* var. *dewevrei*, com quem apresentou uma distância genética de 0,26, e *C. eugenioides* e *C. kapakata* (distância genética de 0,36). A distância genética com as outras espécies foi consideravelmente superior e 0,46 com *C. stenophylla* (Tabela 2, Figuras 1 e 2). Este híbrido também apresenta semelhanças morfológicas com *C. arabica*. Dados de RAPD (Ruas et al., 2000) concordam com os marcadores de ISSR de que *C. liberica* var. *dewevrei* é um dos possíveis progenitores deste híbrido. O outro progenitor possível de acordo com os dados morfológicos, ISSR e dados de RAPD (Ruas et al., 2000) deve ser *C. eugenioides*. Este híbrido, tal como o híbrido nº 3, também apresenta genes para resistência a geada, ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e nematóides (*Meloidogyne* sp).

O híbrido nº 6 é triploide e estéril, provavelmente derivado do cruzamento entre progenitores tetraploide e diploide. Os marcadores ISSR revelaram que este híbrido tem menor distância genética com as espécies *C. arabica* (0,15) e *C. canephora* var. *kouillou* (0,27). No entanto, análise de caracteres morfológicos mostra que fenotipicamente este híbrido é semelhante a *C. arabica* (tetraploide) porém as características de folhas estreitas assemelham-se às de *C. racemosa*. Além disso, assim como *C.*

racemosa, este híbrido apresenta genes para resistência à seca, à geada e ao bicho-mineiro. Dos marcadores amplificados em *C. racemosa*, 68% são compartilhados com o híbrido nº 6. Esses resultados concordam com os dados de RAPD (Ruas et al., 2000) que sugerem a origem deste híbrido a partir de cruzamentos envolvendo as espécies *C. arabica* e *C. racemosa*, concordando portanto com as características fenotípicas compartilhadas por estas espécies e o híbrido interespecífico.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os marcadores moleculares de ISSR podem ser aplicados com sucesso para a análise do polimorfismo genético em *Coffea* e para identificar espécies envolvidas na origem de híbridos interespecíficos naturais de *Coffea*. A grande proximidade genética entre *C. arabica* e cinco dos seis híbridos investigados sugere fortemente que esta espécie é um dos prováveis parentais envolvidos na origem desses híbridos.

AGRADECIMENTOS

Ao FUNCAFÉ, CNPq e à Fundação Araucária, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUEIROD, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J. & CHARRIER, A. (2001). Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica** 118: 53-65.
- BERTHAUD, J. & CHARRIER, A. 1988. Genetic Resources of *Coffea*. In: **Coffea Agronomy**, Vol. 4, R.J. Clarke & R. Macrae (eds.), Elsevier Applied Science Publishers Ltda, pp. 1-42.
- BERTHOUS, F.; TROUSLOT, P.; HAMON, S.; VEDEL, F. & OUETIER, F. 1980. Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers: variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages: *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*. *Café Cacao Thé*, 624, 313-326.
- BERTHOUS, F.; MATHIEU, C. & VEDEL, F. 1983. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationship in genus *Coffea* L. *Theor. Appl. Genet.*, 65, 77-84.

- CARVALHO, A.; MEDINA-FILHO, H.P. & FAZUOLI, L.C. 1984. Evolução e melhoramento do cafeeiro. In: Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas, M.L.R. Aguiar-Perecin, P.S. Martins & G. Bandel (eds.), Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, S.P., Brazil. Pp. 215-235.
- CHARRIER, A. & BERTHAUD, J. 1985. Botanical classification of coffee. In: **Coffee, Botany, Biochemistry and Production of beans and beverage**. Ed. Clifford & Wilson. AVI, Publishing Company Inc. 457.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19(1): 11-15.
- FAZUOLI, L.C.; MALUF, M.P.; GUERREIRO-FILHO, O.; MEDINA-FILHO, H.P.; SILVAROLLA, M.B. (2000). Breeding and biotechnology of coffee. In: *Coffee Biotechnology and Quality. Proceedings of the 3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agro-Industry*. Edited by T. Sera, C.R. Socol, A. Pandey e S. Roussos. Kluwer Academic Publishers.
- LASHERMES, P.; CROS, J.; MARMEY, P. & CHARRIER, A. 1993. Use of random amplified DNA markers to analyze genetic variability and relationship of *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 40, 91-99.
- LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; 7 CHARRIER, A. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivates and wild accessions of *Coffea arabica*. **Eyphytica**, 87, 59-64.
- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERTS, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONI, F. & CHARRIER, A. 1999. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molec. Gen. Genet.**, 261, 259-266.
- LOUARN, J. 1978. Diversité comparée des descendantes de *Coffea arabica* obtenues em autofécondation et em fécondation libre au Tonkoui. In: **Etude de la Structure et de la Variabilité Génétique des Caféiers**, A. Charrier (ed.), IFCC Bulletin, n. 14, pp. 75-78.
- NEI, M. (1978). Estimation of overage heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetic.**, 89: 593-590.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHARMERS, K.J. & POWELL, R.W. 1994. detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffe using RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, 87, 934-940.
- PAILLARD, M.; LASHERMES, P. & PÉTRARD, V. (1996). Construction of a molecular linkage maps in coffee. **Theor. Appl. Genetic.**, 93: 41-47.
- RAINA, S.N.; MUKAI, Y. & YAMAMOTO, M. 1998. In situ hybridization identifies the diploid progenito species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). **Theor. Appl. Genet.**, 97, 1204-1209.
- RUAS, P.M.; DINIZ, L.E.C.; RUAS, C.F.; SERA, T.(2000). Genetic Polymorphism in species and hybrids of *Coffea* revealed by RAPD. In: *Coffee Biotechnology and Quality. Proceedings of the*

3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agro-Industry. Edited by T. Sera, C.R. Socol, A. Pandey e S. Roussos. Kluwer Academic Publishers.

WILLIAMS, J.G.K.; JUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. & RAFALSKI, J.A. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nuclie Acids Research**, 18: 6531-6535.