



THAMIRIS BANDONI PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA À *Meloidogyne exigua*
EM CAFEIEIRO**

**LAVRAS - MG
2015**

THAMIRIS BANDONI PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS
À RESISTÊNCIA À *Meloidogyne exigua* EM CAFEIEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Antônio Nazareno Guimarães Mendes

Coorientador

Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho

LAVRAS – MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Thamiris Bandoni.

Identificação de marcadores moleculares associados à resistência à *Meloidogyne exigua* em cafeeiro / Thamiris Bandoni Pereira. – Lavras : UFLA, 2015.

112 p.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Antônio Nazareno Guimarães Mendes.

Bibliografia.

1. Marcadores moleculares. 2. Resistência a nematoides. 3. Melhoramento genético. 4. Cafeeiro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

THAMIRIS BANDONI PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS
À RESISTÊNCIA À *Meloidogyne exigua* EM CAFEIEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2015.

Dr. Juliano Lino Ferreira	EMBRAPA
Dra. Sônia Maria de Lima Salgado	EPAMIG
Dr. Tesfahun Alemu Setotaw	EPAMIG
Dra. Vânia Aparecida Silva	EPAMIG

Dr. Antônio Nazareno Guimarães Mendes
Orientador

Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho
Coorientador

**LAVRAS – MG
2015**

*A Deus e Nossa Senhora,
pelo dom da vida e por me iluminar em todos os momentos.*

AGRADEÇO

*Ao meu orientador, Antônio Nazareno Guimarães Mendes,
pelos ensinamentos tão valiosos.*

*A minha irmã e meu cunhado, pelo exemplo, amizade,
apoio e companheirismo.*

*Aos meus afilhados, Matheus, Gustavo e Vinícius por me ensinarem
que a felicidade está nas coisas mais simples.*

*Ao meu namorado, Raoni, pelo carinho, amor, amizade e pela presença
em todos os momentos.*

*A todos os meus amigos, por sempre me apoiarem
e aceitarem minhas ausências.*

OFEREÇO

*Aos meus pais, Marcos Antônio e Lúcia, pela fonte inesgotável de
carinho e apoio para que eu pudesse realizar mais um sonho.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por me guiar em todos os momentos.

A **Nossa Senhora**, fonte inesgotável de inspiração e amor!

À **Universidade Federal de Lavras (UFLA)**, **Pró-Reitoria de Pós-Graduação** e ao **Departamento de Agricultura**, por meio de seus professores e funcionários, pela oportunidade de realizar este trabalho e concluir este curso.

À **Comissão Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, ao **Consórcio Pesquisa Café** e ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT Café)** pela concessão da bolsa de estudos e dos recursos para a realização deste trabalho.

À **Empresa de Pesquisas Agropecuárias de Minas Gerais (EPAMIG)**, pelo auxílio de seus pesquisadores assim como pelo laboratório de Biotecnologia utilizado nas análises moleculares.

Ao professor, **Antônio Nazareno Guimarães Mendes** pela orientação, amizade, conselhos, profissionalismo e todo o auxílio na minha formação pessoal e profissional.

Aos pesquisadores, **Gladyston Rodrigues Carvalho** e **Sônia Maria de Lima Salgado** pela amizade, orientação e total envolvimento com o trabalho realizado.

Ao pesquisador **Tesfahun Alemu Setotaw** pelo auxílio durante todas as etapas do desenvolvimento do trabalho e ainda pelas palavras de ânimo quando este me faltava.

A todos os colegas do **Laboratório de Biotecnologia da EPAMIG** pela acolhida e por todo o auxílio durante as análises moleculares, em especial a colega Dalilha.

Ao **Ramiro Machado Rezende** pelas análises fenotípicas.

À secretária do **Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia**, Marli, pela paciência e auxílio tão valiosos.

Ao **Raoni** pelo amor, paciência, apoio e auxílio a mim dedicados.

A todos meus familiares, por todo o apoio durante a realização deste trabalho.

Aos colegas da **Cocatrel**, pelo apoio e ensinamentos tão valiosos para minha formação.

Por fim, a todos os colegas do **Núcleo de Estudos em Cafeicultura**, incluindo os estudantes de graduação e pós-graduação, que contribuíram direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Um dos fatores limitantes para o crescimento e obtenção de altas produtividades no cafeeiro são os fitonematoides. Objetivou-se identificar em condições de casa de vegetação e de campo, a associação entre marcadores microssatélites e AFLP com a resistência ao nematoide *M. exigua* em cafeeiro, a fim de selecionar consistentes marcadores moleculares que poderão ser utilizados em futuros trabalhos de melhoramento genético. O experimento instalado em casa de vegetação avaliou 82 progênies de cafeeiro em geração F₅, derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor 440-10 e Catuaí Amarelo IAC 86. As características fator de reprodução e índice de galhas foram avaliadas aos 320 dias da inoculação do nematoide. Verificou-se que das 44 combinações de iniciadores microssatélites testados, 11 apresentaram polimorfismo nos parentais. Nas progênies estudadas observou-se média de 4,5 alelos polimórficos por iniciador. Por meio das análises de agrupamento dos alelos polimórficos verificou-se que as progênies foram agrupadas em três principais grupos, sendo que estes se relacionaram com a reação ao nematoide. Os marcadores SSR Café 20 alelo 3 (100 pares de bases), SSR Café 40 alelo 2 (250 pares de bases) e SSR Café 15 alelo 3 (190 pares de bases) e se associaram a resistência à *M. exigua* nas progênies F₅ de cafeeiro. Marcadores AFLP foram utilizados objetivando realizar um mapeamento associativo com 22 progênies de *C. arabica* em geração F₄ e identificar marcadores moleculares associados à resistência à *M. exigua*. Foram avaliadas as seguintes características: população de *M. exigua* por grama de raiz, população de *M. exigua* por 100 cc de solo, número de galhas e vigor vegetativo, sendo essas avaliações realizadas em janeiro e julho. Para as análises moleculares foram utilizadas 11 combinações de iniciadores AFLP, sendo que as progênies apresentaram média de 14,4 alelos polimórficos por combinação. De acordo com as análises de agrupamento utilizando as análises genotípicas e fenotípicas, as progênies foram agrupadas em quatro grupos. Por meio da estrutura genética foram identificados 2 grupos (K=2), sendo que 90% das progênies resistentes se inseriram no mesmo grupo. Foi utilizada uma abordagem de modelo linear misto (MLM) para o mapeamento associativo, sendo verificado marcadores AFLP associados à reação à *M. exigua*.

Palavras-chave: Nematoides. AFLP. Microssatélites. *Coffea arabica*.

ABSTRACT

One of the limiting factors for the growth and high productivity in coffee are phytonemtododes. This work was done with the objective of identifying microsatellite and AFLP markers associated with the resistance of *M. exigua* in coffee under the field and greenhouse condition, that can be used in the future genetic improvement programs. Under the greenhouse condition 82 F₅ progenies of coffee seedlings derived from the crossing of Híbrido de Timor and Catuaí Amarelo IAC 86 were planted and the measurements (reproduction factor and index of galls) were evaluated after 320 days of nematode inoculation. It was verified that among the 44 SSR markers tested 11 primers became polymorphic between parents. In the progenies studied, it was observed 4.5 polymorphic alleles per primer. The clustering analysis of the progenies based on the polymeric alleles grouped the progenies into three groups and these groups have relation with the nematode reaction. The markers SSR Café 20 allele 3 (100bp), SSR Café 40 allele 2 (250bp), and SSR Café 15 allele 3 (100bp) are associated with the resistance of nematodes *M. exigua* in the progenies. The AFLP marker was used with the objective of realizing association mapping in 22 F₄ progenies of coffee and identify the AFLP markers associated with resistance to nematode *M. exigua*. The population of *M. exigua* per grams of root, *M. exigua* per 100 cc of soil, number of galls and vegetative vigor were evaluated in January and July. For the molecular analysis eleven AFLP primer combinations were used and 14.4 polymorphic alleles per primer combination were observed among the progenies. The clustering analysis based on the molecular data and the phenotypic data grouped the progenies into 4 cluster groups. Based on the population structure analysis the progenies were grouped into 2 groups (K=2), being the 90 percent of the resistant progenies included in the same group. The Mixed Linear Model (MLM) model was used for association mapping analysis and identified AFLP markers associated with the resistance of nematode *M. exigua*.

Keywords: Nematodes. AFLP. Microsatellites. *Coffea arabica*.

LISTA DE FIGURAS

	CAPÍTULO 1	
Figura 1	Mapa genético da região cromossômica contendo o loco <i>Mex-1</i> em café associado a resistência a <i>M. exigua</i> baseado em uma população F ₂	35
	CAPÍTULO 2	
Figura 1	Estimativa de dissimilaridade genética, por meio dos marcadores microssatélites, utilizando o método de agrupamento UPGMA.....	68
Figura 2	Análise das coordenadas principais por meio dos marcadores microssatélites, das 82 progênies de cafeeiro juntamente com os parentais Catuaí Amarelo IAC 86 e Híbrido de Timor 440-10.....	70
	CAPÍTULO 3	
Figura 1	Análise das coordenadas principais por meio dos marcadores AFLP, das progênies de cafeeiro juntamente com as cultivares utilizadas como testemunha.....	96
Figura 2	Estimativa de dissimilaridade genética, utilizando as características referentes ao comportamento das progênies a <i>M. exigua</i> e vigor vegetativo, utilizando o método de agrupamento UPGMA.....	98
Figura 3	Estimação do número de grupos por meio dos valores de delta K por meio do programa STRUCTURE HAVESTER.....	100
Figura 4	Teste de atribuição para as progênies de <i>C. arabica</i> avaliadas (k=2). Cada subgrupo é representado por uma cor e os indivíduos estão representados por linhas verticais com seus respectivos números. Diferentes cores em um mesmo indivíduo indicam a percentagem do genoma compartilhado com cada grupo.....	101
Figura 5	Diagrama de caixas “boxplots” das subpopulações formadas por meio da estrutura genética com base nas características referentes ao nematoide.....	102
Figura 6	População média de <i>M. exigua</i> por grama de raiz nas progênies estudadas e presença (amarelo) ou ausência (cinza) do locus <i>Mex-1</i> utilizando o marcador Exi-5.....	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Identificação das testemunhas e das progênes de cafeeiro previamente selecionadas em área naturalmente infestada por <i>M. exigua</i>	56
Tabela 2	Marcadores microssatélites utilizados, suas sequências e tamanho esperado dos alelos.....	59
Tabela 3	Marcadores microssatélites polimórficos, número de alelos polimórficos obtidos e percentagem de polimorfismo nas progênes de <i>C. arábica</i>	67
Tabela 4	Marcadores microssatélites associados ao fator de reprodução de <i>M. exigua</i> nas progênes F ₅ de cafeeiro...	72
Tabela 5	Marcadores microssatélites associados ao índice de galhas de <i>M. exigua</i> nas progênes F ₅ de cafeeiro.....	73

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Relação e genealogia das progênes em geração F ₄ avaliadas no município de Campos Altos – MG.....	87
Tabela 2	Código dos marcadores e suas combinações <i>EcoRI/MseI</i> ..	91
Tabela 3	Marcadores AFLP associados a reação das progênes de <i>C. arábica</i> e a população do nematoide no solo.....	104

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	14
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Morfologia e aspectos genéticos do cafeeiro	17
2.2	Aspectos gerais de <i>Meloidogyne</i> spp.	19
2.3	Melhoramento genético do cafeeiro visando à resistência a nematoides	22
2.4	Marcadores moleculares no cafeeiro	26
2.4.1	Marcadores AFLP	29
2.4.2	Marcadores microssatélites	31
2.5	Marcadores moleculares relacionados à resistência a nematoides	33
	REFERÊNCIAS	37
	 CAPÍTULO 2 Identificação de marcadores microssatélites associados à resistência à <i>Meloidogyne exigua</i> em cafeeiro.....	50
1	INTRODUÇÃO	53
2	MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1	Progênes	56
2.2	Avaliação da resistência à <i>M. exigua</i>	57
2.3	Extração e quantificação do DNA	58
2.4	Marcadores microssatélites	59
2.5	Análises estatísticas	64
2.6	Identificação e análise de marcadores para associação com a resistência à <i>M. exigua</i>	64
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76

	CAPÍTULO 3 Mapeamento associativo para reação de progênies de cafeeiro à <i>Meloidogyne exigua</i>.....	82
1	INTRODUÇÃO.....	85
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	87
2.1	Progênies.....	87
2.2	Avaliação das características nematológicas e vigor vegetativo.....	89
2.3	Extração e quantificação do DNA.....	90
2.4	Marcadores AFLP.....	90
2.5	Análises estatísticas.....	92
2.5.1	Estrutura genética.....	93
2.5.2	Análises referentes ao mapeamento associativo.....	93
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
3.1	Estrutura genética.....	99
3.2	Mapeamento associativo.....	103
4	CONCLUSÕES.....	107
	REFERÊNCIAS.....	108

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à divisão das Fanerógamas, família Rubiaceae e gênero *Coffea* L. Nesse gênero estão incluídas um grande número de espécies, porém apenas duas são exploradas economicamente a nível mundial, sendo elas: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. O estado maior produtor de *C. arabica* é Minas Gerais, respondendo por mais de 70% do total produzido no país, enquanto *C. canephora* é cultivado principalmente no estado do Espírito Santo.

Um dos grandes problemas enfrentados pelos cafeicultores é a presença dos fitonematoides, organismos microscópicos que limitam o crescimento e a produção dos cafeeiros. Diversas espécies já foram relatadas parasitando o cafeeiro, sendo que *Meloidogyne exigua* Goeldi merece destaque por apresentar alta disseminação em áreas cafeeiras produtoras, dificultar a absorção e translocação de água e nutrientes pela planta, resultando, algumas vezes, em queda de até 45% na produtividade. A resistência genética é a medida de controle mais correta, econômica e eficaz (ALPIZAR; ETIENE; BERTRAND, 2007; SALGADO; REZENDE, 2010).

O desenvolvimento de métodos alternativos que podem auxiliar no melhoramento do cafeeiro é de grande importância, visto que podem proporcionar maior eficiência, velocidade e direcionamento para esses programas. Nesse contexto insere-se os marcadores moleculares que oferecem uma série de vantagens, entre elas: estabilidade, redução no número de plantas testadas em comparação a seleções fenotípicas, detecção de variabilidade em todos os tecidos vegetais, independente do ambiente e da fase de desenvolvimento visto que as progênies podem ser avaliadas enquanto sementes ou plântulas (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

Entre os marcadores utilizados no cafeeiro, estão os microssatélites ou “Simple Sequence Repeat” (EDWARDS et al., 1991) que são fragmentos de DNA de um a seis nucleotídeos repetidos em sequência que estão espalhados ao acaso no

genoma com frequência relativamente alta. Esses marcadores têm sido preferidos em relação a outras técnicas por apresentar alta variabilidade, natureza multialélica, herança codominante, alto rendimento da genotipagem e ainda, ampla cobertura do genoma. Outro grupo de marcadores moleculares são os AFLP ou “Amplified Fragment Length Polymorphism” (VOS et al., 1995), esses marcadores analisam diferentes regiões do genoma e permitem a amplificação de um grande número de fragmentos, sendo extensivamente estudados a fim de verificar a diversidade genética em diferentes espécies.

Entre as metodologias utilizadas com o objetivo de associar a presença de alelos com características fenotípicas, estão a análise de regressão múltipla de “*stepwise*” e o mapeamento associativo. Na primeira, a cada passo, todas as marcas previamente incluídas no modelo são testadas via teste de F, para sua permanência. Desse modo, um marcador previamente adicionado ao modelo, pode ser eliminado em um passo subsequente, assim como um marcador pode ser adicionado. Enquanto o mapeamento associativo é uma metodologia recente utilizada para estabelecer associações entre o polimorfismo genético e a variação fenotípica e tem apresentado sucesso na identificação de genes envolvidos no florescimento, produção e resistência a doenças em diferentes culturas. Essas metodologias podem ser utilizadas na seleção assistida por marcadores (SAM), associando alelos de interesse e possibilitando selecioná-los nas progênies estudadas, agilizando assim os programas de melhoramento genético.

Na cultura do cafeeiro os trabalhos, associando marcadores moleculares com a resistência aos nematoides são escassos, sendo inédito o estudo com marcadores do tipo microssatélite. Diante do exposto objetivou-se com o presente trabalho selecionar marcadores moleculares microssatélites e AFLP relacionados à resistência à *Meloidogyne exigua*, em progênies de cafeeiro derivadas de Híbrido de Timor e Catuaí.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Morfologia e aspectos genéticos do cafeeiro

O cafeeiro pertence à divisão das Fanerógamas, classe Angiospermae, subclasse Eudicotiledonea, ordem Rubiales, família Rubiaceae, tribo Coffeae, subtribo Coffeinae, e gênero *Coffea* L. (CARVALHO, 2008). Esse gênero encontra-se dividido em dois subgêneros, *Coffea* (95 espécies) e *Baracoffea* (oito espécies) e agrupa um total de 103 espécies (MAURIN et al., 2007).

De modo geral, as espécies do gênero *Coffea* são árvores e arbustos perenes, de madeira densa e dura, apresentam ramificações plagiotrópicas, inflorescências axilares pareadas, presença de cálculo, cálice truncado a ondulado ou levemente lobado, flores hermafroditas, corolas de coloração branca ou levemente róseas, botões florais com pétalas sobrepostas e contorcidas para a esquerda, anteras protraídas e semiprotraídas no subgênero *Baracoffea*; frutos com duas sementes e estas com a presença de um sulco longitudinal na superfície plana (DAVIS et al., 2006; MAURIN et al., 2007).

Entre as espécies de *Coffea* testadas para a exploração comercial, apenas três apresentam características favoráveis ao cultivo, sendo elas: *Coffea arabica* L., *Coffea canephora* Pierre ex Froehner e *Coffea liberica* Bull. Ex Hiern (BERTHAUD; CHARRIER, 1985). Atualmente, apenas as duas primeiras têm importância econômica em escala mundial, pois as plantações de *C. liberica* foram dizimadas por uma epidemia entre as décadas de 1940 e 1950 (ROMERO et al., 2014).

A morfologia das espécies *C. canephora* e *C. arabica* é bem semelhante (FERRÃO et al., 2007), se diferenciando no fato da espécie *C. canephora* apresentar plantas multicaules e folhas maiores e de coloração verde menos intensa (FAZUOLI, 1986). As demais espécies do gênero compõem um acervo de genes e alelos utilizados nos programas de melhoramento genético com o objetivo de obter cultivares mais

produtivas, com resistência a pragas e doenças e/ou melhor adaptadas a alguma condição específica. Davis et al. (2006) salientam a possibilidade de extinção de populações naturais e vulnerabilidade das coleções de germoplasma *ex situ*. Na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) verifica-se que das 103 espécies dentro do gênero *Coffea*, 72 encontram-se sob algum nível de ameaça de extinção.

C. arabica abrange como região de origem o sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia e é a única espécie tetraploide ($2n=4x=44$ cromossomos) dentro do gênero *Coffea* (MENDES, 1949). A espécie se reproduz por autogamia, de modo que, aproximadamente 90% de suas flores são autofecundadas (BERTHAUD; CHARRIER, 1985; FERRÃO et al., 2007).

A base genética de *C. arabica* é bastante estreita (CARVALHO, 1993), pois todas as cultivares disponíveis atualmente são provenientes das formas botânicas, *Typica* e *Bourbon* (ANTHONY et al., 2002). Trabalho recente realizado por Setotaw et al. (2013) utilizando 121 cultivares de *C. arabica* lançadas no Brasil, demonstrou pequena diversidade genética entre as mesmas. De acordo com os autores, apenas sete ancestrais contribuíram com 97,5% da base genética das cultivares estudadas.

As demais espécies dentro do gênero *Coffea* são diploides ($2n=2x=22$ cromossomos) (MENDES, 1949), incluindo *C. canephora*, que se reproduz via alogamia, sendo que suas populações são constituídas por grande variabilidade (MAURIN et al., 2007). Essa espécie apresenta autoincompatibilidade associada a um único loco S, que possui uma série alélica que interage em um sistema gametofítico. *C. canephora* é originária do continente africano, encontrada em extensas áreas da República da Guiné, Costa do Marfim, Libéria, Sudão e Uganda (BERTHAUD; CHARRIER, 1985).

A espécie *C. arabica* possui grande importância econômica no Brasil e no mundo, sendo o Brasil seu maior produtor e exportador. Devido à sua qualidade de bebida superior, a espécie responde por 60 a 70% do café produzido no mundo. Em 2014, a produção brasileira de café arábica foi estimada em 32 milhões de sacas, produzidas principalmente no estado de Minas Gerais, com aproximadamente 22,6 milhões de sacas, enquanto a produção de *C. canephora* foi estimada em 13 milhões de sacas no mesmo ano, sendo o estado do Espírito Santo seu maior produtor (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

2.2 Aspectos gerais de *Meloidogyne* spp.

Os fitonematoides são patógenos que causam danos a uma série de culturas de exploração econômica, a exemplo do cafeeiro. Dependendo da espécie e do nível populacional, além de causar redução do vigor e produtividade, pode levar a planta à morte. De acordo com Salgado e Rezende (2010), a importância econômica de cada espécie é determinada pela sua patogenicidade, extensão de danos e prejuízos e pela facilidade de adaptação e disseminação nas diversas regiões. Muitos gêneros têm sido encontrados parasitando as raízes de cafeeiros no Brasil, sendo os mais prejudiciais *Meloidogyne* e *Pratylenchus*.

O gênero *Meloidogyne*, também conhecido como nematoides de galhas, compreende mais de 90 espécies descritas, dentre as quais 17 já foram relatadas parasitando o cafeeiro *C. arabica* no mundo (CAMPOS; VILLAIN, 2005; CARNEIRO; COEFCEWICZ, 2008). *Meloidogyne exigua* Goeldi, *Meloidogyne incognita* Kofoid e White e *Meloidogyne paranaensis* Carneiro et al. (1996), são consideradas as espécies mais importantes e

responsáveis por grandes prejuízos econômicos à cafeicultura brasileira (CAMPOS; VILLAIN, 2005; SALGADO; REZENDE, 2010).

O *M. exigua* foi descrito inicialmente por Goeldi, em 1887, sendo esta, a primeira constatação de uma espécie desse gênero causando danos a uma cultura de exploração econômica (TAYLOR; SASSER, 1978). Essa espécie causa galhas arredondadas em raízes novas (SALGADO; REZENDE, 2010), provoca alterações no estado nutricional do cafeeiro decorrente da deficiente absorção e translocação de água e nutrientes, ocasionando uma conseqüente queda na produtividade (BARBOSA et al., 2004; BARBOSA; SOUZA; VIEIRA, 2010). Outro sintoma é a presença de áreas necróticas nas raízes, que podem ser agravadas por infecções secundárias, levando à seção da raiz atacada à morte (CAMPOS; VILLAIN, 2005). Campos (1999) cita que em áreas com baixa população de *M. exigua*, a cultura sustenta altas produções até determinado limite populacional, quando então começa a declinar, sendo observadas perdas de até 45% na produção do cafeeiro em áreas com alta população do nematoide (BARBOSA et al., 2004).

O *M. exigua* pode ser encontrado na maioria das regiões produtoras de diversos países (CAMPOS; VILLAIN, 2005), sendo a espécie de *Meloidogyne* mais difundida no estado de Minas Gerais (CASTRO et al., 2008; SANTOS et al., 1998). No sul de Minas Gerais, Castro et al. (2008) observaram a presença de *M. exigua* em 95,1% dos municípios amostrados e em 24% das amostras. Essa alta ocorrência de *M. exigua* em Minas Gerais confirma a grande disseminação anteriormente constatada por Souza, Maximiniano e Campos. (1999). No Rio de Janeiro, no levantamento realizado por Barbosa et al. (2004), os autores demonstraram a presença do nematoide em 6 dos 7 municípios e em até 70% das lavouras amostradas. Devido à ampla disseminação de *M. exigua*

nas regiões produtoras, verificou-se aumento populacional gradativo nas áreas infestadas e possibilidade de disseminação para novas áreas.

O *M. paranaensis* foi descrito em cafezais no Brasil em 1996, fazendo parte dos nematoides fitoparasitas mais importantes no país (CARNEIRO et al., 1996). No Paraná, esta espécie é a predominante parasitando cafeeiros (KRZYZANOWSKI et al., 2001).

No estado de Minas Gerais, existem poucos relatos da ocorrência de *M. paranaensis* em cafeeiros (CASTRO; CAMPOS, 2004; CASTRO; NAVES; CAMPOS, 2003; RIBEIRO et al., 2014; SANTOS, 1998). Mais recentemente Ribeiro et al. (2014) observaram a presença de *M. paranaensis* em lavouras de café, nos municípios de Alpinópolis e Coqueiral, ambas localizadas no sul de Minas Gerais. Apesar da ocorrência desta espécie ser limitada a determinadas áreas no Estado, há o risco de disseminação para outras áreas cafeeiras por meio de enxurradas e da utilização compartilhada de máquinas e implementos, prática muito comum realizada pelos agricultores (RIBEIRO et al., 2014).

Lordello e Mello Filho (1970) observaram a presença de um nematoide causando devastantes efeitos nas plantações de café do estado de São Paulo, sendo esse constatado como *M. incognita* (KOFOID; WHITE, 1919). Posteriormente, a presença desse nematoide foi confirmada nos mais diferentes estados produtores de café (GUERRA NETTO; D'ANTONIO, 1984; LORDELLO; LORDELLO, 1972).

O *M. incognita* apresenta ampla gama de hospedeiros, alta agressividade (ROBERTS, 1995), persistência no solo na ausência de plantas hospedeiras e o hábito de infectar a raiz principal do cafeeiro (LORDELLO; MELO FILHO, 1970). De acordo com Kubo et al. (2001) essa é a espécie de fitonematoides de maior distribuição em cafeeiros no estado de São Paulo, sendo encontrado em 10,7 a 24,5% das amostras.

De acordo com Salgado e Rezende (2010) os principais sintomas do parasitismo por *M. incognita* e *M. paranaensis* são danos drásticos na integridade das raízes, como escamações na superfície com aspecto semelhante ao de cortiça, descascamento, rachaduras e pontos de lesões necróticas. Segundo Ferraz (2008) na parte aérea os sintomas das plantas infectadas são clorose, desfolhamento, redução no crescimento, podendo chegar à morte da planta.

A intolerância das cultivares de *C. arabica* aos nematoides *M. incognita* e *M. paranaensis* constitui fator limitante tanto para a implantação de cafezais novos como para a manutenção de cafezais em áreas contaminadas (GONÇALVES; SILVAROLLA, 2001).

2.3 Melhoramento genético do cafeeiro visando à resistência a nematoides

Atualmente, uma das formas de controle dos nematoides do gênero *Meloidogyne* é a utilização de nematicidas. Porém, além de apresentarem custo elevado, também oferecem riscos à segurança humana e ambiental (ALPIZAR; ETIENE; BERTRAND, 2007), sendo, portanto, pouco viável. A Alternativa seria a rotação de culturas (SALGADO; REZENDE, 2010), mas esta também é inviável devido à condição perene do cafeeiro (REZENDE et al., 2013).

A alternativa de manejo mais satisfatória é a utilização de cultivares resistentes, a qual segundo diversos autores (ALPIZAR; ETIENE; BERTRAND, 2007; BOISSEAU et al., 2009; CAMPOS; VILLAIN, 2005; SALGADO; REZENDE, 2010) é a mais eficiente, ambientalmente segura, econômica e de fácil empregabilidade pelos cafeicultores.

Albuquerque et al. (2010) citam que uma das prioridades nos programas de melhoramento nos países produtores de café é a resistência à *Meloidogyne* sp. A resistência genética tem sido utilizada principalmente para os nematoides endoparasitas sedentários, como os do gênero *Meloidogyne*, que apresentam

uma interação especializada com seus hospedeiros. Os mecanismos de defesa da planta resistente são expressos de modo a interferir nas fases de desenvolvimento do nematoide. Assim, nas plantas que apresentam resistência às espécies do gênero *Meloidogyne*, ocorre a penetração de juvenis, no entanto, seu desenvolvimento ou a reprodução são prejudicados (ROBERTS, 2002).

Para obtenção de cultivares de *C. arabica* com boas características agronômicas e resistentes às pragas e doenças, uma considerável fonte de diversidade genética constitui em um híbrido intraespecífico derivado do cruzamento espontâneo entre *C. arabica* e *C. canephora*, denominado Híbrido de Timor. Acessos de Híbrido de Timor representam valiosas fontes de resistência para o melhoramento genético do cafeeiro. Esse híbrido alia resistência ao nematoide de galhas, à ferrugem do cafeeiro (LASHERMES et al., 2000) e a bacterioses causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *kahawae* com altas produtividades (PINTO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2005). Materiais de Híbrido de Timor têm sido cruzados com cultivares comerciais como a Caturra, a Villa Sarchi ou Catuaí, originando Catimores, Sarchimores ou Cavimores, respectivamente (PEREIRA et al., 2010).

Pereira et al. (2012) e Ribeiro et al. (2005) verificaram resistência à *M. exigua* em progênies de *C. arabica* derivadas de Híbrido de Timor, semelhantes ao padrão de resistência Apoatã IAC 2258, sendo a resistência considerada dominante e monogênica (GONÇALVES; SILVAROLLA, 2007). Rezende et al. (2013) avaliando a resistência ao nematoide em condições de campo, observaram progênies derivadas de Híbrido de Timor resistentes e indicaram alta correlação negativa entre produtividade e parasitismo do nematoide.

Trabalhos de pesquisa relatados por Salgado, Resende e Campos (2005) demonstraram que a resistência à *M. exigua* é de ocorrência comum em introduções de várias espécies de *Coffea*, inclusive *C. arabica* oriundas da

Etiópia, germoplasma de Icatu, Catimor e Híbrido de Timor. Essas populações têm sido constatadas como fontes de resistência à *M. paranaensis* (MATA et al., 2002; SERA et al., 2004) e a algumas raças de *M. incognita* (GONÇALVES; SILVAROLLA, 2001; MATA et al., 2002), porém segregantes para essa característica, sendo necessários testes a fim de confirmar a resistência. A espécie *C. congensis* também origina plantas resistentes a *M. incognita* e *M. paranaensis* (GONÇALVES; LIMA; FAZUOLI, 1988).

Estudos demonstram que a resistência do cafeeiro ao nematoide das galhas é bastante complexa, uma vez que diferentes espécies, raças e biotipos de nematoides vivem em mistura no solo. Assim, deve-se considerar a complexidade inter e intraespecífica das populações desse nematoide. Essa diversidade nas populações de *Meloidogyne* dificulta a seleção de fontes de resistência nesse gênero (SALGADO; REZENDE, 2010). Barbosa, Vieira e Souza (2008) encontraram resultados diferenciados quanto à resistência à *M. exigua* em cafeeiros Iapar 59, Acauã, Catucaí 785 / 15, Tupi e IAC Apatã 2258, indicando a possibilidade das diferenças serem devidas à variabilidade da população fluminense de *M. exigua* ou à variabilidade genética do cafeeiro. De fato Muniz et al. (2009) encontraram alta reprodução de *M. exigua*, população do município de Bom Jesus de Itabapoana, RJ, em genótipos de café portadores do gene de resistência *Mex-1*, a exemplo das cultivares Iapar 59 e Paraíso. Os autores salientam a presença de diversidade fisiológica nesse nematoide e a capacidade de superar a resistência genética na ausência de condições seletivas.

A cultivar Apatã (IAC 2258), pertencente à espécie *C. canephora* é recomendada para plantio em áreas infestadas com os nematoides *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*. Essa cultivar vem sendo muito utilizada como porta-enxerto em áreas infestadas pelos nematoides citados (SALGADO; REZENDE; CAMPOS, 2005).

Mata et al. (2000) identificaram um genótipo de Catucaí, denominado IAPAR Vit 83, com 100% de plantas resistentes à *M. paranaensis* e *M. incognita* raça 2. Posteriormente, Sera et al. (2007) encontraram progênies do mesmo germoplasma, resistentes à *M. paranaensis* e com maior tamanho de frutos.

No entanto, não basta a cultivar ser altamente resistente a nematoides se não for produtiva. Por isso, as cultivares do grupo Catucaí são usualmente utilizadas nos programas de melhoramento genético do cafeeiro por apresentarem elevado vigor vegetativo, alta produtividade, excelente qualidade de bebida e porte baixo, sendo essa característica de interesse em regiões que utilizam a mecanização (CARVALHO, 2008). Como as cultivares pertencentes à Catucaí são suscetíveis à ferrugem e aos nematoides, estas são comumente utilizadas em cruzamentos com germoplasmas, como Híbrido de Timor, a fim de se obter progênies que aliam boas características agronômicas e resistência a patógenos (CARVALHO, 2008).

Após a realização dos cruzamentos entre os germoplasmas de interesse, um dos critérios para avaliar a resistência de cafeeiros a fitonematoides é dimensionar as taxas reprodutivas dos mesmos em seus hospedeiros (SALGADO; RESENDE; CAMPOS, 2005). Nesse contexto, é de grande importância testes de seleção de progênies resistentes, porém esses se apresentam altamente trabalhosos e demandam muito tempo e custo (CONCIBIDO; DIERS; RAO-ARELLI, 2004; MOURA et al., 2008), pois o intervalo de tempo médio entre a inoculação do nematoide nas progênies e as avaliações são de diversos meses, no caso do cafeeiro. Assim, a identificação de técnicas auxiliares na seleção de progênies resistentes, a exemplo da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) se apresenta altamente promissora e com possibilidade de utilização nas fases iniciais do cafeeiro nos programas de melhoramento genético e com menor tempo gasto.

2.4 Marcadores moleculares no cafeeiro

O café é uma cultura perene, de ciclo longo, no qual o melhoramento é efetuado ao longo de várias gerações e o desenvolvimento de cultivares um trabalho bastante demorado (RESENDE et al., 2001) e de alto custo. Outro fator é a interferência do ambiente no desempenho das progênies podendo levar a resultados insatisfatórios (CARVALHO et al., 2010). Nesse contexto, é de suma importância a incorporação de métodos avançados de biotecnologia associados aos métodos usuais de melhoramento do cafeeiro (FONTES, 2001), sendo a utilização de marcadores moleculares uma técnica auxiliar que pode colaborar de forma ampla com o melhoramento dessa espécie.

Marcadores moleculares são definidos como segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locos que determinam características de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), podendo ser utilizados para identificar genes associados a essas características e selecionar alelos em uma população segregante (LÓPEZ-GARTNER et al., 2009). Oliveira et al. (2003) destacam como benefícios da utilização dos marcadores, a possibilidade de aplicação em estádios iniciais do desenvolvimento da planta, além da utilização em situações em que o fenótipo é de difícil mensuração, como no caso da resistência a nematoides (RICK; FOBES, 1974).

Segundo Agarwal, Shrivastava e Padh (2008) são listados na literatura mais de vinte diferentes tipos de marcadores moleculares, que são classificados em dominantes ou codominantes. Os dominantes não possuem a capacidade de diferenciar as progênies homozigotas dominantes das heterozigotas, os quais estão incluídos: RAPD- “Randomly Amplified Polymorphic DNA” ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, AFLP- “Amplified Fragment Length Polymorphism” ou polimorfismo de comprimento de fragmentos

amplificado e ISSR - “Inter-simple sequence repeat” ou sequência simples repetida interna. Enquanto os codominantes são capazes de discriminar heterozigotos, sendo eles: RFLP- “Restriction Fragment Length Polymorphism” ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, microssatélites- “Simple Sequence Repeat” ou sequências simples repetidas e SNP- “Single Nucleotide Polymorphism” ou variações em uma única posição nucleotídica de uma fita de DNA (KALIA et al., 2011). E ainda, de acordo com a metodologia utilizada, podem ser baseados em técnicas de hibridação ou técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Cada técnica difere quanto à informatividade, cobertura do genoma e qualidade dos dados (FERRÃO et al., 2013).

O primeiro tipo de marcador molecular utilizado no melhoramento de plantas foi o RFLP (HELENTJARIS et al., 1986). Essa técnica compreende a digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, separação dos fragmentos por eletroforese e transferência destes para membranas de nitrocelulose ou náilon, em que são hibridizados com sondas de DNA. As sondas são fragmentos de DNA marcados com nucleotídeos radioativos. Após a formação das sondas, as membranas são expostas a um filme autorradiográfico, sendo verificado os polimorfismos. No entanto, dificuldades inerentes à técnica, como elevado nível de conhecimento sobre o genoma a ser analisado, o grande número de etapas e o uso, em muitos casos, de sondas radioativas, impediram a ampla utilização da técnica (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Alguns trabalhos utilizando essa técnica foram de importância, como o de Lashermes et al. (1999) que por meio da utilização de marcadores moleculares, entre eles o RFLP, demonstraram que a espécie *C. arabica* é alotetraploide e resultante da hibridação natural entre *C. eugenoides* e *C. canephora*.

O RAPD é uma técnica que se utiliza da reação de PCR para detectar fragmentos específicos de DNA (WILIAMS et al., 1990). Esses marcadores

auxiliam na seleção de indivíduos que poderão ser utilizados no melhoramento genético ou para compor bancos de germoplasma. Uma das vantagens do RAPD é a obtenção de elevado número de polimorfismos de forma relativamente simples (WILLIAMS et al., 1990), principalmente em espécies pouco caracterizadas geneticamente, além da rapidez e do baixo custo da técnica. Porém, o RAPD apresenta algumas desvantagens que limitam seu uso em grande escala. Uma delas é a baixa reprodutibilidade dos dados, devido à necessidade de baixa temperatura para a ligação do iniciador ao molde, o que torna o processo dependente das condições de amplificação (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Entre as utilizações dos marcadores RAPD estão os estudos de diversidade genética do gênero *Coffea*. Aga et al. (2003) estudaram 144 progênies de café arábica da Etiópia e verificaram que é possível selecionar materiais discrepantes para a conservação de germoplasma. Silveira et al. (2003) obtiveram sucesso na utilização de marcadores RAPD para avaliar a variabilidade genética entre e dentro de populações de *C. arabica*.

Outra classe de marcador, os ISSR tem se mostrado uma valiosa ferramenta para análise da diversidade genética e caracterização de cultivares (ISSHIKI; IWATA; KHAN, 2008). Esse marcador utiliza uma sequência simples repetida como oligonucleotídeo iniciador (Olii) para amplificar um fragmento de DNA delimitado por dois microssatélites invertidos, o que gera um alto nível de polimorfismo. Entre as vantagens da sua utilização estão o baixo custo, ausência de conhecimento prévio do genoma a ser analisado, fácil uso, grande reprodutibilidade e análise multiloco (MATTHEWS et al., 1999).

Ruas et al. (2003) utilizaram 14 iniciadores ISSR e demonstraram que esses são eficientes na diferenciação genética de espécies do gênero *Coffea* e na proximidade genética de híbridos interespecíficos no gênero.

Os SNPs (KWOK, 2003) são marcadores bi-alélicos, sendo o conteúdo informativo limitado, em relação a marcadores microssatélites (GRIFFIN; SMITH, 2000). Esses marcadores são utilizados na construção de mapas de alta resolução, traços genéticos de mapeamento, diagnósticos e análises de estrutura genética de populações (RAFALSKI, 2002).

Schincariol (2011) verificou duas marcas SNP associadas com teor de açúcar (açúcar redutor e açúcar total) através da análise de marca simples em uma população F_2 de *C. arabica* e *C. canephora*. A análise de marcadores individuais para detecção de QTL permitiu ainda, obter informações prévias de associação de QTL para a qualidade do café.

Visando ao aumento da utilidade e a reprodutibilidade de um marcador molecular é possível convertê-lo em um marcador específico e reprodutível, denominado SCAR- *Sequence Characterized Amplified Regions* ou região amplificada de sequência caracterizada (MELOTTO; ALFANADOR; KELLY, 1996). Nesse caso, a banda de DNA correspondente ao marcador de interesse é clonada, sequenciada e dois marcadores mais longos que o original são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador (ALZATE-MARIN, 2005).

2.4.1 Marcadores AFLP

AFLP é uma técnica que combina a clivagem de fragmentos de DNA com enzimas de restrição e a amplificação dos fragmentos a partir da técnica do PCR (VOS et al., 1995). Em resumo, o DNA de um indivíduo é clivado com enzimas de restrição, sendo *Eco RI* e *Mse I* as mais usadas, e as suas extremidades são ligados adaptadores, que servem de sítios de ligação para os marcadores na reação de DNA. A partir dessa etapa, somente os fragmentos que possuem os sítios de restrição mencionados serão amplificados. De acordo com Vaneechoutte (1996), os

marcadores AFLP quando comparados com os marcadores RAPD e RFLP apresentam maior reprodutibilidade e poder discriminatório.

Prakash et al. (2004) por meio da utilização de marcadores AFLP, observaram o mecanismo de introgressão do gene de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) em *C. arabica* e identificaram 21 marcadores AFLP associados ao gene S_{H3} , sendo este derivado da introgressão de *C. liberica* em *C. arabica*. Realizando trabalho semelhante, Brito et al. (2010) por meio da mesma técnica, analisaram a população de Híbrido de Timor UFV 427-15 e identificaram três fragmentos amplificados associados à resistência à ferrugem do cafeeiro.

Lashermes et al. (2011) a fim de verificar a introgressão de genes de *C. canephora* em *C. arabica*, por meio dos marcadores AFLP e microssatélites, verificaram que a transferência não é limitada pelo nível de ploidia entre os diferentes genomas.

Estudando a diversidade genética de cultivares de *C. arabica* por meio de marcadores AFLP, Steiger et al. (2002) encontraram 274 alelos polimórficos, sendo constatado como um pequeno nível de variabilidade, visto que a média de similariedade genética foi de 0,933 e concluíram que a avaliação da diversidade genética entre cultivares de café arábica, utilizando marcadores AFLP, fornecem as informações necessárias para a utilização no melhoramento genético do cafeeiro. A fim de observar o polimorfismo de genótipos de *C. arabica* da Etiópia, Dessalegn, Herselman e Labuschagne (2008) utilizaram 10 marcadores AFLP e verificaram uma percentagem de polimorfismo de 30,9%, sendo todos os genótipos distinguíveis por meio dos marcadores.

Noir et al. (2003) sugeriram 14 marcadores AFLP associados à resistência à *M. exigua* no cafeeiro, esses autores verificaram alta correlação entre os marcadores e a resistência ao nematoide, com destaque para o marcador *Exi-11* que foi o mais intimamente ligado ao gene de resistência *Mex-1*.

Genótipos de café arábica foram testados em programas de melhoramento genético quanto à introgressão do gene *Mex-1* utilizando marcadores AFLP (DINIZ et al., 2005), demonstrando que a introgressão do gene de resistência estaria associada à possível resistência desses genótipos.

2.4.2 Marcadores microssatélites

Os microssatélites ou sequências simples repetidas (EDWARDS et al., 1991) têm sido amplamente utilizados e preferidos em relação a outras técnicas (PARIDA et al., 2009). Os microssatélites são sequências de DNA constituídas de um a seis nucleotídeos que estão espalhados ao acaso no genoma com uma frequência relativamente alta (AKKAYA; BHAGWAT; CREGAN, 1992). Para a utilização do microssatélite como marcador, ele deve ser inicialmente clonado, sequenciado e amplificado a partir de iniciadores que o flanqueiam. A partir dessa etapa, os produtos de amplificação são separados por eletroforese e visualizados, geralmente, em gel de poliacrilamida (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Entre todos os marcadores apresentados, os microssatélites ganharam considerável importância no melhoramento genético de plantas, devido a uma série de atributos desejáveis, tais como: alta variabilidade, natureza multialélica, herança codominante, alto rendimento da genotipagem, reprodutibilidade e ampla cobertura do genoma (CAIXETA et al., 2009; PARIDA et al., 2009). Segundo os mesmos autores, esses marcadores são uma ferramenta valiosa para a construção de mapas do genoma, mapeamento de genes, seleção assistida por marcadores e estabelecimento de relações evolutivas. Por outro lado, a grande limitação dessa classe de marcadores é a necessidade de se desenvolver os marcadores especificamente para cada espécie, não sendo possível utilizar marcadores anônimos.

Souza et al. (2013) observaram alto polimorfismo entre os acessos de *C. canephora* oriundos de cultivos comerciais e bancos de germoplasma a partir de

marcadores microssatélites. Em relação à resistência à ferrugem do cafeeiro, quatro marcadores foram identificados como altamente relacionados à doença (ROMERO et al., 2014). Enquanto Poncet et al. (2006) observaram que marcadores moleculares microssatélites desenvolvidos a partir de *C. canephora* podem ser facilmente transferidos para outras espécies. Nesse trabalho, os autores verificaram um alto polimorfismo nas duas espécies consideradas, sendo 75% para *C. liberica* e 86% para *C. canephora*.

A variabilidade genética e estrutura populacional de alguns acessos de *C. arabica* e de três espécies diploides foram verificadas utilizando marcadores microssatélites (LÓPEZ-GARTNER et al., 2009). Esses autores confirmaram a eficiência dos marcadores, em que se observou a partir do agrupamento UPGMA, a formação de quatro grupos, sendo que um destes foi formado somente pelas progênies cultivadas.

Missio et al. (2009) encontraram polimorfismo entre as progênies de *Coffea* avaliadas utilizando 17 marcadores microssatélites, com um número médio de 5,1 alelos por iniciador. Nesse estudo, foi possível verificar que os maiores polimorfismos foram constatados na espécie *C. canephora* (88,2%), seguido por variedades resistentes à ferrugem (35,3%). Dos marcadores analisados, 29,4% distinguiram *C. arabica* dos Híbridos de Timor, sendo possível identificar os mais próximos e os mais distantes de *C. arabica*. Al-Murish et al. (2013) avaliaram a variação genética em 17 progênies de *C. arabica* coletados no Iêmen utilizando marcadores microssatélites, o número médio de alelos amplificados variou de um a sete de acordo com o iniciador, com uma média de 2,31 alelos.

Ferrão et al. (2013) avaliando a eficiência dos marcadores RAPD, AFLP e microssatélites em estudos genéticos com *C. canephora*, verificaram que estes últimos foram considerados os mais informativos entre os três e apresentaram os

melhores resultados entre os demais nos estudos de diversidade genética. Utilizando os mesmos marcadores, Setotaw et al. (2010) estudaram a diversidade e estrutura genética do germoplasma Híbrido de Timor e verificaram alta diversidade genética entre os acessos.

2.5 Marcadores moleculares relacionados à resistência a nematoides

No manejo integrado de doenças e pragas, uma das estratégias utilizadas é o uso de cultivares resistentes, que geralmente são desenvolvidas a partir da transferência de alelos de resistência de fontes exóticas para cultivares elites e adaptadas (ALZATE-MARIN et al., 2005). A identificação e caracterização molecular de genes associados à resistência a patógenos é uma das alternativas para acelerar a seleção de progênies resistentes. Uma vez identificados, esses genes podem ser diretamente utilizados como marcadores em programas de seleção assistida (MALUF; GUERREIRO FILHO; FAZUOLI, 2001).

Trabalhos relacionando marcadores moleculares com a resistência a nematoides são comuns na cultura na soja. Tamulonis et al. (1997) observaram, na região do marcador RFLP B212, genes de resistência à *Meloidogyne javanica*, sendo que dois desses marcadores explicaram 46% da variação do número de galhas. Fuganti et al. (2004) realizando trabalho semelhante, identificaram QTLs relacionados à resistência e observaram correlação significativa entre os marcadores moleculares microssatélites com o número de galhas na raiz.

Mienie et al. (2002) identificaram por meio das técnicas RFLP e AFLP marcadores associados à resistência de *M. javanica* em soja. Por meio da técnica RFLP, determinados marcadores explicaram até 62% da variação no número de galhas. Sete marcadores AFLP foram relacionados com os traços de resistência, sendo dois destes convertidos em marcadores SCAR, representando 41% da variação do índice de galha da população mapeada.

Fourie et al. (2008) utilizaram e validaram os marcadores Satt201, Satt358, Satt487 e Satt590 para utilização em programas de melhoramento genético para a resistência à *M. incognita* raça 2 na soja. Nesse mesmo trabalho, foram identificados QTLs que explicam 62,4% do índice de galhas e 80% da variação no número de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) por sistema radicular.

Ainda na cultura da soja, Dias et al. (2004) obtiveram um QTL de resistência à *Heterodera glycines* a partir de três marcadores microssatélites. Esses autores verificaram que a região genômica identificada, explicou 87% da variação do número de fêmeas do nematoide e coincide com uma região que controla a resistência a várias raças desse nematoide. Por fim esses autores concluíram que os marcadores microssatélites apresentam potencial para utilização na identificação de genótipos de soja resistentes à raça 4 do nematoide.

Na cultura do algodão, Ynturi et al. (2006) associaram marcadores microssatélites nos cromossomos 11 e 14 com a resistência ao nematoide das galhas. Jenkins et al. (2012) propuseram um QTL no cromossomo 14 que foi associado à resistência à *M. incognita* na mesma cultura. Os autores concluíram que a seleção assistida por marcadores pode ser capaz de auxiliar na seleção de progênies resistentes em um curto espaço de tempo.

No gênero *Coffea* existem poucos trabalhos relacionando o uso de marcadores moleculares com a resistência a nematoides. Em um desses estudos, Bertrand, Anthony e Lashermes (2001) avaliaram a resistência à *M. exigua* em progênies de *C. arabica*, *C. canephora* e Híbrido de Timor e utilizaram marcadores AFLP a fim de verificar a introgressão de algum gene relacionado à resistência. Nas progênies de *C. arabica* não houve indivíduos resistentes à *M. exigua*, enquanto em *C. canephora* todas as progênies apresentaram resistência. Em relação ao Híbrido de Timor verificou-se diferentes respostas ao nematoide em estudo, tanto nos testes de resistência, quanto para o número de alelos

presentes nas análises moleculares, demonstrando a possibilidade de utilização desse germoplasma nos programas de melhoramento. Com isso, os autores concluíram que as progênies resistentes ao nematoide estiveram associadas ao maior número de introgressões do gene em estudo.

Posteriormente, Noir et al. (2003) demonstraram que a resistência à *M. exigua* é controlada por um gene dominante simples, designado *Mex-1*, presente em *C. canephora* e com segregação na proporção de 3:1. De acordo com a avaliação do número de galhas, verificou-se que o gene de resistência apresenta dominância incompleta. Esses autores selecionaram ainda 14 marcadores AFLP associados à resistência à *M. exigua* e construíram um mapa genético posicionando o gene de resistência (Figura 1).

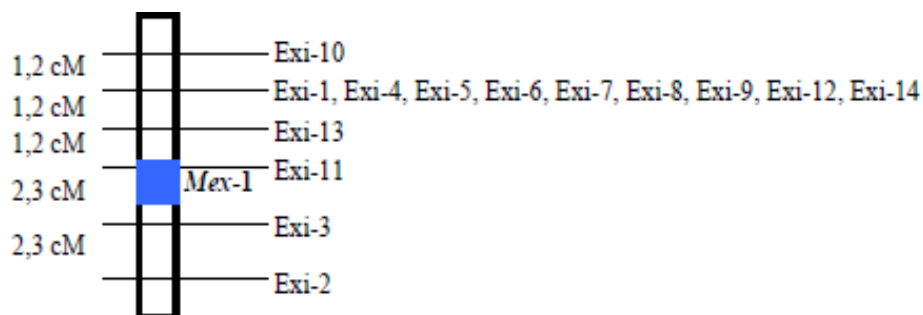


Figura 1 Mapa genético da região cromossômica contendo o loco *Mex-1* em café associado a resistência a *M. exigua* baseado em uma população F₂.

Fonte: Adaptado de Noir et al. (2003) e desenho de Diniz et al. (2005)

Progênies da cultivar Icatu foram avaliadas em programas de melhoramento genético quanto à introgressão do gene *Mex-1* a partir da seleção assistida (DINIZ et al., 2005) por marcadores AFLP, demonstrando a possível resistência dessas ao patógeno. Alpizar, Etienne e Bertrand (2007) concluíram que esse gene de resistência pode apresentar dominância incompleta, pois permitiu a penetração dos nematoides em híbrido F₁, mas inibiu sua multiplicação.

Poucos são os trabalhos envolvendo o uso de marcadores moleculares na determinação da resistência de cafeeiros aos nematoides. Porém, o desenvolvimento de marcadores moleculares associados à resistência à *M. exigua* irá contribuir com os programas de melhoramento genético do cafeeiro a fim de selecionar, em um menor intervalo de tempo, progênies nas fases iniciais de desenvolvimento com resistência ao nematoide em estudo.

REFERÊNCIAS

AGA, E. et al. Genetic diversity of forest arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Ethiopia as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Hereditas**, Lund, v. 138, p. 36–46, 2003.

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 617-631, 2008.

AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, Austin, v. 132, p. 1131-1139, 1992.

ALBUQUERQUE, E. V. S. et al. Resistance to *Meloidogyne incognita* express a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 127, p. 365-373, 2010.

AL-MURISH, T. M. et al. Genetic diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) in Yemen via SRAP, TRAP and SSR markers. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Florence, v. 11, n. 2, p. 411-416, 2013.

ALPIZAR, E.; ETIENE, H.; BERTRAND, B. Intermediate resistance to *Meloidogyne exigua* root-knot nematode in *Coffea arabica*. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, p. 903-910, 2007.

ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 333-342, 2005.

ANTHONY, F. et al. Detection by simple sequence repeat markers of introgression from *Coffea canephora* in *Coffea arabica* varieties. **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, n. 6, p. 542-544, Dec. 2002.

BARBOSA, D. H. S. G. et al. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 28, p. 49-54, 2004.

BARBOSA, D. H. S. G.; SOUZA, R. M.; VIEIRA, H. D. Field assessment of coffee (*Coffea arabica* L.) cultivars in *Meloidogyne exigua*- infested or -free fields in Rio de Janeiro State, Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 175-177, 2010.

BARBOSA, D. H. S. G.; VIEIRA, H. D.; SOUZA, R. M. Avaliação em Campo de Cultivares de *Coffea arabica* em Áreas Isenta ou Infestada por *Meloidogyne exigua* na Região Noroeste Fluminense . **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 32, p. 101-110, 2008.

BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of Coffea. In: CLARCK, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee- agronomy**. London: Elsevier, 1985. p. 1-40.

BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Breeding for resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, p. 637-644, 2001.

BOISSEAU, M. et al. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, p.38-41, 2009.

BRITO, G. G. et al. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, Wageningen, v. 173, n. 2, p. 255-264, 2010.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. p. 11-93.

CAMPOS, V. P. **Manejo de doenças causada por fitonematoides**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 106 p.

CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: M. LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2nd ed. Egham: CABI Bioscience, 2005. p. 529-580.

CARNEIRO, R. M. D. G.; COFCEWICZ, E. T. The taxonomy of *Meloidogyne* spp., a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant parasitic nematodes of coffee**. New York: APS; Springer, 2008. p. 87-122.

CARNEIRO, R. M. D. G. et al. *Meloidogyne paranaensis* sp., a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, College Park, v. 28, p. 177-189, 1996.

CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento do cultivo do café do Brasil**. Campinas: IAC, 1993. (Documentos IAC, 34).

CARVALHO, A. M. et al. Correlação entre crescimento e produtividade de cultivares de café em diferentes regiões de Minas Gerais, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 3, p. 269-275, 2010.

CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. 334 p.

CASTRO, J. M. C.; CAMPOS, V. P. Detecção de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiros do Sul de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 30, n. 4, p. 507, 2004.

CASTRO, J. M. C. et al. Levantamento de fitonematoides em cafezais do Sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 32, p. 56-64, 2008.

CASTRO, J. M. C.; NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P. Ocorrência de *Meloidogyne paranaenses* em cafeeiro na região Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 565, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café**: safra 2014: quarta estimativa. Brasília, 2014.

CONCIBIDO, V. C.; DIERS, B. W.; RAO-ARELLI, P. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1121-1131, 2004.

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

DESSALEGN, Y.; HERSELMAN, L.; LABUSCHAGNE, M. T. AFLP analysis among Ethiopian arabica coffee genotypes. **African Journal of Biotechnology**, Abraka, v. 7, p. 3193-3199, 2008.

DIAS, W. P. et al. Identificação de marcadores SSR associados a locos de resistência à raça 4⁺ do nematoide de cisto da soja. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 63-75, 2004.

DINIZ, L. E. C. et al. Analysis of AFLP markers associated to the *Mex-1* resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 5, p. 387-393, 2005.

EDWARDS, A. et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **The American Journal of Human Genetics**, Bethesda, v. 49, p. 746-756, 1991.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro**: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro. Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p. 87-113.

FERRÃO, L. F. V. et al. Comparative study of different molecular markers for classifying and establishing genetic relationships in *Coffea canephora*. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 299, p. 225-238, 2013.

FERRÃO, R. G et al. **Café conilon**: técnica de produção com variedades melhoradas. 3. ed. Vitória: Incaper, 2007. 60 p.

FERRAZ, L. C. B. F. World reports of *Meloidogyne*: Brazil. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant parasitic nematodes of Coffee**. New York: APS, 2008. p. 225-248.

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

FONTES, J. R. M. **Heterose, capacidade combinatória e divergência genética estimada por análise de marcadores RAPD em cruzamentos entre cafeeiros catuaí (*Coffea arabica* L.) e híbridos de timor**. 2001. 140 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

FOURIE, H. et al. Identification of genetic markers associated with *Meloidogyne incognita* race 2 resistance in soybean (*Glycine max* L. Merr). **Nematology**, Leiden, v. 10, p. 651-661, 2008.

FUGANTI, R. et al. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 125-130, 2004.

GONÇALVES, W.; LIMA, M. M. A.; FAZUOLI, L. C. Resistência do cafeeiro à nematoide: III. Avaliação da resistência de espécies de *Coffea* e de híbridos interespecíficos a *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 12, p. 47-54, 1988.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B. A luta contra a doença causada pelos nematoides parasitos do cafeeiro. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 54-56, 2007.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B. Nematoides parasitos do cafeeiro. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa, MG: UFV, 2001. p. 199-268.

GRIFFIN, T. J.; SMITH, L. M. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 77-84, 2000.

GUERRA NETTO, E. G.; D'ANTONIO, A. M. Nematoides parasitas em lavouras cafeeiras do sul de Minas Gerais. BRAZILIAN CONGRESS OF COFFEE RESEARCH, 11., 1984, Londrina. **Proceedings...** Londrina: [s. n.], 1984. p. 171.

HELENTJARIS, T. et al. Construction of linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 72, p. 761-769, 1986.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M. R. ISSR variations in egg plant (*Solanum melongena* L.) and related Solanum species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, p. 186-190, 2008.

JENKINS, J. N. et al. SSR markers for marker assisted selection of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) resistant plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 183, p. 49-54, 2012.
KALIA, R. N. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Wageningen, v. 177, p. 309-334, 2011.

KOFOID, C. A.; WHITE, W. A. A new nematode infection of man. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 72, p. 567-569, 1919.

KRZYZANOWSKI, A. A. et al. Levantamento de espécies e raças de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado do Paraná. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos**. Brasília: EMBRAPA Café, 2001. p. 81.

KUBO, R. K. et al. Nematoides associados a cafeeiros do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23., 2001. **Anais...** Marília: [s. n.], 2001. p. 91.

KWOK, P. Y. **Single nucleotide polymorphisms**: methods and protocols. Methods in molecular biology. Totowa: Humana, 2003.

LASHERMES, P. et al. Analysis of alien introgression in coffee tree (*Coffea arabica* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 27, p. 223-232, 2011.

LASHERMES, P. et al. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 139-146, 2000.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterization an origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 261, p. 259-266, 1999.

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

LORDELLO, L. G. E.; LORDELLO, R. R. A. *Meloidogyne incognita* ataca cafeeiro no Paraná. O **Solo**, Piracicaba, v. 64, p. 27, 1972.

LORDELLO, L. G. E.; MELLO FILHO, A. T. Mais um nematoide ataca o cafeeiro. **Revista Agrícola**, Maceió, v. 45, p. 102, 1970.

MALUF, M. P.; GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C. Biotecnologia: aporte tecnológico ao Melhoramento do cafeeiro no IAC. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, n. 2, p. 5-7, 2001.

MATA, J. S. et al. Resistência de genótipos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) de São Jorge do Patrocínio ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. **Scientific Journal**, São Paulo, v. 6, p. 34-36, 2002.

MATA, J. S. et al. Seleção para resistência ao nematoide *Meloidogyne paranaensis* EMN-95001: Iapar LN 94066 de “Catuaí x Icatú” em área altamente infestada. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos...** Brasília: Embrapa Café, 2000. p. 515-518.

MATTHEWS, D. et al. 5'-anchored simple sequence repeat primers are useful for analysing potato somatic hybrids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 210-212, 1999.

MAURIN, O. et al. Towards a phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): Identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, London, p. 1-19, 2007. Disponível em: <<http://aob.oxfordjournals.org/content/early/2007/10/22/aob.mcm257.full.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2014.

MELOTTO, M.; ALFANADOR, L.; KELLY, J.D. Development of SCAR marker linked to the gene in common bean. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 4, p. 1216-1219, 1996.

MENDES, C. H. T. Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea*. **Bragantia**, Campinas, v. 9, p. 35-41, 1949.

MIENIE, C. M. S. et al. Identification of AFLP markers on soybean linked to resistance to *Meloidogyne javanica* and conversion to Sequence Characterized Amplified Regions (SCARs). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 37, p. 157-166, 2002.

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

MOURA, M. F. et al. Parâmetros genéticos da resistência da soja ao nematoide de cisto. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 119-125, 2008.

MUNIZ, M. F. S. et al. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 370-378, 2009.

NOIR, S. et al. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 97-103, Feb. 2003.

OLIVEIRA, A. C. B. et al. Avanços tecnológicos em biologia molecular: marcadores de DNA no melhoramento do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção integrada de café**. Viçosa, MG: UFV/DFP, 2003. p. 247-278.

PARIDA, S. K. et al. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, p. 327-338, 2009.

PEREIRA, A. A. et al. Cultivares: origem e suas características. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. **Café Arábica: do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG, 2010. p. 163-221.

PEREIRA, T. B. et al. Reação de genótipos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) a *Meloidogyne exigua* população Sul de Minas. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, p. 84-90, 2012.

PINTO, M. F. et al. Seleção de progênies de cafeeiro derivadas de Catuaí com Icatu e Híbrido de Timor. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 3, p. 215-222, 2012.

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

PRAKASH, N. S. et al. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. **Theoretical Applied Genetics**, Cham, v. 109, p. 1311-1317, 2004.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphism in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 5, p. 94-100, 2002.

RESENDE, M. D. V. et al. Estimação de parâmetros genéticos e predição de valores genotípicos no melhoramento do cafeeiro pelo procedimento REML/BLUP. **Bragantia**, Campinas, v. 60, p. 185-193, 2001.

REZENDE, R. M. et al. Resistência de progênies de *Coffea arabica* em área infestada por *Meloidogyne exigua*. **Nematropica**, Bradenton, v. 43, n. 2, p. 233-240, 2013.

RIBEIRO, R. C. F. et al. Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 29, p. 11-16, 2005.

RIBEIRO, S. R. et al. Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em lavouras cafeeiras da Região Sul de Minas Gerais. Belo Horizonte: EPAMIG, 2014. (Circular Técnica, 191).

RICK, C. M.; FOBES, J. F. Association of an allozyme with nematode resistance. **Tomato Genetics Cooperative**, Gainesville, n. 24, p. 25, 1974.

ROBERTS, P. A. Concepts and consequences of resistance. In: J.L. STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CABI, 2002. p. 23-42.

ROBERTS, P. A. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 199–221, 1995.

ROMERO, G. et al. Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timor hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). **Plant Breeding**, Berlin, v. 133, 1, p. 121-129, 2014.

RUAS, P. M. et al. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter- Simple Sequence Repeat) markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 319-327, 2003.

SALGADO, S. M. L.; RESENDE, M. L. V.; CAMPOS, V. P. Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cultivares de cafeeiros resistentes e suscetíveis. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 413-415, 2005.

SALGADO, S. M. L.; REZENDE, J. C. Manejo de fitonematoide em cafeeiro. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. **Café arábica: do plantio a colheita**. Lavras: Epamig, 2010. v. 1, p. 757-804.

SANTOS, M. A. et al. Ocorrência de nematoides em cafeeiros do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 22, p. 3-4, 1998.

SCHINCARIOL, L. P. **Identificação de marcadores SNP pelas técnicas de PCR-RFLP e Tetra-primer ARMS-PCR e suas associações com qualidade de bebida em café**. 2011. 54 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2011.

SERA, G. H. et al. Progênies de *Coffea arabica* cv. IPR-100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. **Bragantia**, Campinas, v. 66, p. 43-49, 2007.

SERA, T. et al. Identificação de cafeeiros resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 2 e 1 em populações de Icatu (*Coffea arabica*). **Scientific Journal**, São Paulo, v. 8, p. 20, 2004.

SETOTAW, T. A. et al. Breeding potential and genetic diversity of “Híbrido do Timor” coffee evaluated by molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 10, n. 4, p. 298-304, Dec. 2010.

SETOTAW, T. A. et al. Coefficient of parentage in *Coffea arabica* L. cultivars grown in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 53, n. 4, p. 1237-1247, 2013.

SILVEIRA, S. R. et al. Assessment of genetic variability within and among coffee progênies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 329-336, 2003.

SOUZA, F. F. et al. Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 13, n. 4, p. 273-276, 2013.

SOUZA, J. T.; MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P. Nematoides parasitos encontrados em cafeeiros em campo e em viveiros de mudas do Estado de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 25, p. 180-183, 1999.

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

TAMULONIS, J. P. et al. DNA markers associated with resistance to javanese root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 783-788, 1997.

TAYLOR, A. L; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: North Carolina State University, 1978. 111 p.

VANEECHOUTTE, M. DNA fingerprint techniques for microorganismos. A proposal for classification and nomenclature. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 6, p. 115-142, 1996.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YNTURI, P. et al. Association of root-knot nematode resistance genes with simple sequence repeat markers on two chromosomes in cotton. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 2670–2674, 2006.

CAPÍTULO 2

Identificação de marcadores microssatélites associados à resistência à *Meloidogyne exigua* em cafeeiro

RESUMO

Os clássicos testes de seleção de progênies resistentes à *Meloidogyne exigua* demandam alto custo e disponibilidade de tempo, sendo a utilização de marcadores moleculares uma técnica que pode colaborar em situações em que o fenótipo é de difícil mensuração, como na resistência a nematoides. Objetivou-se com o presente estudo identificar marcadores microssatélites associados à resistência ao nematoide *M. exigua* em progênies F₅ de cafeeiro, derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor 440-10 e Catuaí Amarelo IAC 86. As características fator de reprodução do nematoide e índice de galhas foram avaliadas após 320 dias da inoculação. Dos 44 pares de iniciadores microssatélites avaliados nos parentais, 11 apresentaram polimorfismo, com uma média de 4,5 alelos amplificados por par nas progênies estudadas. Pela análise dos dados moleculares observou-se que as 82 progênies foram agrupadas em três principais grupos que se relacionaram à reação ao nematoide, sendo os parentais (resistente e suscetível) alocados em grupos distintos. Verificou-se correlação entre diversos marcadores microssatélites com as características fenotípicas avaliadas, sendo os marcadores SSR Café 20 alelo 3 (100 pares de bases), SSR Café 40 alelo 2 (250 pares de bases) e SSR Café 15 alelo 3 (190 pares de bases) associados à resistência à *M. exigua* nas progênies de cafeeiro. Esses marcadores microssatélites, devidamente validados na população da nematoide a ser utilizada, proporcionam um método potencial para seleção de progênies resistentes ao nematoide em programas de melhoramento do cafeeiro.

Palavras-chave: Diversidade genética. SSR. Nematoides. *Coffea arabica*.

ABSTRACT

The classic tests of selection progenies resistant to *Meloidogyne exigua* requires high cost and time availability but the use of molecular markers techniques can assist selection process where the phenotype is difficult to measure, such as the resistance to nematode. The objective of this work is to identify the microsatellites markers associated with the gene responsible for nematode resistance (*M. exigua*) in F₅ progenies of coffee derived from the crossing of Híbrido de Timor 440-10 and Catuaí Amarelo IAC 86. Out of 44 SSR markers evaluated 11 markers showed polymorphic pattern with mean average allele of 4.5 per marker. The analysis to classify 82 progenies in three groups that are related to the reaction nematode and parental allocated to different groups (resistant and susceptible). Four SSR marker (SSRCafé 40 allele 2, SSRCafé 15 allele 3, SSRCafé 20 allele 3 e SSRCafé 13 allele 1) and five markers (SSRCafé 13 allele 2, SSRCafé 19 allele 3, SSRCafé 40 allele 2, SSRCafé 15 allele 3 e SSRCafé 20 allele 3) were correlated negatively with reproduction factor and *M. exigua* root gall index, respectively. These SSR markers, properly validated in the population, can serve as a potential method for selecting progenies resistant to nematode in the breeding program of coffee.

Keywords: Genetic diversity. SSR. Nematodes. *Coffea arabica*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo. No ano de 2014, foram produzidos aproximadamente 32 milhões de sacas de *Coffea arabica* e 13 milhões de sacas de *Coffea canephora*, em uma área total de 2.267.577,8 hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

A presença de fitonematoides é apontada como um dos fatores limitantes para o crescimento e obtenção de altas produtividades no cafeeiro (BARBOSA; SOUZA; VIEIRA, 2010; BARBOSA; VIEIRA; SOUZA, 2008). Esses organismos microscópicos são encontrados nas raízes e comprometem o desenvolvimento de toda a planta (SALGADO; REZENDE, 2010), sendo a espécie *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887 uma das mais importantes, pois predomina em todos os principais estados produtores de café do Brasil (CAMPOS; VILLAIN, 2005), apresentando ampla disseminação e capacidade adaptativa a diversas regiões, sendo que no sul de Minas Gerais a espécie foi relatada em mais de 95% dos municípios amostrados (BARBOSA; VIEIRA; SOUZA, 2008). Essa espécie provoca alterações nutricionais e diminuição na produtividade do cafeeiro, ocasionado pela deficiente absorção e translocação de água e nutrientes (BARBOSA; SOUZA; VIEIRA, 2010).

Devido aos danos causados no cafeeiro, os produtores têm sempre buscado o controle dos fitonematoides. O método considerado mais econômico e seguro empregado pelos agricultores é a utilização de cultivares resistentes (ALPIZAR; ETIENE; BERTRAND, 2007; SALGADO; REZENDE, 2010), sendo o Híbrido de Timor um germoplasma que tem apresentado resistência à *M. exigua* aliado a altas produtividades (PEREIRA et al., 2012; PINTO et al., 2012; REZENDE et al., 2013). Progênie derivadas desse híbrido possuem genes que podem modificar o fenótipo (ANTHONY et al., 2005) conferindo-lhe resistência ao nematoide.

Uma alternativa que possibilita selecionar progênies resistentes à *M. exigua* sem recorrer à avaliação em testes clássicos de resistência, os quais demandam alto custo e disponibilidade de tempo (JENKINS et al., 2012) é a utilização de marcadores moleculares microssatélites. Esses marcadores, se validados na população de nematoide a ser estudada, permitem avaliar em curto prazo, um número elevado de genótipos, além de não sofrerem influência do ambiente, como ocorre com os marcadores morfológicos (MACHADO et al., 2013).

O uso de marcadores moleculares associados ao parasitismo de nematoides do gênero *Meloidogyne* já foi relatado por uma série de autores em algumas espécies de plantas. Na cultura da soja, Fuganti et al. (2004) e Silva et al. (2001) demonstraram a associação entre o marcador microssatélite SOYHSP 176 e o número de galhas de *Meloidogyne javanica*, enquanto Jenkins et al. (2012) verificaram associação entre marcadores microssatélites e a reação à *Meloidogyne incognita* na cultura do algodão. No entanto, no cafeeiro, verificam-se apenas trabalhos associando marcadores AFLP com a resistência ao nematoide *M. exigua* (DINIZ et al., 2005; NOIR et al., 2003).

Uma das metodologias utilizadas a fim de associar marcadores moleculares a características fenotípicas é a análise de regressão múltipla “*stepwise*”, no qual todos os marcadores são testados para entrada no modelo e posteriormente para permanência no mesmo. Essa análise tem sido muito utilizada a fim de identificar marcadores moleculares associados à resistência a doenças e a características agrônômicas e tem demonstrado sucesso nas mais diferentes espécies de plantas (PEREIRA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2007; RUAN; MOPPER, 2009).

Pesquisas para obtenção de cultivares resistentes à *M. exigua*, que unem o melhoramento convencional com a biotecnologia são escassas nos programas de melhoramento genético do cafeeiro, sendo que trabalhos associando

marcadores microssatélites com a resistência a nematoides do gênero *Meloidogyne* são inéditos. Caso seja verificada correlação entre algum marcador molecular com a resistência ao nematoide, esta poderá ser utilizada a fim de selecionar as progênes possivelmente resistentes e com isso selecioná-las para as próximas gerações. Dessa forma, estudos como esse podem contribuir de maneira significativa para o avanço do melhoramento genético.

Nesse contexto, objetivou-se identificar marcadores moleculares microssatélites associados ao gene de resistência ao nematoide *M. exigua* em progênes F₅ de cafeeiro, derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor 440-10 e Catuaí Amarelo IAC 86.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Progênies

As atividades experimentais relacionadas às análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- EPAMIG, localizado na Fazenda Experimental da EPAMIG, no município de Caldas- Minas Gerais. Em relação aos testes de resistência ao nematoide, esses foram realizados na EPAMIG/ UFLA em Lavras - Minas Gerais, em casa de vegetação e no laboratório de nematologia, respectivamente.

Foram utilizadas 82 progênies de cafeeiro, em geração F₅, pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro conduzido em Minas Gerais, derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor 440-10, resistente ao nematoide *M. exigua* e Catuaí Amarelo IAC 86, suscetível (PEREIRA et al., 1980; SALGADO; RESENDE; CAMPOS, 2005), os quais foram utilizados como testemunha (Tabela 1).

Tabela 1 Identificação das testemunhas e das progênies de cafeeiro previamente selecionadas em área naturalmente infestada por *M. exigua*

Identificação	Progênies	Identificação	Progênies
1	Híbrido de Timor 440-10*	43	514-7-16-C208-B1P3
2	Catuaí Amarelo IAC 86*	44	514-7-16-C208-B1P4
3	514-7-4-C130-B1P1	45	514-7-16-C208-B1P6
4	514-7-4-C130-B1P4	46	514-7-16-C208-B1P7
5	514-7-4-C130-B1P6	47	514-5-2-C494-B1P7
6	514-7-16-C208-B1P3	48	514-7-14-C73-B2P2
7	514-7-16-C208-B1P4	49	514-7-4-C130-B2P3
8	514-7-16-C208-B1P6	50	514-7-4-C130-B2P4
9	514-7-16-C208-B1P7	51	514-7-4-C130-B2P5
10	514-5-2-C494-B1P7	52	514-7-4-C130-B2P6
11	514-7-14-C73-B2P2	53	514-7-16-C208-B2P2
12	514-7-4-C130-B2P3	54	514-7-16-C208-B2P3
13	514-7-4-C130-B2P4	55	514-7-16-C208-B2P4
14	514-7-4-C130-B2P5	56	514-7-16-C208-B2P5

Continuação...			
15	514-7-4-C130-B2P6	57	514-5-2-C494-B2P6
16	514-7-16-C208-B2P2	58	514-5-2-C494-B2P7
17	514-7-16-C208-B2P3	59	514-5-2-C494-B2P8
18	514-7-16-C208-B2P4	60	514-7-14-C73-B3P1
19	514-7-16-C208-B2P5	61	514-7-14-C73-B3P5
20	514-5-2-C494-B2P6	62	514-7-4-C130-B3P2
21	514-5-2-C494-B2P7	63	514-7-4-C130-B3P3
22	514-5-2-C494-B2P8	64	514-7-4-C130-B3P5
23	514-7-14-C73-B3P1	65	514-7-16-C208-B3P1
24	514-7-14-C73-B3P5	66	514-7-16-C208-B3P3
25	514-7-4-C130-B3P2	67	514-7-16-C208-B3P4
26	514-7-4-C130-B3P3	68	514-7-8-C364-B3P2
27	514-7-4-C130-B3P5	69	514-7-8-C364-B3P4
28	514-7-16-C208-B3P1	70	514-5-2-C494-B3P3
29	514-7-16-C208-B3P3	71	514-5-2-C494-B3P6
30	514-7-16-C208-B3P4	72	514-7-4-C130-B4P2
31	514-7-8-C364-B3P2	73	514-7-16-C208-B4P1
32	514-7-8-C364-B3P4	74	514-7-16-C208-B4P6
33	514-5-2-C494-B3P3	75	514-5-2-C494-B4P4
34	514-5-2-C494-B3P6	76	514-5-2-C494-B4P5
35	514-7-4-C130-B4P2	77	514-7-4-C130-B4P4
36	514-7-16-C208-B4P1	78	514-7-6-C208-B1P6
37	514-7-16-C208-B4P6	79	514-7-16-C208-B1P7
38	514-5-2-C494-B4P4	80	514-5-2-C494-B1P7
39	514-5-2-C494-B4P5	81	514-7-4-C130-B2P3
40	514-7-4-C130-B1P1	82	514-5-2-C494-B2P7
41	514-7-4-C130-B1P4	83	514-7-14-C73-B3P1
42	514-7-4-C130-B1P6	84	514-7-4-C13-B3P5

* Parentais utilizados como testemunha

C: cova

B: bloco

P: planta

2.2 Avaliação da resistência à *M. exigua*

As progênies derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor 440-10 e Catuaí Amarelo IAC 86 (Tabela 1) foram cultivadas em casa de vegetação, sendo as mudas formadas em sacos plásticos de 850 cm³ contendo solo e esterco na proporção de 3:1, previamente desinfestado com dazomete (Basomid®). Em cada saco plástico

foi cultivada uma planta F₅, devidamente identificada com um número para a avaliação da reação ao nematoide e para coleta de folhas para as análises moleculares.

O inóculo foi obtido de raízes de lavoura naturalmente infestada no município de Campos Altos, sendo a preparação realizada por meio da extração dos ovos das raízes pela técnica de Hussey e Barker (1973) e calibração da suspensão de ovos em lâmina de contagem, sob microscópio de objetiva invertida. Para confirmação da espécie, foram retiradas fêmeas das galhas nas raízes e identificadas por meio da análise de isoenzimas (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001) como *M. exigua*, fenótipo E1 (Rm= 1,5). Quando as mudas atingiram entre quatro a seis pares de folhas, inoculou-se 5.000 ovos de *M. exigua* divididos em orifícios feitos ao redor do colo da planta.

Para avaliação da reação ao nematoide, aos 320 dias da inoculação, avaliou-se a população de *M. exigua* por meio da extração de ovos e juvenis das raízes empregando a metodologia de Hussey e Barker (1973) e quantificação em tríplice leitura, utilizando-se microscópio de objetiva invertida. A partir da quantificação foi calculado o Fator de Reprodução (FR), por meio do quociente entre as densidades populacionais finais (Pf) e iniciais (Pi) (SEINHORST, 1967), tomando-se por base a média das três leituras.

O Índice de galhas (IG) foi obtido por meio de uma escala de grau ou nota, de 0 a 5, em função do número de galhas e por meio de tríplice avaliação (0=nenhuma galha, 1= 1-2 galhas, 2=3-10, 3=11-30, 4=31-100, 5=maior que 100 galhas), seguindo-se a metodologia de Hartman e Sasser (1985).

2.3 Extração e quantificação do DNA

Folhas completamente expandidas das progênies F₅ foram coletadas, acondicionadas em sacos de papel umedecidos e transportadas em caixa de isopor até o laboratório. No laboratório essas foram lavadas e congeladas no

freezer -80°C para posterior liofilização e extração do DNA, de acordo com a metodologia de Nunes et al. (2011).

As amostras de DNA foram visualizadas na presença de luz UV após eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo ($0,3 \mu\text{g/mL}$) e imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH 8,0) EDTA 10 mM] a fim de verificar a qualidade do DNA. A quantificação do DNA foi realizada através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Para verificar a contaminação das amostras com proteínas foi realizada leitura das absorbâncias a 280 nm e calculada a relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. Foram consideradas adequadas amostras cuja relação variou de 1,5 a 2.

Após a obtenção de DNA com absorbâncias adequadas, as amostras foram normalizadas a uma concentração final de $50 \eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

2.4 Marcadores microssatélites

Foram testados nos parentais 44 pares de marcadores microssatélites indicados na literatura como polimórficos para a espécie *C. arabica* (Tabela 2).

Tabela 2 Marcadores microssatélites utilizados, suas sequências e tamanho esperado dos alelos

Códigos	Marcadores	Sequência	Referência	Tamanho dos alelos
		5' → 3'		
SSRCafé 1	SSRCa006	D: CTGCTCAGTGAACCATCC	Missio et al. (2009)	209
		R: TGCCTCTTATGCCACTACTAAA		
SSRCafé 2	SSRCa061	D: GCAGGTGCAAGTGATAAAAG	Missio et al. (2009)	242
		R: CGTCTTGTGATGTGTTAGGG		
SSRCafé 3	SSRCa085	D: ATGTGAAAATGGGAAGGATG	Missio et al. (2009)	105
		R: CACAGGAAAGTGACACGAAG		
SSRCafé 4	SSRCa087	D: TCACTCTCGCAGACACTAC	Missio et al. (2009)	143
		R: GCAGAGATGATCACAAGTCC		

Continuação..

SSRCafé 5	SSRCa091	D: CGTCTCGTATCACGCTCTC R: TGTTCCTCGTTCCTCTCTCT	Missio et al. (2009)	110
SSRCafé 6	SSRCa092	D: ATAGCCTGAGCCGTAACCA R: GGGTAATTATGACGAGGGACA	Missio et al. (2009)	142
SSRCafé 7	AJ308742	D: GGCTTCTTGGGTGTCTGTGT R: CCATTGGCTTTGTATTCTGG	Poncet et al. (2004)	110
SSRCafé 8	AJ308746	D: GGCCTTCATCTCAAAAACCT R: TCTTCCAAACACACGGAGACT	Poncet et al. (2004)	378
SSRCafé 9	AJ308783	D: CCAACTTCGTATGGTTGTCTG R: TGATAGGAGGCACTTGACACA	Poncet et al. (2004)	121
SSRCafé 10	AJ308784	D: TTGCTTGCTTGTCTGTTAT R: TGACACGAGAGTTAGAAATGA	Poncet et al. (2004)	126
SSRCafé 11	AJ308790	D: TTTTCTGGGTTTTCTGTGTTCTC R: TAACTCTCCATTCCCGCATT	Poncet et al. (2004)	134
SSRCafé 12	AJ250260	D: TGATGGACAGGAGTTGATGG R: TGCCAATCTACCTACCCCTT	Poncet et al. (2004)	100
SSRCafé 13	CFGA792b	D: GATCAGAACTTTGAGCTCAGCA R: AATGTGGCACGCTAGAAGTG	Cristancho e Álvaro (2008)	182
SSRCafé 14	CFCA281	D: GCGTCCACGTGTTAAGTCTT R: TCAAGTGGCAGACATGTCAC	Cristancho e Álvaro (2008)	155
SSRCafé 15	CFGA627	D: GGGAAGGAATTCTTTCAACTCT R: CTGGAATTACCATGCAACC	Cristancho et al. (2008)	134
SSRCafé 16	CFGA1122	D: AATGCTTCCAGTCACCCGT R: GGCTTTCAAGCATCCAGTCT	Cristancho e Álvaro (2008)	127
SSRCafé 17	CFGA1255	D: TTGACGTTCTCGTCCGTATG R: AAAGGCTTGAAAATTGCGG	Cristancho e Álvaro (2008)	147

Continuação...				
SSRCafé 18	CFCA14A	D: CTGGTAGGAGCTCTTCAAATG R: TGGCCAAATCTGTCCGT	Cristancho e Álvaro (2008)	161
SSRCafé 19	CFCA360	D: TTAAGACATCGGTGCATTCA R: TGTGTACTGGGTTTTTTGATGT	Cristancho e Álvaro (2008)	135
SSRCafé 20	AJ250254	D: GGCTCGAGATATCTGTTTAG R: TTTAATGGGCATAGGGTCC	Combes et al. (2000)	132-166
SSRCafé 21	AJ250255	D: CCCTCCCTGCCAGAAGAAGC R: AACCACCGTCCTTTTCCTCG	Combes et al. (2000)	132-166
SSRCafé 22	AJ250258	D: AACTCTCCATTCGCCATTC R: CTGGGTTTTCTGTGTCTCG	Combes et al. (2000)	89-135
SSRCafé 23	AJ250260	D: TGATGGACAGGAGTTGATGG R: TGCCAATCTACCTACCCCTT	Combes et al. (2000)	100-132
SSRCafé 24	AJ308752	D: TCTTCGTCTTTGCTATTGGT R: TATTAACGTCCATCCACACA	Rovelli et al. (2000)	95
SSRCafé 25	AJ308754	D: TACAAGGGGAGTGGATAAGA R: GTTTGTAGGAGGAAGGTGTG	Rovelli et al. (2000)	153
SSRCafé 26	AJ308755	D: TTTCTCCTCTCCTGCTCTAA R: TCTGGGTTTTCTGTGTCTC	Rovelli et al. (2000)	175
SSRCafé 27	AJ308769	D: TCCATCGTTTACGATTTGTC R: GTCATCTATTTGTGAGCTTGG	Rovelli et al. (2000)	161
SSRCafé 28	AJ308776	D: TCTCCCTCTCCCTCTCTCT R: GCGTTTGGTGGAGATGATA	Rovelli et al. (2000)	152
SSRCafé 29	AJ308792	D: TGCATATATTATCAGTGCATGT R: AATAGTGGTTGTCATCCTTTTC	Rovelli et al. (2000)	105
SSRCafé 30	AJ308796	D: TTCTGGGTTTTCTGTGTCT R: CACACTTCTCTGCAAATCAA	Rovelli et al. (2000)	85
SSRCafé 31	AJ308814	D: GATCATCATCGTCATCATCA R: AGGTATCAAAAAGCACCTGA	Rovelli et al. (2000)	180
SSRCafé 32	AJ308819	D: CCTATCAAACGCATCATGT R: CTGTAGGATTGGGTCATTC	Rovelli et al. (2000)	96

Continuação...				
SSRCafé 33	AJ308821	D: TGCTCCTTCCAAGACATTAC R: TGCTCCTTCCAAGACATTAC	Rovelli et al. (2000)	128
SSRCafé 34	AJ308825	D: TTCTGGTTTCAACTCCATTT R: ATAAACCCAAAAAGACCACA	Rovelli et al. (2000)	133
SSRCafé 35	AJ308833	D: AAACATTGATGGACAGGAGT R: GCCATTGTGTGTGTGTAGAA	Rovelli et al. (2000)	98
SSRCafé 36	AJ308819	D: CCTATCAAACGCATCATGT R: CTGTAGGATTGGGTCATTC	Rovelli et al. (2000)	96
SSRCafé 37	BQ448809	D: GGAAATCCGGAAACATACA R: GGTGCAGTGTATCAGTTTCA	Rovelli et al. (2000)	278
SSRCafé 38	AY102429	D: TGTGAGTCCATTCCTTACC R: TTGCACTCAAAAGGTTCAAA	López-Gartner et al. (2009)	124
SSRCafé 39	EU597602	D: ACCAATTCCTGTCAGTCAGG R: TGGCCATGAGAATAGGCATC	López-Gartner et al. (2009)	180
SSRCafé 40	EU597603	D: TAAAGTGGATGCGTCTCCCA R: GGATAAGCAAGGAGCTGCAA	López-Gartner et al. (2009)	300
SSRCafé 41	EU597604	D: CCATTCTAACCAAACCTGTCC R: CTCAAACACTTGGGTGTGCA	López-Gartner et al. (2009)	125
SSRCafé 42	EU597605	D: CGATTGTCGCTTTGTTGGAT R: GAGTTCAGCAAGTATGACCCA	López-Gartner et al. (2009)	168
SSRCafé 43	EU597606	D: TTCTTCTCCCGCTTCTGCT R: GATCGGTGGTAGTGTGTCAGA	López-Gartner et al. (2009)	231
SSRCafé 44	EU597607	D: TTAAGCTATCCACTCAACCACC R: GCAGAAGCTACTATTCCCATTG	López-Gartner et al. (2009)	161

*D- direito, R- reverso.

pb: pares de bases

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo 50ng de DNA, 6 μ L de tampão de reação 5x, 1 mM de MgCl₂,

150 μ M de cada DNTP, 0,1 μ M de cada iniciador e 0,6 unidades de Taq DNA polimerase (Go Taq Flexi, Promega, USA).

As reações foram conduzidas em termociclador com gradiente (Multigene Gradient, Labnet International, USA) utilizando um programa Touchdown- PCR, que consistiu na desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 13 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento do iniciador de 67°C a 55 °C por 30 segundos, reduzindo 1°C a cada ciclo e extensão do iniciador a 72°C por 30 segundos. Essa etapa foi seguida por mais 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento do iniciador a 55°C por 30 segundos e extensão do iniciador a 72°C por 30 segundos. A extensão final ocorreu a 72 °C por 8 minutos.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, à potência de 60W por tempo variável de acordo com o tamanho esperado dos alelos . Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata, de acordo com o método descrito por Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001). Inicialmente, o gel em processo de coloração passou por uma etapa de fixação durante 10 minutos em solução de etanol (10%) e ácido acético (1%). Em seguida foi lavado com 2 L de água ultrapura (Milli-Q) e submetido a uma pré-coloração com ácido nítrico 1,5%. Passou então por nova lavagem e foi corado em solução de nitrato de prata (0,2%) durante 20 minutos. A revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio (3,5%) contendo 800 μ L de formaldeído 37% (adicionado pouco antes da revelação) durante 20 minutos. Finalmente o gel foi imerso em solução de parada composta de ácido acético (1,5%) durante 5 minutos. Todas as etapas foram realizadas sobre mesa agitadora e em capela de exaustão. Depois de secar por toda a noite à temperatura ambiente, o gel foi fotografado sobre negatoscópio.

2.5 Análises estatísticas

Os fragmentos amplificados de cada marcador microssatélite foram codificados como "1" e "0", onde "1" indica a presença de um alelo amplificado e "0" indica sua ausência. A fim de estudar a diversidade genética entre as progênies de cafeeiro foi estimado o coeficiente de similaridade de Jaccard (JACCARD, 1908), utilizando o programa estatístico GENES (CRUZ, 2013). Por meio do programa MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013) e baseado na distância genética de Jaccard (1-coeficiente de similaridade de Jaccard), foi realizado o agrupamento das progênies pelo método de média aritmética não ponderada, UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic average*) (SNEATH; SOKAL, 1973) a fim de agrupar as progênies mais similares. A análise das coordenadas principais (PCoA) foi realizada pelo programa GenAlex 6.2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), também baseado na distância genética de Jaccard. Nessa análise, utiliza a matriz de distâncias genéticas para produzir um gráfico de coordenadas em que as progênies estão representadas por pontos no plano cartesiano (GOWER, 1966).

2.6 Identificação e análise de marcadores para associação com a resistência à *M. exigua*

Marcadores microssatélites polimórficos foram agrupados pela correlação de Pearson, em marcadores positivos e negativos. Essa correlação foi estimada entre os marcadores e os parâmetros fator de reprodução e índice de galhas, utilizando o programa GENES (CRUZ, 2013).

Posteriormente, a associação entre os marcadores microssatélites e os parâmetros inerentes ao parasitismo foi estimada através da regressão múltipla “*stepwise*”, a fim de identificar os marcadores moleculares relacionados com a

reação das progênies ao nematoide. O índice quantitativo do parasitismo foi tratado como variável dependente enquanto os marcadores microssatélites positivos e negativos foram tratados como independentes. O nível de significância adotado foi de 0,15 para entrada de uma variável no modelo, assim como para sua permanência. A análise foi realizada utilizando PROCGLM do programa estatístico Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 2004) para a associação entre os marcadores e as características fenotípicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De todos os pares de iniciadores utilizados nas progênes F₅, apenas 11 apresentaram polimorfismo nos parentais estudados, sendo eles: SSR Café 4, SSR Café 13, SSR Café 14, SSR Café 15, SSR Café 19, SSR Café 20, SSR Café 32, SSR Café 37, SSR Café 39, SSR Café 40, SSR Café 41. Esse baixo polimorfismo em *C. arabica* já é conhecido (BERTRAND; ANTHONY; LASHERMES, 2001; LASHERMES et al., 1999), visto que a espécie possui base genética estreita, reprodução por autofecundação, tetraploidia (CRISTANCHO; ÁLVARO, 2008), baixa frequência de regiões de microssatélites no genoma (AL-MURISH et al., 2013; CRISTANCHO; ÁLVARO, 2008) e, nesse caso específico, todas as progênes são oriundas de apenas dois diferentes genitores. Baixo polimorfismo também foi relatado por Combes et al. (2000) os quais encontraram cinco marcadores microssatélites polimórficos em 11 testados em *C. arabica* e Cristancho e Álvaro (2008) que observaram cinco marcadores microssatélites polimórficos em 12 testados em genótipos tetraploides de *Coffea*.

Observou-se entre 2 a 8 alelos polimórficos nas progênes F₅ sendo que cada marcador produziu, em média, 4,5 alelos polimórficos amplificados. Alguns desses marcadores apresentaram até 100% de polimorfismo, a exemplo do marcador SSR Café-14 (Tabela 3). Esses resultados demonstram que o número total de alelos polimórficos em uma população depende do seu tamanho, sua constituição genética e ainda dos diferentes marcadores microssatélites utilizados. Resultados com dimensões semelhantes são descritos por Missio et al. (2009) que verificaram média de 5,1 alelos polimórficos por marcador em cultivares de *Coffea*.

Tabela 3 Marcadores microssatélites polimórficos, número de alelos polimórficos obtidos e percentagem de polimorfismo nas progênes de *C. arabica*

Marcador	Alelos	Polimorfismo (%)
SSRCafé 4	05	80,0
SSRCafé 13	07	85,7
SSRCafé 14	04	100,0
SSRCafé 15	06	50,0
SSRCafé 19	03	66,0
SSRCafé 20	04	100,0
SSRCafé 32	04	100,0
SSRCafé 37	04	75,0
SSRCafé 39	02	100,0
SSRCafé 40	07	100,0
SSRCafé 41	08	100,0

O coeficiente de similaridade de Jaccard é um tipo de análise que visa comparar o número de presença de alelos comuns e o número total de alelos envolvidos, excluindo o número de ausências conjuntas (JACCARD, 1908). O método de agrupamento UPGMA, utilizando a distância genética de Jaccard (Figura 1), possibilitou estabelecer três principais grupos distintos, constatar que as progênes apresentam alta dissimilaridade genética e ainda verificar que os marcadores microssatélites utilizados foram eficientes para separar as progênes.



Figura 1 Estimativa de dissimilaridade genética, por meio dos marcadores microssatélites, utilizando o método de agrupamento UPGMA

As progênies que receberam os números 12 e 13 demonstraram a maior similaridade, ou seja, o maior número de alelos em comum. Ambas foram obtidas da seleção das mesmas plantas e devido à reprodução por autogamia, essas progênies possivelmente possuem alta homozigose, podendo até serem réplicas dentro da população, tendo em vista os alelos estudados. Em relação à

resposta ao nematoide *M. exigua*, as progênies foram imunes, apresentando fator de reprodução igual a 0.

O grupo formado com o maior número de progênies foi o um, o qual se inseriu o Híbrido de Timor. Nesse grupo foram verificadas progênies resistentes ou com baixos fatores de reprodução do referido nematoide, característica similar ao Híbrido de Timor. Outro agrupamento de interesse é o três, em que aproximadamente 90% das progênies apresentaram a nota 0 para o índice de galhas e reações imunes e resistentes em relação ao fator de reprodução do nematoide em estudo. Essa observação é de interesse, visto que a utilização de marcadores microssatélites possibilitou o agrupamento de uma grande quantidade de progênies resistentes.

Os germoplasmas utilizados como padrões (Híbrido de Timor 440-10 e Catuaí IAC 86), apresentam respostas resistente e suscetível, respectivamente, ao nematoide estudado e se inseriram em grupos distintos. Vale ressaltar que todas as progênies F₅ são derivadas do mesmo cruzamento, o que demonstra a grande divergência genética dos parentais, característica essa muito desejada em programas de melhoramento que objetivam aumento da base genética (MISSIO et al., 2009). Trabalhos de pesquisa relatam a eficiência dos marcadores moleculares microssatélites em diferenciar genótipos de *C. arabica* de Híbrido de Timor e seus cruzamentos (MISSIO et al., 2009; SETOTAW et al., 2010), fato também evidenciado neste estudo.

Em relação à análise das coordenadas principais (PCoA) as informações obtidas corroboram com os dados observados no dendrograma e exibem o relacionamento genético das populações e suas proximidades (Figura 2). Em geral, a maioria das progênies se aproximou do Híbrido de Timor, situando-se abaixo da coordenada dois. Enquanto a cultivar Catuaí Amarelo IAC 86 se posicionou de maneira isolada e dispersa das demais progênies. A progênie de

número 72 se aproximou da Catuaí e apresentou comportamento de alta suscetibilidade para a resistência ao nematoide, bem semelhante a cultivar. O distanciamento da Catuaí em relação às demais progênes estudadas pode ser explicado pela seleção anteriormente realizada em área infestada pelo nematoide *M. exigua*, a qual possivelmente eliminou progênes altamente suscetíveis.

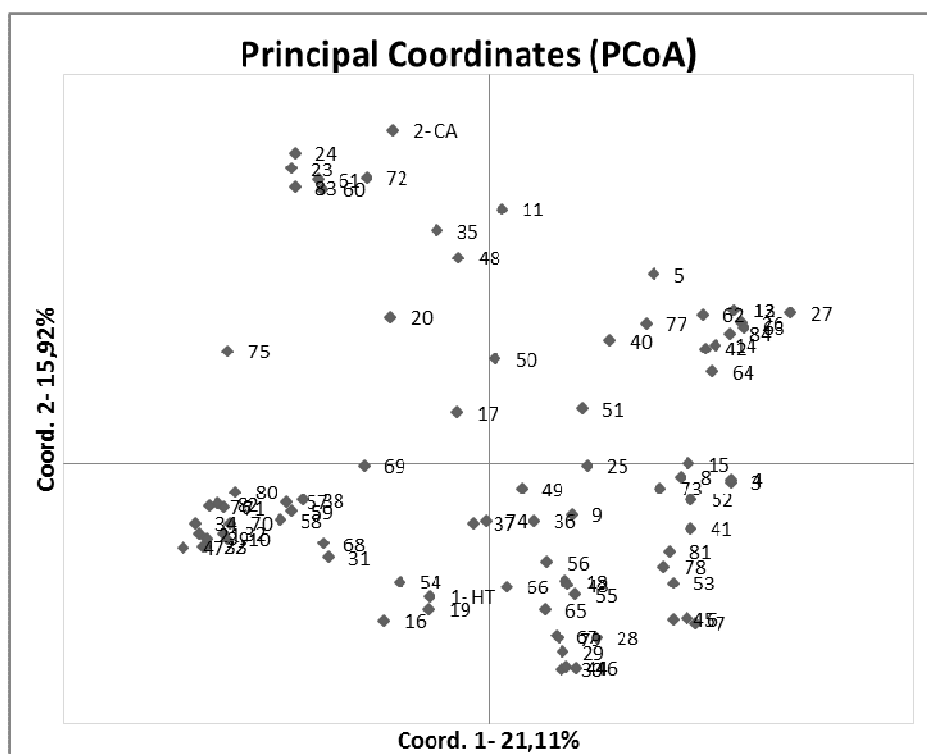


Figura 2 Análise das coordenadas principais por meio dos marcadores microsatélites, das 82 progênes de café juntamente com os parentais Catuaí Amarelo IAC 86 e Híbrido de Timor 440-10

A baixa percentagem de variabilidade explicada pelos eixos um e dois, respectivamente, de 21,11% e 15,92% indicou que as coordenadas principais foram capazes de explicar pequena parte da diversidade. Utilizando os marcadores

microsatélites, AFLP e RAPD, Setotaw et al. (2010) por meio da análise das coordenadas principais explicaram 47,7% e 19,9% da variação total dos acessos de Híbrido de Timor, valor esse superior ao encontrado no presente estudo. Do mesmo modo, Souza et al. (2013) explicaram 19,1% e 5,8% do total da variabilidade do germoplasma *C. canephora* no Brasil utilizando marcadores microsatélites.

A partir dos resultados moleculares e estatísticos foi possível verificar que as progênies apresentam diversidade genética e foram agrupadas em diferentes grupos especialmente relacionadas com a resistência e suscetibilidade ao nematoide. Sendo assim, destaca-se a possibilidade de algum marcador microsatélite se correlacionar com a resistência ao nematoide *M. exigua*.

A análise de correlação de Pearson demonstrou associação entre alguns marcadores e os parâmetros relacionados ao parasitismo do nematoide nas progênies F₅ e os agrupou de acordo com a correlação positiva ou negativa. A análise de regressão múltipla “*stepwise*” foi realizada a fim de selecionar entre os diversos marcadores aqueles com maior contribuição nessa relação. Essa análise tem sido utilizada a fim de identificar marcadores moleculares associados a traços de resistência ou a características agronômicas e tem demonstrado sucesso nas mais diferentes culturas, evidenciando superioridade em relação às demais análises na identificação de marcas associadas à QTL’s “Quantitative Trait Locus” (SILVA; VENCOVSKY, 2002). Ruan e Mopper (2009) demonstraram sucesso na utilização da análise “*stepwise*” na associação de marcadores moleculares com uma doença que provoca seca em uma espécie denominada espinheiro do mar (*Hippophae* L.). Pereira et al. (2008) e Rodrigues et al. (2007) utilizaram essa análise de regressão para identificar QTLs ligados à produtividade de grãos em feijoeiro, enquanto Missio et al. (2011) por meio da mesma análise associaram marcadores microsatélites com a reação de diferentes genótipos de cafeeiro à ferrugem.

De acordo com a Tabela 4, houve correlação positiva entre o fator de reprodução de *M. exigua* e os alelos, SSR Café 32 alelo 2 (96 pares de bases), SSR Café 13 alelo 5 (125 pares de bases), SSR Café 41 alelo 5 (90 pares de bases) e SSR Café 20 alelo 1 (130 pares de bases). Isso significa que o alelo amplificado por esses marcadores está relacionado com os altos valores referentes ao fator de reprodução, ou seja, com a suscetibilidade da planta. Contudo foi baixa a variância fenotípica explicada pelo marcador, visto que os valores do coeficiente de determinação foram reduzidos (Tabela 4). Merece destaque o marcador SSR Café 32 alelo 2 (96 pares de bases), que explicou a maior proporção do fenótipo (R^2) para ambos os parâmetros inerentes ao parasitismo do nematoide.

Tabela 4 Marcadores microssatélites associados ao fator de reprodução de *M. exigua* nas progênies F₅ de cafeeiro

Correlação	Marcador	Valor F	R ² (%)	R ² acumulado (%)	Peso molecular (pb)
Positiva	SSRCafé 32 alelo 2	14,90*	15,87	15,87	96
	SSRCafé 13 alelo 5	10,86**	5,92	21,78	125
	SSRCafé 41 alelo 5	8,83**	3,81	25,59	90
	SSRCafé 20 alelo 1	7,55**	2,83	28,43	130
Negativa	SSRCafé 13 alelo 1	10,13**	11,36	11,36	155
	SSRCafé 20 alelo 3	8,14**	5,90	17,26	100
	SSRCafé 40 alelo 2	7,47*	5,30	22,55	250
	SSRCafé 15 alelo 3	7,10*	4,60	27,20	190

*, **: probabilidade $p < 0.001$ e 0.0001 , respectivamente

R²: coeficiente de determinação

Pb: pares de bases

Os marcadores correlacionados positivamente com as características fenotípicas podem ser utilizados nos programas de seleção assistida (SAM) a fim de descartar as progênies que apresentam a presença do alelo. Caso esses marcadores sejam utilizados juntos, podem explicar até 28,43% da reação a *M. exigua*.

Para a característica índice de galhas do nematoide, além do marcador SSR Café 32 alelo 2 (96 pares de bases), os marcadores SSR Café 19 alelo 2 (130 pares de bases), SSRCafé 20 alelo 1 (130 pares de bases), SSRCafé 37 alelo 2 (260 pares de bases), SSRCafé 39 alelo 1 (100 pares de bases) e SSRCafé 13 alelo 5 (125 pares de bases) também se apresentaram positivamente correlacionados com o parasitismo (Tabela 5), apresentando coeficiente de determinação acumulado de 38,92%.

Tabela 5 Marcadores microssatélites associados ao índice de galhas de *M. exigua* nas progênies F₅ de cafeeiro

Correlação	Marcador	Valor F	R ² (%)	R ² acumulado (%)	Peso molecular (pb)
Positiva	SSRCafé 32 alelo 2	11,22**	12,44	12,44	96
	SSRCafé 19 alelo 2	9,70*	7,47	19,91	130
	SSRCafé 20 alelo 1	9,62*	7,35	27,26	130
	SSRCafé 37 alelo 2	9,24**	5,46	32,73	260
	SSRCafé 39 alelo 1	8,82**	4,30	37,02	100
	SSRCafé 13 alelo 5	7,86**	1,90	38,92	125
Negativa	SSRCafé 13 alelo 2	10,53*	11,76	11,76	150
	SSRCafé 20 alelo 3	11,85**	11,76	23,31	100
	SSRCafé 19 alelo 3	12,35**	9,18	32,48	118
	SSRCafé 40 alelo 2	10,86**	3,89	36,38	250
	SSRCafé 15 alelo 3	9,97**	3,55	39,93	190

*, **: probabilidade $p < 0.001$ e 0.0001 , respectivamente

R²: coeficiente de determinação

Pb: pares de bases

Os marcadores SSR Café 20 alelo 3 (100 pares de bases), SSRCafé 40 alelo 2 (250 pares de bases) e SSRCafé 15 alelo 3 (190 pares de bases) apresentaram correlação negativa com ambas as características avaliadas referentes à *M. exigua*. Os marcadores SSRCafé 20 alelo 3 e SSR Café 19 alelo 3 demonstraram correlação negativa com o índice de galhas, apresentando a maior percentagem de explicação do fenótipo, além de pesos

moleculares de 100 e 118 pares de bases. A correlação negativa apresentada por esses marcadores é de grande interesse neste estudo, pois demonstra que a presença do alelo está relacionada a baixos parâmetros da doença, ou seja, à provável resistência das progênies estudadas à *M. exigua*. Fuganti et al. (2004) observaram que dois marcadores microssatélites, denominados Satt 114 e SOYHSP 176 se correlacionaram com o número de galhas e a nota média atribuída ao nível de infestação de *Meloidogyne javanica* em soja. Ruan e Mopper (2009) encontraram marcadores moleculares ISSR relacionados a uma determinada doença em *Hippophae* L.

O coeficiente de determinação dos marcadores pode ter sido prejudicado neste trabalho pela seleção anteriormente realizada em área infestada por *M. exigua*, a qual eliminou progênies de cafeeiro altamente suscetíveis juntamente ao número de iniciadores utilizados. Outra dificuldade é a ampla variação morfológica e cromossômica entre indivíduos da mesma espécie de nematoide, com possibilidade de patótipos e raças capazes de quebrar a resistência genética das plantas (MEDINA FILHO; BORDIGNON; CARVALHO, 2008), sendo necessária a avaliação da resistência das progênies em diferentes populações do nematoide.

A utilização conjunta desses marcadores selecionados pode apresentar sucesso, visto que o coeficiente de determinação acumulado foi satisfatório. Recomenda-se assim, a validação desses marcadores microssatélites selecionados em outras populações de nematoide para posterior utilização dos mesmos em programas de melhoramento genético assistido por marcadores. A validação desses marcadores pode ser realizada em populações com aproximadamente 100 indivíduos e preferencialmente com alta variabilidade quanto às respostas fenotípicas.

4 CONCLUSÕES

Os marcadores SSR Café 20 alelo 3 (100 pares de bases), SSR Café 40 alelo 2 (250 pares de bases) e SSR Café 15 alelo 3 (190 pares de bases) se associaram à resistência à *M. exigua* nas progênies F₅ de cafeeiro.

REFERÊNCIAS

- AL-MURISH, T. M. et al. Genetic diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) in Yemen via SRAP, TRAP and SSR markers. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Florence, v. 11, n. 2, p. 411-416, 2013.
- ALPIZAR, E.; H. ETIENE.; BERTRAND, B. Intermediate resistance to *Meloidogyne exigua* root-knot nematode in *Coffea arabica*. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, p. 903-910, 2007.
- ANTHONY, F. et al. Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. **Plant Pathology**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 476-728, 2005.
- BARBOSA, D. H. S. G.; SOUZA, R. M.; VIEIRA, H. D. Field assessment of coffee (*Coffea arabica* L.) cultivars in *Meloidogyne exigua*-infested or -free fields in Rio de Janeiro State, Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 175-177. 2010.
- BARBOSA, D. H. S. G.; VIEIRA, H. D.; SOUZA, R. M. Avaliação em Campo de Cultivares de *Coffea arabica* em Áreas Isenta ou Infestada por *Meloidogyne exigua* na Região Noroeste Fluminense –1. Formação da Lavoura. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 32, p. 101-110, 2008.
- BERTRAND, B.; ETIENNE, H.; ESKES, A. B. Growth, production and bean quality of *Coffea arabica* as affected by interspecific grafting: consequences for rootstock breeding. **HortScience**, Alexandria, v. 36, p. 269-273, 2001.
- CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: M. LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2nd ed. Egham: CABI Bioscience, 2005. p. 529-580.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnicas de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 35-44, 2001.

COMBES, M. S. et al. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1171-1193, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: safra 2014: quarta estimativa**. Brasília: CONAB, 2014.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, Atenas, v. 19, n. 4, p. 299-306, Aug. 2001.

CRISTANCHO, M. A.; ÁLVARO, L. G. Isolation, characterization and amplification of simple sequence repeat loci in coffee. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 8, p. 321-329, 2008.

CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 35, p. 271-279, 2013.

DINIZ, L. E. C. et al. Analysis of AFLP markers associated to the *Mex-1* resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 5, p. 387-393, 2005.

FUGANTI, R. et al. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 125-130, 2004.

GOWER, J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, London, v. 53, p. 325-338, 1966.

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Ed.). **An advanced treatise on meloidogyne: methodology**. Raleigh: North Carolina State University, 1985. p. 69-77.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vandoise des Sciences Natureles**, Lausanne, v. 44, p. 223-270, 1908.

JENKINS, J. N. et al. SSR markers for marker assisted selection of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) resistant plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 183, p. 49-54, 2012.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 261, p. 259-266, 1999.

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

MACHADO, E. L. et al. Dissimilaridade genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 3, p. 342-345, 2013.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; CARVALHO, C. H. S.
Desenvolvimento de novas cultivares de café arábica. In: CARVALHO, C. H. S.
(Org.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília:
EMBRAPA CAFÉ, 2008. p. 79-102.

MISSIO, R. F. et al. Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L.
Crop Breeding and Applied Biotechnology, Viçosa, MG, v. 9, p. 361-371, 2009.

MISSIO, R. F. et al. Genetic characterization of an elite coffee germplasm
assessed by gSSR and EST-SSR markers. **Genetic and Molecular Research**,
Berlin, v. 10, n. 4, p. 2366-2381, 2011.

NOIR, S. et al. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora*
conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**,
Oxford, v. 52, n. 1, p. 97-103, Feb. 2003.

NUNES, C. F. et al. An improved method for genomic DNA extraction from
strawberry leaves. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1383-1389, Aug. 2011.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6: genetic analysis in excel.
population genetic software for teaching and research. **Mol Ecol Notes**, Oxford,
v. 6, p. 288-295, 2006.

PEREIRA, A. A. et al. Seleção de cafeeiros de 'Catimor', 'Sarchimor' e
'Híbrido de Timor' com resistência a *Meloidogyne exigua*. In: SISTEMA
ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Projeto Café: resumos de**
trabalhos realizados pelo sistema estadual de pesquisa agropecuária. Belo
Horizonte: EPAMIG, 1980. p. 175-178.

PEREIRA, H. S. et al. Seleção fenotípica e assistida por marcadores moleculares
de famílias de feijoeiro-comum com alta produtividade. **Pesquisa Agropecuária**
Brasileira, Brasília, v. 43, n. 11, p. 1551-1558, 2008.

PEREIRA, T. B. et al. Reação de genótipos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) a *Meloidogyne exigua* população Sul de Minas. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, p. 84-90, 2012.

PINTO, M. F. et al. Seleção de progênies de cafeeiro derivadas de Catuaí com Icatu e Híbrido de Timor. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 3, p. 215-222, 2012.

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

REZENDE, R. M. et al. Resistência de progênies de *Coffea arabica* em área infestada por *Meloidogyne exigua*. **Nematropica**, Bradenton, v. 43, n. 2, 2013.

RODRIGUES, T. B. et al. Identificação de QTLs em feijoeiro por meio de marcadores SSR influenciados pela seleção natural. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1351-1357, 2007.

ROVELLI, P. et al. Microsatellites in *Coffea arabica* L. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 3., Londrina, 2000. **Proceedings...** Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 123-133.

RUAN, C. J.; LI, H.; MOPPER, S. Characterization and identification of ISSR markers associated with resistance to dried-shrink disease in sea buckthorn. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 24, p. 255-268, 2009.

SALGADO, S. M. L.; RESENDE, M. L. V.; CAMPOS, V. P. Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cultivares de cafeeiros resistentes e suscetíveis. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 413-415, 2005.

SALGADO, S. M. L.; REZENDE, J. C. Manejo de fitonematoide em cafeeiro. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. **Café arábica: do plantio a colheita**. Lavras: Epamig, 2010. v. 1, p. 757-804.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT 9.1 user's guide**. Cary, 2004.

SEINHORST, J. W. The relationships between population increase and population density in plant parasitic nematodes: I., definitions of the terms host, host status and resistance: the influence of external conditions on the regulation of population density. **Nematologica**, Leiden, v. 13, p. 429-450, 1967.

SETOTAW, T. A. et al. Breeding potential and genetic diversity of “Híbrido do Timor” coffee evaluated by molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 10, n. 4, p. 298- 304, Dec. 2010.

SILVA, H. D.; VENCOVSKY, R. Poder de detecção de ‘quantitative trait loci’ da análise de marcas simples e da regressão linear múltipla. **Scientia Agricola**, Viçosa, MG, v. 59, n. 4, p. 755-762, 2002.

SILVA, J. F. V. et al. Identificação de marcadores moleculares microssatélites associados à resistência de genótipos de soja a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 79-83, 2001.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman and Co, 1973.

SOUZA, F. F. et al. Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 13, n. 4, p. 273-276, 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis: version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

CAPÍTULO 3

**Mapeamento associativo para reação de progênies de cafeeiro à
*Meloidogyne exigua***

RESUMO

O mapeamento associativo permite estabelecer uma ligação entre a diversidade genética e a diversidade fenotípica e ainda identificar alelos associados a características de interesse. Objetivou-se realizar um mapeamento associativo das progênies de *C. arabica* e identificar marcadores moleculares AFLP associados à resistência à *M. exigua*. Utilizou-se 22 progênies de cafeeiro oriundas do cruzamento entre Híbrido de Timor e Catuaí, juntamente aos sete cultivares comerciais, utilizadas como testemunhas. Foram avaliadas as seguintes características: população de *M. exigua* por grama de raiz, população de *M. exigua* por 100 cc de solo, número de galhas e vigor vegetativo, sendo essas avaliações realizadas em janeiro e julho. Em laboratório, foram utilizadas 11 combinações de marcadores AFLP previamente propostos como polimórficos para resistência ao nematoide. Verificou-se 158 alelos polimórficos com uma média de 14,4 alelos polimórficos por combinação de iniciadores AFLP. A fim de verificar a divergência genética entre as progênies foi realizada a análise das coordenadas principais (PCoA), no qual foram formados quatro grupos, assim como, para as características fenotípicas analisadas por meio do agrupamento UPGMA. Em relação à estrutura genética das progênies, utilizou-se a análise Bayesiana em que se identificou dois grupos ($K=2$), sendo que 90% das progênies resistentes se inseriram em um mesmo grupo. Por fim, foi utilizada uma abordagem de modelo linear misto (MLM) a fim de identificar marcadores AFLP associados com a resistência ao nematoide, o qual incorpora informações da estrutura populacional (Q-matriz) com o coeficiente Kinship das progênies. Verificou-se que esse modelo possibilitou identificar marcadores moleculares AFLP associados à reação ao nematoide em estudo.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Estrutura genética. Nematoides. AFLP.

ABSTRACT

The association mapping analysis permits to establish linkage between genetic diversity and phenotypic diversity and helps to identify makers associated with the character of interest. This research work was realized with the objective of identifying AFLP molecular marker associated with the resistance of *M. exigua* in progenies of *C. arabica* using association mapping. Twenty-two accessions derived from the crossing of Híbrido de Timor and Catuaí and 7 standard cultivars were used in this study. The following characteristics were evaluated two times in January and July: population of *M. exigua* in a gram of root, population of *M. exigua* in 100 cc of soil, number of gal and vegetative vigor. Eleven combinations of AFLP markers previously identified for its polymorphism for nematode resistance was used to genotype the study populations. A total of 158 polymorphic AFLP alleles were identified with 14.4 allele per combination of AFLP markers. To verify the genetic diversity among progenies was realized principal coordinate analysis (PCoA) that forms 4 groups similar to the UPGMA clustering method using phenotypic characteristics. The population structure was determined based on the Bayesian model of clustering using STRUCTURE program and identified two groups (K=2), being 90% of the resistant progenies clustered in the same group. Finally, the association mapping was done using the mixed linear model (MLM) using TASSEL to identify the AFLP markers associated with nematode resistance, that incorporate the populations structure information (Q-matrix) and the Kinship coefficient among genotypes. This model make possible identify AFLP markers associated with the nematode resistance.

Keywords: *Coffea arabica*. Genetic structure. Nematodes. AFLP.

1 INTRODUÇÃO

A espécie de fitonematóides *Meloidogyne exigua* é uma das mais importantes devido à ampla disseminação e pelos danos que causam ao cafeeiro. Essa espécie já foi constatada em diversos estados produtores de café e embora não cause declínio rápido no cafeeiro infestado, pode reduzir a produção em até 45% (BARBOSA et al., 2004). Entre os sintomas nas plantas infestadas, verifica-se a presença de galhas arredondadas em raízes novas e ainda alterações no estado nutricional do cafeeiro causado pela deficiente absorção e translocação de água e nutrientes (BARBOSA; SOUZA; VIEIRA, 2010). Entre as formas de controle do nematóide, a utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente, econômico e ambientalmente seguro (ALPIZAR; ETIENNE; BERTRAND, 2007; CAMPOS; VILLAIN, 2005).

O Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro conduzido em Minas Gerais realiza uma série de testes clássicos, a fim de confirmar a reação de diversas progênies ao nematóide. Nesse contexto, uma ferramenta auxiliar no melhoramento genético do cafeeiro é a utilização de marcadores moleculares. Caso seja verificada a associação entre algum marcador com a resistência das progênies ao nematóide, esta poderá ser utilizada a fim de aumentar a eficiência da seleção pelo aumento de ganho por unidade de tempo, tendo em vista que algumas progênies poderão ser eliminadas na fase inicial dos programas de melhoramento por possivelmente não apresentarem as características desejadas.

Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares utilizados no cafeeiro, estão os marcadores AFLP (VOS et al., 1995), que apresentam vantagens em relação aos demais tipos, como a detecção de um maior número de locos, cobertura ampla do genoma, baixo custo (LOPES et al., 2002) e ainda eficiência na caracterização de cultivares de *C. arabica* (ANTHONY et al., 2002). Por meio da utilização dos marcadores moleculares é possível realizar mapeamentos

associativos que permitem estabelecer uma ligação entre a diversidade genética e a diversidade fenotípica (LÓPEZ-GARTNER et al., 2009). Com isso, sucesso tem sido verificado na identificação de marcadores moleculares associados aos genes de interesse em regiões específicas do genoma (ZHAO et al., 2007), os quais poderão ser utilizados com êxito nos programas de melhoramento do cafeeiro, a fim de selecionar marcas associadas à resistência à *M. exigua* na população estudada.

Alguns trabalhos demonstram a relação entre marcadores moleculares e a resistência à *M. exigua* em cafeeiro, entre eles, Noir et al. (2003) que apresentaram 14 marcadores AFLP associados à resistência ao nematoide e demonstraram que a resistência à *M. exigua* em cafeeiro é controlada por um gene dominante simples, designado *Mex-1*, presente em *C. canephora*. Além disso, Diniz et al. (2005) verificaram a presença da introgressão do gene *Mex-1* em linhagens de Icatu utilizando cinco marcadores AFLP e indicaram que essa marca pode ser utilizada na seleção assistida por marcadores. Por fim, Alpizar, Etienne e Bertrand (2007) demonstraram que o gene *Mex-1* apresenta expressão dominante incompleta em condições de campo e de casa de vegetação, pois permitiu a penetração do nematoide, mas com redução na sua reprodução em cultivares híbridas.

Considerando-se a importância dos programas de melhoramento genético de plantas para a melhoria da agricultura e o impacto que as ferramentas da biologia molecular estão proporcionando para as diversas áreas de pesquisa, objetivou-se realizar um mapeamento associativo das progênes de *C. arabica*, identificando marcadores AFLP associados à resistência ao nematoide *M. exigua* na população estudada a fim de auxiliar nos futuros programas de melhoramento do cafeeiro.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Progênies

O experimento encontra-se localizado em área naturalmente infestada por *M. exigua*, fenótipo E1 (Rm= 1,5) na Fazenda Ouro Verde, propriedade particular, no município de Campos Altos, região do Alto Paranaíba de Minas Gerais, sendo 19°41'47" de latitude sul, 46°10'17" de longitude oeste e altitude média de 1230 m. A temperatura média anual é 17,6°C, com precipitação média de 1830 mm, sendo o tipo de solo o Latossolo Vermelho Amarelo Húmico, com textura argilosa e relevo plano.

Foram utilizadas 22 progênies de cafeeiro com potencial resistência ao nematoide *M. exigua* juntamente as sete cultivares testemunhas (Tabela 1). Essas progênies são derivadas do cruzamento entre cultivares do grupo Catuaí e Híbrido de Timor, encontram-se em geração F₄ e são pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro conduzido em Minas Gerais.

Tabela 1 Relação e genealogia das progênies em geração F₄ avaliadas no município de Campos Altos – MG

Nº	Progênies	Origem
1	514-5-4-C25	CA IAC 86 x HT UFV 440-10
2	436-1-4-C26	CV IAC 99 x HT UFV 442-42
3	518-7-6-C71	CV IAC 141 x HT UFV 442-34
4	514-7-14-C73	CA IAC 86 x HT UFV 440-10
5	514-5-2-C101	CA IAC 86 x HT UFV 440-10
6	516-8-2-C109	CA IAC 86 x HT UFV 446-08
7	504-5-6-C117	CV IAC 81 x HT UFV 438-01
8	514-5-4-C121	CA IAC 86 x HT UFV 440-10
9	514-7-4-C130	CA IAC 86 x HT UFV 440-10
10	493-1-2-C134	CV IAC 44 x HT UFV 446-08
11	505-9-2-C171	CV IAC 81 x HT UFV 438-52

Continuação...		
12	518-2-6-C182	CV IAC 141 x HT UFV 442-34
13	514-7-16-C208	CA IAC 86 x HT UFV 440-10
14	514-7-16-C211	CA IAC 86 x HT UFV 440-10
15	493-1-2-C218	CV IAC 44 x HT UFV 446-08
16	438-7-2-C233	CA IAC 86 x HT UFV 451-41
18	514-7-8-C364	CA IAC 86 x HT UFV 440-10
19	518-2-10-C408	CV IAC 141 x HT UFV 442-34
20	514-5-2-C494	CA IAC 86 x HT UFV 440-10
21	518-2-4-C593	CV IAC 141 x HT UFV 442-34
22	516-8-2-C568	CA IAC 86 x HT UFV 446-08
23	518-2-6-C685	CV IAC 141 x HT UFV 442-34
24	Catuai Vermelho IAC 99*	-
25	Catuai Amarelo IAC 62*	-
26	Topázio MG 1190*	-
27	Rubi MG 1192*	-
28	Acaia Cerrado MG 1474*	-
29	Icatu Precoce IAC 3282*	-
30	Icatu Vermelho IAC 2942*	-

CA: Catuai Amarelo; CV: Catuai Vermelho; HT: Híbrido de Timor.

*Cultivares utilizadas como testemunha.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, totalizando 116 parcelas, sendo cada parcela constituída por oito plantas. O espaçamento utilizado foi de 4,0 x 0,8 m nas entrelinhas e entre plantas, respectivamente, correspondendo a uma área total de 2969,6 m².

A condução do cafeeiro foi realizada de acordo com as recomendações técnicas para a cultura do cafeeiro, sendo as adubações realizadas conforme a 5ª Aproximação da Comissão de Fertilidade do Solo do estado de Minas Gerais (GUIMARÃES et al., 1999).

2.2 Avaliação das características nematológicas e vigor vegetativo

Aos 10 anos do plantio em área naturalmente infestada, avaliou-se a população de *M. exigua* nas progênies de cafeeiro, em duas épocas distintas, janeiro e julho. As amostras de solo e raízes foram retiradas na profundidade de 20-40 cm nos dois lados da planta, na quantidade aproximada de 50 gramas de solo em cada planta da parcela, misturadas em balde para formar a amostra composta de 500 g de solo e 100 g de raízes de cada parcela experimental.

As amostras de solo foram peneiradas para retirada de 3 alíquotas de 100 g de solo e processadas em laboratório pelo método de flotação e centrifugação de Jenkins (1964) a fim de verificar a população de *M. exigua* por 100 cc de solo. Em relação às raízes, estas foram pesadas e em seguida realizou-se a extração de nematoides pela metodologia de Hussey e Barker (1973). A quantificação da população de *M. exigua* nas raízes e no solo foi realizada em microscópio de objetiva invertida utilizando câmara de contagem em tríplice leitura a fim de verificar a população média de *M. exigua* por grama de raiz e em 100 cc de solo.

Para a quantificação do número de galhas em 15 gramas de raízes, estas foram cuidadosamente lavadas, retirando o excesso de água com papel absorvente e em seguida foi realizada a contagem em todas as amostras coletadas.

Para avaliação do vigor vegetativo atribuiu-se notas conforme escala arbitrária de 10 pontos, sendo a nota 1 correspondente às piores plantas, com reduzido vigor vegetativo e acentuado sintoma de depauperamento, e 10, às plantas com excelente vigor, mais enfolhadas e com acentuado crescimento vegetativo dos ramos produtivos, conforme sugerido por Carvalho, Mônico e Fazuoli (1979).

2.3 Extração e quantificação do DNA

Folhas completamente expandidas de quatro plantas representativas de cada progênie F₄ foram coletadas, acondicionadas em sacos de papel umedecidos e em caixa de isopor para serem transportadas até o laboratório. No laboratório essas foram lavadas e congeladas no freezer -80°C para posterior liofilização e extração de DNA, de acordo com a metodologia de Nunes et al. (2011).

As amostras de DNA foram visualizadas na presença de luz UV após eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo (0,3 µg/mL) e imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH 8,0) EDTA 10 mM] a fim de verificar a qualidade do DNA. A quantificação do DNA foi realizada através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Para verificar a contaminação das amostras com proteínas foi realizada leitura das absorbâncias a 280 nm e calculada a relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. Foram consideradas adequadas amostras cuja relação variou de 1,5 a 2.

Após a obtenção de DNA com absorbâncias adequadas, as amostras foram normatizadas a uma concentração final de 50 ng µL⁻¹. Posteriormente, as amostras foram analisadas de acordo com a técnica dos segregantes agrupados (BSA- *Bulk Segregant Analysis*) de acordo com Michelmore, Paran e Kesseli (1991), no qual diferentes plantas de uma mesma progênie são analisadas e unidas como uma única amostra.

2.4 Marcadores AFLP

O modelo proposto por Noir et al. (2003) foi tomado como base para a seleção dos marcadores utilizados. Foram utilizados os marcadores Exi-1, Exi-2, Exi-3, Exi-4, Exi-5, Exi-6, Exi-8, Exi-9, Exi-11, Exi-12 e Exi-13, sendo a combinação de cada iniciador descrita na Tabela 2.

Tabela 2 Código dos marcadores e suas combinações *EcoRI/MseI*

Código	Combinação
Exi-1	E-AGC M-CAA
Exi-2	E-AGG M-CTT
Exi-3	E-CAT M-CTT
Exi-4	E-CAT M-AAC
Exi-5	E-ACG M-ACC
Exi-6	E-AGC M-AGT
Exi-8	E-AAG M-ACG
Exi-9	E-AAG M-CGT
Exi-11	E-CAC M- CTA
Exi-12	E-CAA M- AGG
Exi-13	E-CAC M- CAT

O protocolo de reação foi realizado de acordo com o AFLP Analysis System I/ AFLP Starter Primer (Invitrogen Corporation), sendo constituído das seguintes etapas: digestão do DNA genômico, ligação dos adaptadores, reação de pré-amplificação e por fim, reação de amplificação utilizando os pares (combinações) de marcadores. Foram necessárias algumas adaptações ao kit, pelo fato de algumas combinações de marcadores não se incluírem neste.

O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, à potência de 60W. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata, de acordo com o método descrito por Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001). Inicialmente, o gel em processo de coloração passou por uma etapa de fixação durante 10 minutos em solução de etanol (10%) e ácido acético (1%). Em seguida foi lavado com 2 L de água ultrapura (Milli-Q) e submetido a uma pré-coloração com ácido nítrico 1,5%. Passou então por nova lavagem e foi corado em solução de nitrato de prata (0,2%) durante 20 minutos. A revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio (3,5%) contendo 800 µL de formaldeído 37% (adicionado pouco antes da revelação) durante 20 minutos. Finalmente o gel foi imerso em solução de parada composta de ácido acético (1,5%) durante 5 minutos. Todas as etapas foram realizadas sobre mesa

agitadora e em capela de exaustão. Depois de secar por toda noite à temperatura ambiente, o gel foi fotografado sobre negatoscópio.

Os alelos polimórficos foram designados de acordo com o tamanho dos fragmentos e de acordo com a combinação de *primer* utilizada (*EcoRI* seguida do *MseI*). Esses foram manualmente codificados de acordo com a escala binária, sendo que o número “1” indica presença do alelo no indivíduo e “0” indica a ausência no indivíduo.

2.5 Análises estatísticas

Realizou-se a análise das coordenadas principais (PCoA) utilizando os marcadores AFLP, pelo programa GenAlex 6.2 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), baseado na distância genética de Jaccard. Na análise PCoA se utiliza da matriz de distâncias genéticas para produzir um gráfico de coordenadas em que as progênies estão representadas por pontos no plano cartesiano (GOWER, 1966). A distância genética de Jaccard foi estimada por meio do programa estatístico GENES (CRUZ, 2013). A fim de confirmar a diversidade genética das características avaliadas nas progênies, foi realizado o agrupamento das progênies pelo método de média aritmética não ponderada, UPGMA (SNEATH SOKAL, 1973) baseado na distância euclidiana, a fim de agrupar as progênies mais similares, utilizando o programa MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013).

2.5.1 Estrutura genética

A análise de estrutura genética populacional fundamentada no modelo de agrupamento Bayesiano foi realizada com o auxílio do programa STRUCTURE v. 2.3.4 (HUBISZ et al., 2009; PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), no qual os indivíduos são agrupados de acordo com seus genótipos em K populações. Para essa análise assumiu-se o conjunto de parâmetros com frequências de alelos correlacionados e modelo “Admixture” com 100.000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo repetições), 10.000 simulações e valores de K variando de 1 a 12 populações com 20 tentativas para cada K. Para determinar o número de grupos apropriados foi utilizado o STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012), baseado no procedimento de Evanno, Regnaut e Goudet (2005). Para cada valor de K, as tentativas com maior probabilidade ($\ln P(D)$) foram consideradas para a análise de agrupamento e mapa associativo.

2.5.2 Análises referentes ao mapeamento associativo

Nesta análise utilizou-se os valores médios das três características referentes à reação ao nematoide: população de *M. exigua* por grama de raiz, população de *M. exigua* por 100 cc de solo e número de galhas juntamente a genotipagem, por meio dos marcadores AFLP. Para testar a significância das associações entre marcadores e o fenótipo foi utilizado o modelo linear misto (MLM) utilizando o software TASSEL (BRADBURY et al., 2007), considerando no modelo K e Q matriz juntamente ao efeito dos marcadores. O Q é o coeficiente de probabilidade dos indivíduos obtidos a partir de cada subgrupo por meio do programa STRUCTURE enquanto o K é o coeficiente Kinship entre indivíduos estimado por meio do GenoDive

(<http://www.bentleydrummer.nl/software/software/GenoDive.html>). Antes da análise do mapeamento associativo, todos os valores negativos do coeficiente Kinship foram substituídos por zero, como recomendado pelo programa TASSEL. Por fim, para estimar o efeito dos marcadores moleculares utilizando o MLM foi utilizado o seguinte modelo:

Fenótipo = Marcador + Q matriz + K matriz + erro

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 158 alelos polimórficos nas 11 combinações de *EcoRI/MseI* utilizadas, com média de 14,4 alelos polimórficos por combinação e tamanho de bandas variando de 50 a 700 pares de bases. Os marcadores produziram os seguintes números de alelos polimórficos: Exi-1 (18), Exi-2 (5), Exi-3 (21), Exi-4 (11), Exi-5 (20), Exi-6 (11), Exi- 8 (7), Exi-9 (16), Exi-11 (19), Exi-12 (7) e Exi-13 (23). Destaque para o iniciador Exi-13 que apresentou 23 alelos polimórficos.

Resultados semelhantes foram descritos por Steiger et al. (2002) que encontraram 274 alelos polimórficos em cultivares de *C. arabica* por meio de 24 marcadores AFLP, enquanto Lashermes et al. (2011) observaram 73 alelos polimórficos utilizando 33 combinações de marcadores AFLP no estudo da introgressão de genes de *C. canephora* em *C. arabica* e Setotaw et al. (2010) que verificaram 80 alelos polimórficos em 44 genótipos de Híbrido de Timor. De acordo com Maras et al. (2008), esses valores variam de acordo com a estrutura genética da população, a combinação, o número de marcadores e ainda o equipamento utilizado para a separação e visualização de bandas.

A fim de verificar a dispersão gráfica das progênies por meio dos marcadores foi realizada a análise das coordenadas principais (PCoA), utilizando a distância genética de Jaccard (Figura 1). Essa análise demonstra a proximidade genética entre as progênies e tem sido utilizada de modo complementar a análise da estrutura genética. Verificou-se que as duas coordenadas explicaram um percentual total igual a 35,21% da diversidade genética das progênies, sendo que a coordenada um, explicou 25,98% e a coordenada dois, 9,24%. Esses resultados demonstram que a análise das coordenadas principais foi capaz de resumir pequena parte da diversidade genética, porém, valores ainda inferiores aos encontrados nesse estudo foram descritos por Souza et al. (2013) em *C. canephora*.

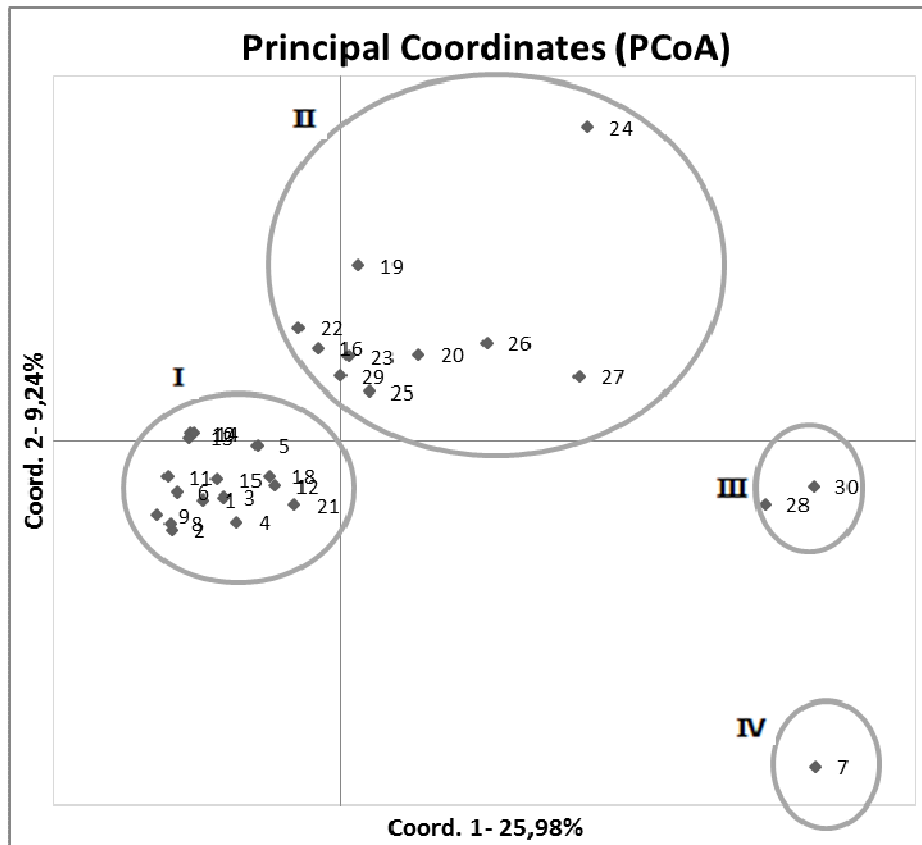


Figura 1 Análise das coordenadas principais por meio dos marcadores AFLP, das progênies de cafeeiro juntamente com as cultivares utilizadas como testemunha

De acordo com os resultados da análise PCoA, verificou-se a formação de quatro principais grupos entre as progênies estudadas. Da mesma maneira a análise das principais coordenadas foi utilizada por López-Gartner et al. (2009) e Setotaw et al. (2010) para estudar a diversidade genética em acessos de *C. arabica* e Híbrido de Timor, respectivamente.

No grupo de número I ficou agrupada a maioria das progênies que apresentou comportamento de resistência ao nematoide, enquanto nos demais grupos se inseriram grande parte das progênies suscetíveis a *M. exigua*. No grupo III estiveram agrupadas duas das cultivares utilizadas como testemunha, com reações semelhantes em relação ao nematoide. A eficiência na caracterização de recursos genéticos via aplicação de marcadores AFLP tem sido atestada em outros trabalhos com cafeeiro (LASHERMES et al., 2011; PEARL et al., 2004; STEIGER et al., 2002).

Por meio da análise de agrupamento UPGMA, das características referentes à reação ao nematoide juntamente ao vigor vegetativo, verificou-se a formação de quatro grupos distintos e a grande diversidade genética entre as progênies estudadas em relação às características avaliadas (Figura 2).

Essa análise de agrupamento apresentou resultados semelhantes à análise das coordenadas principais quanto ao número de grupos formados, o qual pode sugerir a relação entre os marcadores moleculares e a resistência ao nematoide *M. exigua*. Nesse contexto, verificou-se que todas as progênies inseridas no grupo I apresentaram resistência ao nematoide *M. exigua*, e maiores notas referentes ao vigor vegetativo, demonstrando a grande superioridade dessas progênies em relação a essas características avaliadas. Nos grupos II, III se inseriram as progênies que apresentaram suscetibilidade, enquanto no grupo IV as progênies que, de modo geral, apresentam comportamento de alta suscetibilidade ao nematoide *M. exigua*, apresentando maior população do nematoide por grama de raiz, assim como o número de galhas.

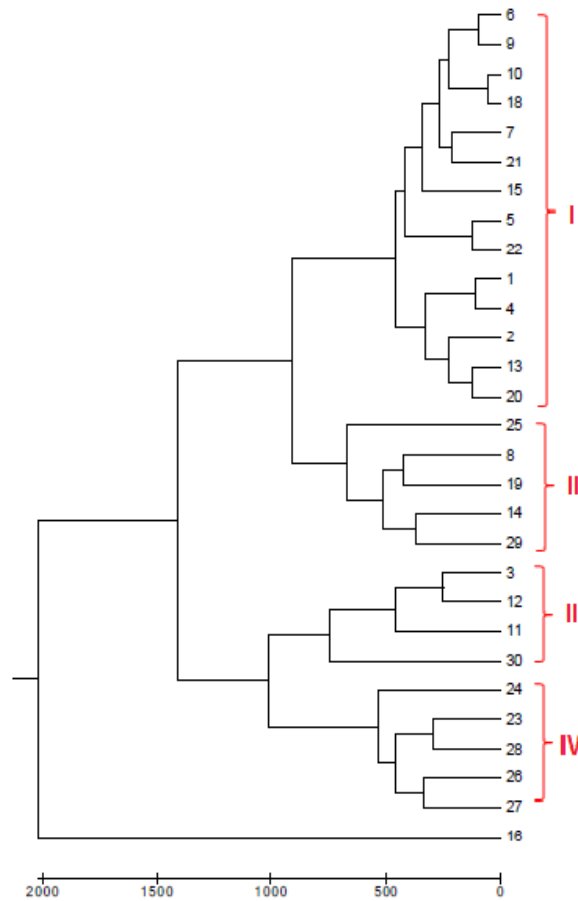


Figura 2 Estimativa de dissimilaridade genética, utilizando as características referentes ao comportamento das progênies a *M. exigua* e vigor vegetativo, utilizando o método de agrupamento UPGMA

Vale salientar que a característica população de *M. exigua* por grama de raiz apresentou correlação negativa com o vigor vegetativo, ou seja, os maiores valores referentes ao vigor vegetativo estiveram associados aos menores valores de *M. exigua* nas progênies estudadas. Ferraz (2008) explica que plantas infectadas pelo nematoide tendem a apresentar redução na absorção de água e nutrientes com

posterior clorose, desfolhamento, redução no crescimento, características essas que consequentemente reduzem o vigor vegetativo das plantas.

3.1 Estrutura genética

A fim de entender a estrutura genética das progênies estudadas foi realizada a análise de grupos com base em locos múltiplos utilizando a estatística Bayesiana, por meio do programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELL, 2000), sendo esse método o mais utilizado nas publicações recentes (LÓPEZ-GARTNER et al., 2009; MERCER, 2011; NEMLI et al., 2014). O método atribui indivíduos a populações, enquanto simultaneamente estima as frequências alélicas (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELL, 2000) com base nas propriedades de verossimilhança e permite ainda conhecer a mistura presente nas progênies por meio da percentagem compartilhada de ancestrais (LÓPEZ-GARTNER et al., 2009).

Por meio do critério de avaliação do ΔK proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005) para definição do número mais provável de subpopulações, verificou-se o valor ótimo como $K=2$, ou seja, dois grupos representam a estrutura genética das progênies avaliadas (Figura 3). Esse valor é interessante, visto que o objetivo do estudo é agrupar as progênies em resistentes ou suscetíveis ao nematoide *M. exigua*. López-Gartner et al. (2009) verificaram a formação de nove grupos de acordo com a origem e distribuição de cultivares de *C. arabica* originárias da Etiópia e constataram a eficiência do modelo Bayesiano em estudar a estrutura genética das mesmas, assim como Setotaw et al. (2010), no qual foram formados três grupos em acessos do germoplasma Híbrido de Timor por meio de marcadores AFLP, microssatélites e RAPD por meio da mesma metodologia.

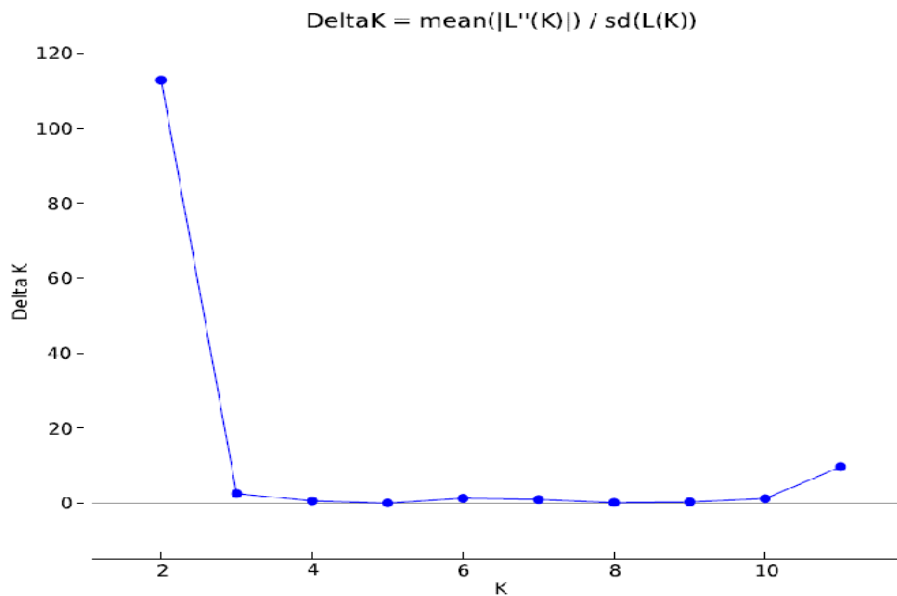


Figura 3 Estimação do número de grupos por meio dos valores de delta K por meio do programa STRUCTURE HARVESTER

Posteriormente, as progênies foram então submetidas ao teste de atribuição, considerando o painel associativo subdividido em dois grandes grupos. Nessa análise, por meio do programa STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012), verificou-se que 22 progênies estiveram inseridas no grupo vermelho, sendo elas, as de número 8, 2, 9, 13, 10, 11, 1, 6, 15, 14, 3, 4, 5, 16, 22, 23, 21, 18, 29, 19, 12 e 26, enquanto o restante se inseriu no grupo verde.

No grupo vermelho, ficaram inseridas aproximadamente 90% das progênies que apresentaram comportamento de resistência à *M. exigua* (Figura 4), evidenciando a eficiência da utilização de marcadores AFLP juntamente a metodologia de análise empregada, para conhecer as percentagens de mistura presente nas progênies e ainda selecionar as progênies que apresentam a introgressão do gene *Mex-1*, podendo esta ser realizada nas fases iniciais do

desenvolvimento do cafeeiro, a exemplo da fase de mudas. Esse procedimento de seleção permite avaliar um menor número de progênies nos testes de resistência em casa de vegetação ou no campo, maximizando os ganhos genéticos, o que é de grande utilidade nos programas de melhoramento genético do cafeeiro. López-Gartner et al. (2009) utilizando a mesma metodologia, conseguiram identificar geneticamente espécies diploides de tetraploides de *Coffea* e ainda separá-las em origem de domesticação e dispersão histórica.

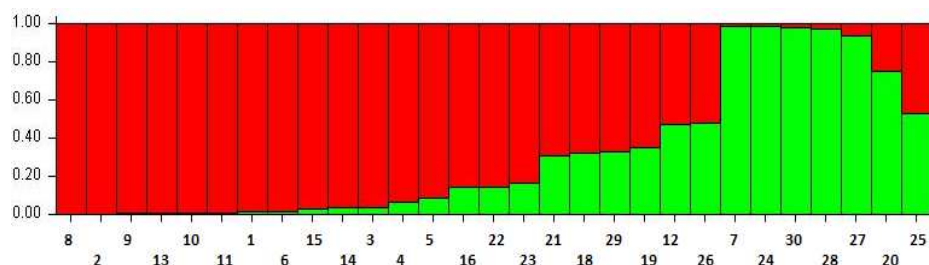


Figura 4 Teste de atribuição para as progênies de *C. arabica* avaliadas ($k=2$). Cada subgrupo é representado por uma cor e os indivíduos estão representados por linhas verticais com seus respectivos números. Diferentes cores em um mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo

De acordo com o teste de atribuição, algumas progênies suscetíveis se inseriram juntamente as resistentes no grupo de coloração vermelha. A explicação se deve ao fato que nem todas as progênies que apresentam a introgressão do gene *Mex-1* verificada por meio dos marcadores AFLP, são necessariamente resistentes à *M. exigua* em condições de casa de vegetação e de campo (DINIZ et al., 2005; NOIR et al., 2003). Ou seja, essas progênies apresentam o fragmento introgridido de *C. canephora*, o qual confere a resistência, mas este pode não ser completo ou menor do que o necessário, nesse caso, o fragmento pode não ‘carregar’ o alelo associado à resistência.

A fim de estimar a variação genética entre as duas subpopulações, diagramas de caixas “*boxplots*” foram construídos baseados nas reações das progênies ao nematoide (Figura 5). Verificou-se que para todas as características avaliadas, as progênies agrupadas no grupo vermelho apresentaram valores inferiores ao grupo verde, ou seja, maior resistência à *M. exigua*. Nesse contexto, observou-se que a metodologia empregada a fim de verificar a estrutura genética foi útil no agrupamento das progênies mais resistentes.

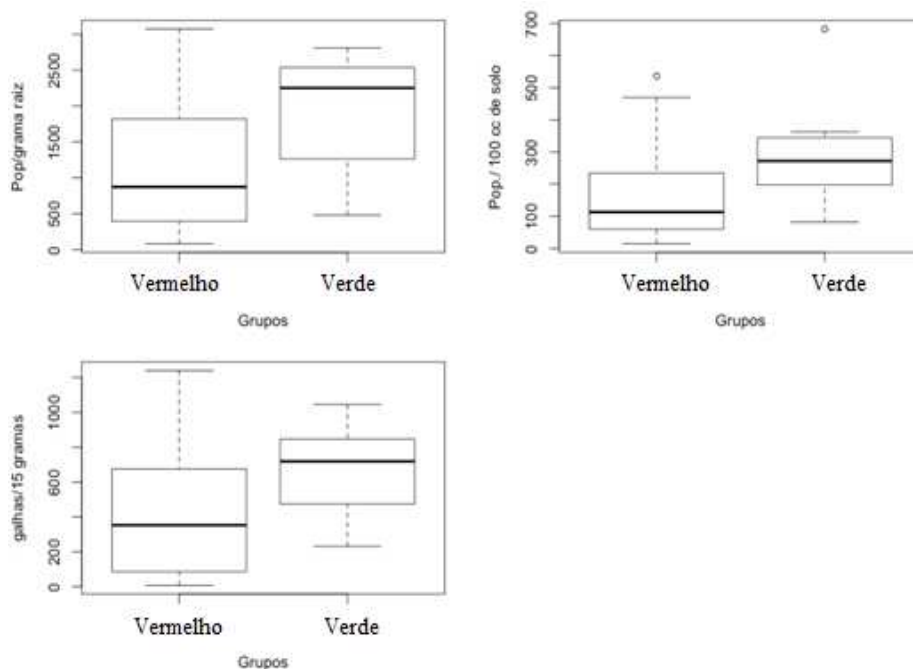


Figura 5 Diagrama de caixas “*boxplots*” das subpopulações formadas por meio da estrutura genética com base nas características referentes ao nematoide

A análise da estrutura genética apresentou algumas semelhanças em relação à análise por meio das coordenadas principais, sendo que as progênies inseridas no grupo vermelho na última análise foram divididas em dois grupos

na análise das coordenadas principais. Entre as vantagens da utilização do agrupamento da estrutura genética estão o reconhecimento entre misturas presentes em indivíduos, o agrupamento baseado nas probabilidades da verossimilhança ao invés do agrupamento com base na distância e ainda maior confiabilidade visto que a aglomeração final não depende do pesquisador (LÓPEZ-GARTNER et al., 2009).

3.2 Mapeamento associativo

O conjunto de progênies utilizadas para compor o mapeamento associativo mostrou ampla variabilidade assim como os marcadores moleculares que exibiram considerável polimorfismo. Em termos fenotípicos, diversas progênies demonstraram resistência à *M. exigua*, sendo essa característica de grande interesse.

A metodologia utilizada foi a de modelos lineares mistos que são uma extensão dos modelos lineares, porém fornecem p-valores mais significativos, ou seja, com melhores associações (NEMLI et al., 2014). Os modelos lineares mistos são amplamente utilizados para análise de dados não normais que envolvem efeitos aleatórios, permitindo a inserção de mais fatores que fornecem melhor estimativa dos dados (BOLKER et al., 2008), realizando-se uma seleção mais forte o qual reduz a chance de cometer o erro tipo I. De acordo com Yu et al. (2006), esse modelo tem se mostrado o mais apropriado para a realização de mapas associativos.

Verificou-se que para a característica população de *M. exigua* por grama de raiz, dois marcadores AFLP apresentaram associação à reação ao nematoide, enquanto para a população do nematoide em 100 cc de solo, seis marcadores demonstraram correlação (Tabela 3). Por fim, para número de galhas, quatro marcadores AFLP se associaram as diferentes respostas. A população de *M.*

exigua no solo é o reflexo do comportamento das progênies, visto que progênies resistentes tendem a apresentar menor população do nematoide no solo, pois o nematoide necessita da planta para completar seu ciclo de vida.

Tabela 3 Marcadores AFLP associados a reação das progênies de *C. arabica* e a população do nematoide no solo

Característica	Marcador e tamanho (pb)	Efeito	R ² (%)	Valor p
População <i>M. exigua</i> / grama de raiz	Exi-5- 500pb	-	33,3	0,005
População <i>M. exigua</i> / grama de raiz	Exi-3- 130pb	+	18,5	0,031
População <i>M. exigua</i> / 100 cc de solo	Exi-5- 500pb	-	15,2	0,049
População <i>M. exigua</i> / 100 cc de solo	Exi-5- 650pb	-	16,4	0,041
População <i>M. exigua</i> / 100 cc de solo	Exi-4-180pb	-	17,31	0,036
População <i>M. exigua</i> / 100 cc de solo	Exi-11-270	+	17,62	0,035
População <i>M. exigua</i> / 100 cc de solo	Exi-3-130pb	+	17,64	0,035
População <i>M. exigua</i> / 100 cc de solo	Exi-13-200pb	+	19,65	0,026
Número de galhas	Exi-5- 500pb	-	28,95	0,008
Número de galhas	Exi-13-200pb	+	25,17	0,012
Número de galhas	Exi-2-130pb	-	18,1	0,032
Número de galhas	Exi-13-150pb	-	15,7	0,045
Número de galhas	Exi-13-400pb	+	15,7	0,045

R²: coeficiente de determinação

pb: pares de bases

Dentre os 11 marcadores AFLP utilizados neste estudo, os de código Exi-3 (130 pares de bases), Exi-5 (500 pares de bases), e Exi-13 (200 pares de bases) foram os mais associados à resistência à *M. exigua* na população e nas condições estudadas. Diniz et al. (2005) verificaram em cultivares de Icatu que os marcadores Exi-3, Exi- 11 e Exi-13 também confirmaram a presença do fragmento introgridido associado à resistência à *M. exigua*. De acordo com

Ramalho et al. (2012), os marcadores moleculares localizados mais próximos do gene de interesse devem ser preferidos, sendo menor a possibilidade de falsos positivos, ou seja, plantas com o marcador e sem o alelo de interesse.

A maior importância neste estudo são os marcadores que apresentam efeito negativo, visto que demonstram que a presença do gene introgridido de *C. canephora* esta associado à resistência das progênies (NOIR et al., 2003). Entre esses, merece destaque o marcador molecular Exi-5 com o alelo de aproximadamente 500 pares de bases que apresentou associação negativa com todas as características avaliadas referentes ao nematoide e ainda coeficiente de determinação de 33,3% para população de *M. exigua* por grama de raiz, ou seja, o marcador Exi-5 explicou 33,3% do total da variância fenotípica para essa característica. Por meio da mesma metodologia, Nemli et al. (2014) apresentaram consistentes marcadores moleculares associados a cinco características agronômicas do feijoeiro. O marcador Exi-5 pode ainda ser convertido a marcador SCAR, que é um marcador mais específico e reprodutível, facilitando estudos posteriores.

A presença do gene *Mex-1* esteve associada à baixa população do nematoide nas progênies estudadas (Figura 6). Nesse contexto, observou-se que as cultivares Catuaí (24 e 25), pertencentes à *C. arabica* e usualmente utilizadas como padrão de suscetibilidade ao nematoide, não apresentaram introgressão do gene *Mex-1* assim como demonstraram alto fator de reprodução. Esses resultados estão de acordo com Diniz et al. (2005) e Noir et al. (2003) que demonstraram que o gene de resistência à *M. exigua* é oriundo de *C. canephora*, validando este estudo. No entanto, entre as cultivares de Icatu (29 e 30), oriundas do cruzamento entre *C. canephora* e Bourbon vermelho, umas delas, Icatu Precoce IAC 3282 apresentou a introgressão do gene e a outra, Icatu Vermelho IAC 2942, ausência do mesmo. Resultados semelhantes foram

verificados por Diniz et al. (2005) que estudando a introgressão do gene *Mex-1* em 21 cultivares de Icatu, demonstraram que nove cultivares apresentam a introgressão do gene. A associação entre o gene *Mex-1* e a menor população de *M. exigua* por grama de raiz foi evidenciada na cultivar Icatu Precoce quando comparada a Icatu Vermelho, que não apresentou a introgressão.

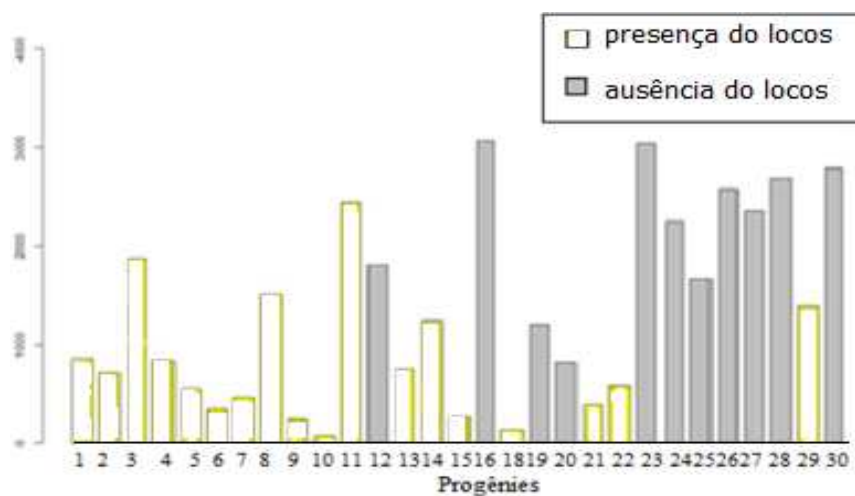


Figura 6 População média de *M. exigua* por grama de raiz nas progênies estudadas e presença (amarelo) ou ausência (cinza) do locus *Mex-1* utilizando o marcador *Exi-5*

Enfim esses resultados são de grande importância para o melhoramento genético do cafeeiro, visto que pesquisas como essas são escassas na literatura e a presença de marcadores AFLP bem definidos associados às características de difícil mensuração, como a resistência aos nematoides e em culturas perenes como o cafeeiro, proporcionam grandes ganhos em menor intervalo de tempo. Por fim, este estudo apresenta uma metodologia relativamente rápida e eficiente que permitirá selecionar progênies ainda na fase de mudas, pois possivelmente não apresentam o gene introgridido de *C. canephora* e a resistência à *M. exigua*.

4 CONCLUSÕES

Verificou-se diversidade genética nas progênies de cafeeiro e eficiência em detectar marcadores moleculares associados à reação à *M. exigua* por meio do mapeamento associativo.

Alguns marcadores moleculares se associaram à reação ao nematoide nas progênies, com destaque para o marcador Exi-5 (500 pares de bases) que se associou as três características avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ALPIZAR, E.; H. ETIENE.; BERTRAND, B. Intermediate resistance to *Meloidogyne exigua* root-knot nematode in *Coffea arabica*. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, p. 903-910, 2007.
- ANTHONY, F. et al. Detection by simple sequence repeat markers of introgression from *Coffea canephora* in *Coffea arabica* varieties. **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, n. 6, p. 542-544, Dec. 2002.
- BARBOSA, D. H. S. G. et al. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 28, p. 49-54, 2004.
- BARBOSA, D. H. S. G.; SOUZA, R. M.; VIEIRA, H. D. Field assessment of coffee (*Coffea arabica* L.) cultivars in *Meloidogyne exigua*-infested or -free fields in Rio de Janeiro State, Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 175-177, 2010.
- BOLKER, B.M. et al. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 24, p. 127-135, 2008.
- BRADBURY, P. J. et al. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 19, p. 2633-2635, 2007.
- CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: M. LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2nd ed. Egham: CABI Bioscience, 2005. p. 529-580.
- CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C.; FAZUOLI, L. C. Melhoramento do café XL: estudos de progênies e híbridos de café Catuaí. **Bragantia**, Campinas, v. 38, n. 22, p. 202-216, 1979.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, Atenas, v. 19, n. 4, p. 299-306, Aug. 2001.

CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 35, p. 271- 279, 2013.

DINIZ, L. E. C. et al. Analysis of AFLP markers associated to the *Mex-1* resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 5, p. 387-393, 2005.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, Cham, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

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

FERRAZ, L. C. B. F. World reports of *Meloidogyne*: Brazil. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant parasitic nematodes of Coffee**. New York: APS, 2008. p. 225-248.

GOWER, J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, London, v. 53, p. 325-338, 1966.

GUIMARÃES, P. T. G. et al. Cafeeiro. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999. p. 289-302.

HUBISZ, M. J. et al. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 9, p. 1322–1332, 2009.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 48, n. 90, p. 692, 1964.

LASHERMES, P. et al. Analysis of alien introgression in coffee tree (*Coffea arabica* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 27, p. 223- 232, 2011.

LOPES, M. S. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biociência**, Uberlândia, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

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

MARAS, M. et al. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta agriculturae Slovenica**, Berlin, v. 91, p. 87-96, 2008.

MERCER, J. R. **Estrutura genética de uma população selecionada de *Pinus taeda* Linnaeus**. 2011. 92 p. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease- resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

NEMLI, S. et al. Association mapping for five agronomic traits in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 94, n. 15, p. 3141-3151, 2014.

NOIR, S. et al. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 97-103, Feb. 2003.

NUNES, C. F. et al. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1383-1389, Aug. 2011.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 288–295, 2006.

PEARL, H. M. et al. Construction of a genetic map for arabica coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 829-835, 2004.

PRITCHARD, J.; STEPHENS, M.; DONNELL, Y. P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, p. 945-959, 2000.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: UFLA, 2012. 522 p.

SALGADO, S. M. L.; REZENDE, J. C. Manejo de fitonematoide em cafeeiro. In: REIS, P.R.; CUNHA, R. L. **Café arábica: do plantio a colheita**. Lavras: Epamig, 2010. v. 1, p. 757-804.

SETOTAW, T. A. et al. Breeding potential and genetic diversity of “Híbrido do Timor” coffee evaluated by molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 10, n. 4, p. 298- 304, Dec. 2010.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman and Co, 1973.

SOUZA, F. F. et al. Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 13, n. 4, p. 273-276, 2013.

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

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

YU, J. et al. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nature Genetics**, New York, v. 38, p. 203–208, 2006.

ZHAO, J. et al. Association mapping of leaf traits, flowering time, and phytate content in *Brassica rapa*. **Genome**, Ottawa, v. 50, p. 963–973, 2007.