

## ESTUDO COMPARATIVO DO NÍVEL DE POLIMORFISMO E INFORMATIVIDADE ACESSADO PELOS MARCADORES RAPD, AFLP E SSR, NO ESTABELECIMENTO DE RELAÇÕES GENÉTICAS EM *Coffea canephora*.

Luis Felipe V. Ferrão<sup>1</sup>, Flávio de F. Souza<sup>2</sup>, Eveline T. Caixeta<sup>3</sup>, Eunize M. Zambolim<sup>4</sup>, Laércio Zambolim<sup>5</sup>, Ney S. Sakiyama<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas, UFV, Viçosa-MG, felipeventorim@hotmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador, M.Sc., Embrapa Rondônia, Porto Velho-RO/Doutorando em Genética e Melhoramento, UFV, Viçosa-MG, flaviofs@cpafro.embrapa.br

<sup>3</sup>Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café, Brasília-DF, eveline@embrapa.br, autora para correspondência

<sup>4</sup>Pesquisadora, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, eunize@ufv.br.

<sup>5</sup>Professor, D.Sc., UFV, Viçosa-MG, zambolim@ufv.br

<sup>6</sup>Professor, D.Sc., UFV, Viçosa-MG, sakiyama@ufv.br.

**RESUMO:** Em um programa de melhoramento, o estudo da diversidade genética em bancos de germoplasma (BAGs) é de primordial importância, principalmente no início, na definição de estratégias de ações. Com o advento dos marcadores baseados em DNA e da percepção das suas vantagens, tornou-se crucial o uso dessa técnica na complementação do acesso a diversidade genética, de forma a suplementar e refinar as classificações com base em marcadores morfológicos. Dessa forma, esse trabalho objetivou comparar o poder discriminatório e a eficiência dos marcadores moleculares RAPD, AFLP e SSR na estimativa das similaridades genéticas de 94 subamostras de *Coffea canephora*, mantidas no programa de melhoramento genético da Embrapa Rondônia. Para isso, os parâmetros níveis de polimorfismos e informatividade dos marcadores foram considerados. Nessas análises foi possível observar que o nível de polimorfismo para os três marcadores foi alto, quando comparado com o polimorfismo em *Coffea arabica* outra importante espécie do gênero *Coffea*. Além disso, os marcadores SSRs destacaram-se pelo alto teor informacional, enquanto que os AFLPs foram eficientes na detecção de grandes quantidades de polimorfismo com o uso de poucos *primers*. Com isso, nossos resultados demonstraram que para estudos de diversidade todos os três marcadores são eficientes, no entanto, a escolha de uma metodologia em detrimento de outra deve ser feita com cuidado, levando em consideração o objetivo de cada trabalho, assim como, os recursos disponíveis.

**Palavras-Chave:** Diversidade genética, marcadores moleculares, DNA, melhoramento genético.

## COMPARATIVE STUDY OF THE LEVEL OF POLYMORPHISM AND INFORMATIVENESS ACCESSED BY RAPD, AFLP AND SSR MARKERS IN THE ESTABLISHMENT OF GENETIC RELATIONSHIPS IN *Coffea canephora*.

**ABSTRACT:** In breeding program, the study of genetic diversity in bank of germplasm is very important, especially in the initiation, when define strategic of actions. The advent of DNA-based markers and perception of its advantages, has become crucial to use this technique to complement access to genetic diversity in order to supplement and refine the classifications based on morphological markers. Thus, this study compares the discriminatory power and efficiency of RAPD, AFLP and SSR in the estimation of genetic similarities of 94 subsamples of *Coffea canephora*, kept in the breeding program of Embrapa Rondonia. For this, the parameters levels of polymorphism and informativeness of the markers were considered. In these analysis we observed that the level of polymorphism for the three markers is higher than in *Coffea arabica*, another important species of the genus *Coffea*. Moreover, SSRs markers were highlighted by the high informational content, while AFLPs were effective in detecting large amounts of polymorphism using few primers. Thus, our results demonstrated that for diversity studies, all three markers are efficient, however, the choice of one methodology over another must be done carefully, taking into account the objective of each work, as well as the resources available.

**Key Words:** genetic diversity, molecular markers, DNA, breeding program

### INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, que contém aproximadamente 500 gêneros e mais de seis mil espécies. Dentre todos estes gêneros, particular atenção tem sido dada ao gênero *Coffea*, ao qual inclui duas espécies cultivadas de grande importância econômica: *Coffea arabica* L. ( $2n = 4x = 44$ ) e *C. canephora* Pierre ex Froehner ( $2n = 2x = 22$ ). Nos últimos anos, a produção mundial de *C. canephora* foi de aproximadamente 46 milhões de sacas, que corresponde a 35 a 40 % de todo o café colhido no mundo. Com produção anual de 10,6 milhões de sacas (CONAB,

2010), o Brasil destaca-se como o segundo maior produtor, permitindo que o agronegócio da cultura atue de forma importante na geração de empregos, tributos e formação de receita cambial, desempenhando assim, papel fundamental no desenvolvimento social e econômico do país (Ferrão *et al.*, 2007).

Muitos dos avanços observados na cultura devem-se a ciência do melhoramento genético que tem participado nesse processo objetivando atender às exigências do consumidor, garantir a sustentabilidade do ambiente e garantir maior retorno socioeconômico para a cafeicultura e para a sociedade como um todo. No entanto, o sucesso desses programas depende, primeiramente, da existência de variabilidade genética na população de base. Para isso, os bancos de germoplasma apresentam papel de destaque já que visam à manutenção dos recursos genéticos e a disponibilização dessa variabilidade para os melhoristas.

O banco ativo de germoplasma (BAG) de cafeeiro da Embrapa Rondônia merece destaque, uma vez que apresenta a particularidade de conter, além do germoplasma coletado no próprio Estado, expressivo número de subamostras resultantes de intercâmbios com outras instituições, compondo desse modo, uma variabilidade importante e representativa do germoplasma cultivado e conservado no Brasil (Souza *et al.*, 2003). Todavia, um ponto a ser considerado no cafeeiro é a demora para que uma característica de interesse possa ser expressa, uma vez que, trata-se de uma cultura perene com longo período juvenil (Ferrão *et al.*, 2009). É, portanto, de fundamental importância o uso de técnicas que acelerem o acesso a variabilidade do germoplasma. Nesse sentido, a introdução de técnicas moleculares tem permitido avaliações mais rápidas, fáceis e exatas da variação genética, proporcionando maior precisão nas mensurações da divergência genética e oferecendo grande contribuição nos programas de melhoramento (Russell *et al.* 1997).

Nos últimos anos, o número de ensaios moleculares disponíveis aumentou significativamente, com cada método diferindo em princípios, aplicações, tipo e número de polimorfismos detectados, e custo/tempo requeridos. Para estudos de diversidade no gênero *Coffea*, diferentes marcadores tem sido utilizados, com destaques para o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*). Porém, a decisão da técnica mais apropriada para um determinado tipo de estudo, não é uma tarefa óbvia. Sendo assim, o melhor entendimento da eficiência dessas metodologias é considerado primordial nos estudos de caracterização e classificação de germoplasmas, sendo um pré-requisito de grande valia em programas de melhoramento genético de plantas. Estudos comparativos das diferentes técnicas moleculares, objetivando mensurar a variabilidade genética, já foram realizados em diversas espécies, no entanto, não há relatos de estudos comparativos desse tipo com a espécie *C. canephora*, o que é necessário, visto a importância dessas informações em estudos de diversidade.

Dessa forma, propõe-se nesse trabalho comparar o poder discriminatório e a eficiência dos marcadores moleculares RAPD, AFLP e SSR na estimativa das similaridades genéticas de 94 subamostras de *C. canephora*, oriundos de diferentes instituições de pesquisa do Brasil, mantidos no programa de melhoramento genético da Embrapa Rondônia, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material Vegetal*

Para avaliação da diversidade e da capacidade discriminante dos marcadores moleculares, foram utilizadas 94 subamostras de *C. canephora* oriundas de diferentes instituições de pesquisa do Brasil, e atualmente mantidos na Coleção de Germoplasma de Café da Embrapa Rondônia, em Ouro Preto do Oeste-RO. Estes genótipos representam tanto o germoplasma cultivado, quanto os utilizados nos programas de melhoramento no Brasil. Estes foram introduzidos na Embrapa Rondônia durante as três últimas décadas, por meio de sementes ou enxertos dos bancos de germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), São Paulo; e do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Espírito Santo. Além dessas subamostras, foram incluídas na avaliação algumas outras coletadas em áreas tradicionais de produção de café no Estado de Rondônia (Souza *et al.*, 2003). Segundo avaliações fenotípicas realizadas anteriormente, as subamostras provenientes do IAC foram alocadas no grupo varietal Robusta, enquanto que os materiais do Incaper no grupo varietal Conilon. Já as subamostras provenientes de coletas no Estado de Rondônia, são de grupo varietal incerto, uma vez que as mesmas não foram fenotipadas.

Para as análises moleculares folhas jovens e completamente desenvolvidas de cada cafeeiro foram coletadas, congeladas a -80 °C, liofilizadas, trituradas e conservadas a -20 °C. O DNA genômico foi extraído conforme protocolo descrito por Diniz *et al.* (2005).

### *Análises Moleculares*

#### RAPD

Para genotipagem do material, 17 *primers* dos Kits da Operon Technology® (OPA-10; OPC-07; OPC-10; OPI-20; OPN-05; OPN-07; OPN-09; OPR-01; OPX-05; OPX-11; OPAB-04; OPAL-08; OPAM-07; OPAN-19; OPAQ-03; OPAS-09; OPAU-02) foram utilizados. A reação de amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Ferrão *et al.* (2009).

#### AFLP

As análises dos marcadores AFLP foram realizadas de acordo com a metodologia utilizada por Brito *et al.* (2007). Quatro combinações de *primers* foram escolhidas (E-CTC / M-AGC; E-CTC / M-AGT; E-CAT / M-AGT e E-CGC / M-ATA).

#### SSR

Para genotipagem do material foram utilizados 19 *primers* de microssatélite (SSRs). A reação de amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Missio *et al.* (2009).

#### Análise dos dados

Marcadores RAPD e AFLP foram codificados como matrizes de dados binários (presença/ausência de bandas: 1 ou 0). Os marcadores SSRs foram classificados como co-dominantes de acordo com o tamanho molecular de cada alelo. O estudo comparativo da eficiência dos três marcadores moleculares (RAPD, SSR e AFLP) foi realizado comparando os níveis de polimorfismos e informatividade de cada técnica, através do cálculo dos seguintes parâmetros:

- 1) Número de ensaios ou *primers* (U);
- 2) Número de bandas polimórficas ( $N_p$ );
- 3) Número de bandas não polimórficas ( $N_{np}$ );
- 4) Número médio de bandas polimórficas por ensaio ( $N_p/U$ );
- 5) Número de locos (L): no caso de RAPD e AFLP, o número máximo de locos é igual ao número total de bandas ( $N_b$ ) obtido para cada tipo de marcador. Em SSR esse valor corresponde ao número de unidades de ensaio (*primers*), uma vez que esse tipo de marcador faz uso de *primers* que amplificam sequências específicas do genoma;
- 6) Número de locos por unidade de ensaio ( $n_u = L/U$ );
- 7) Número médio de alelos por locos ( $N_{av}$ ). Para SSRs a média de alelos por locos foi calculada de acordo com a fórmula:  $N_{av} = N_p/L$ . Para RAPDs e AFLPs foram considerados dois alelos por ensaio ( $N_{av}=2$ );
- 8) Expectativa de heterozigosidade ( $H_e$ ): calculado de acordo com a fórmula:  $H_e = 1 - \sum p_i^2$ , onde  $p_i$  é a frequência alélica para *inésimo* alelo;
- 9) Expectativa média de heterozigosidade por loco polimórfico ( $H_{ep}$ ): calculado por meio da fórmula:  $H_{ep} = 1 - \sum p_i^2 / \beta$ ;
- 10) Fração de loco polimórfico ( $\beta$ ): calculado de acordo com Powell *et al.* (1996),  $\beta = N_p / N_p + N_{np}$ ;
- 11) Número de alelos efetivos por loco ( $n_e$ ) de acordo com Morgante *et al.* (1994):  $n_e = [1 / \sum p_i^2] / N_p$ , onde  $p$  é a frequência alélica para *inésimo* alelo;
- 12) Número total de alelos efetivos ( $N_e$ ) definido por Pejic *et al.* (1998) como:  $N_e = \sum n_e$ ;
- 13) Índice de eficiência do ensaio ( $A_i$ ) calculado de acordo com Pejic *et al.* (1998):  $A_i = N_e / U$ ;
- 14) O número de marcadores polimórficos simultaneamente analisados em um único gel, foi definido por Powell *et al.* (1996) como Efeito da Relação Multiplex (E) e calculado de acordo com a fórmula:  $E = n_u \beta$ ;
- 15) Eficiência na detecção de polimorfismo, chamado de índice de marca (MI) e definido por Powell *et al.* (1996) como:  $MI = E.H_{ep}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os três marcadores moleculares utilizados neste estudo foram eficientes na discriminação das 94 subamostras de *C. canephora* analisadas (Tabela 1).

**Tabela 1:** Níveis de polimorfismos e comparação da informatividade dos marcadores RAPD, AFLP e SSR em 94 subamostras de *C. canephora* do BAG da Embrapa Rondônia.

Parâmetros avaliados e abreviações		Marcador Molecular		
		RAPD	AFLP	SSR
Número de unidades de ensaio ( <i>primers</i> )	U	17	4	19
Número de bandas polimórficas	$N_p$	65	93	92
Número de bandas não polimórficas	$N_{np}$	17	24	0
Número médio de polimorfismo/ensaio	$N_p/U$	3,82	23,25	4,84
Número de locos	L	82	117	19
Número de locos/ensaio	$N_u$	4,82	29,25	1,00
Número médio de alelos por locos	$N_{av}$	2,00	2,00	4,84
Heterozigosidade esperada	$H_e$	0,28	0,25	0,52
Heterozigosidade esperada por loco polimórfico	$H_{ep}$	0,36	0,31	0,52
Número de alelos efetivos por loco	$n_e$	1,76	1,66	2,08
Número total de alelos efetivos	$N_e$	114,66	154,96	39,70
Fração de loco polimórfico	$\beta$	0,79	0,79	1,00
Índice de eficiência do ensaio	$A_i$	6,74	38,74	2,08

Eficiência da relação multiplex	E	3,8	23,10	1,00
Índice de marca	MI	1,37	7,16	0,52

No presente trabalho foi possível observar que o nível de polimorfismo para os três marcadores foi alto, quando comparado com o polimorfismo em *Coffea arabica* (Maluf *et al.*, 2005), outra importante espécie do gênero *Coffea*. No entanto, essas diferenças podem ser explicadas com base na origem e na forma de reprodução das espécies em questão.

Endêmica de terras de altitude do sudoeste da Etiópia, mas também com registros de ocorrência no Sudão e Quênia, o início do cultivo do café arábica deu-se no Iêmen há cerca de quinhentos anos, sendo que, no início do século 18, progênies de uma única planta foram levadas da Indonésia para a Europa e depois para o continente Americano, constituindo-se na base genética das principais cultivares plantadas tanto no Brasil, como em outros países. O resultado disso, somado ao modo de reprodução (autógama), é uma base genética estreita que reflete diretamente no baixo nível de polimorfismo. Por outro lado, a espécie *C. canephora* é endêmica das regiões ocidental, centro-tropical e subtropical do continente Africano, compreendendo grandes áreas da República do Guiné, Costa do Marfim, Sudão, Uganda entre outros países. Quanto ao cultivo, registros históricos mostram que se iniciou no Congo, em 1870, estendendo-se para região central da África e, posteriormente, por intermédio de intercâmbios, para Indonésia, Java e continente Americano. O resultado disso, somado a polinização cruzada (alogamia), é a formação de populações com grande variabilidade, com indivíduos altamente heterozigotos e, conseqüentemente, com alta taxa de polimorfismo (Ferrão *et al.*, 2007).

Diferentes estudos têm mostrado que os marcadores SSR detectam níveis de polimorfismos superiores, quando comparados com outros marcadores moleculares (Powell *et al.*, 1996; Russel *et al.*, 1997; Pejic *et al.*, 1998). Segundo esses autores, isso se deve a forma de geração de polimorfismo (*replication slippage*) e a natureza co-dominante do marcador, que permite a avaliação de grande número de alelos contribuindo com elevados níveis de polimorfismo. No entanto, esses resultados podem variar de espécie para espécie (Belaj *et al.*, 2003). Em batata (McGregor *et al.*, 2000) e em inhame (Mignouna *et al.*, 2003), por exemplo, os resultados obtidos com AFLP foram considerados melhores do que com os SSRs e RAPDs, sugerindo que a escolha da metodologia depende do *background* genético da espécie em questão (McGregor *et al.*, 2000).

Neste trabalho, observou-se que para a espécie *C. canephora* os marcadores AFLPs destacaram-se na detecção de polimorfismos com o uso de poucos ensaios (*primers*), o que resultou em elevados valores de índice de eficiência de ensaio (Ai), número de locos por unidade de ensaio (Nu), eficiência da relação multiplex (E) e índice de marca (MI). Por outro lado, os marcadores SSRs, destacaram-se pelos elevados valores de número médio de alelos por locos (Nav) e heterozigosidade (He).

Segundo Powell *et al.* (1996), a eficiência de um marcador é dado pelo balanço entre o nível de polimorfismo detectado (conteúdo informacional) e a quantidade de polimorfismo detectado por unidade de ensaio (*primers*). Esses dois parâmetros são representados, respectivamente, na forma de heterozigosidade (He) e de eficiência da relação multiplex (E), sendo que, o produto desses parâmetros fornece uma medida global de eficiência do marcador, denominado índice de marca (MI).

Para o marcador SSR, apesar do alto valor de heterozigosidade (He = 0,52), observou-se um baixo valor de índice de marca (MI = 0,52). Por outro lado, o marcador AFLP apresentou o menor valor de heterozigosidade (0,25) e o maior de índice de marca (7,16). Segundo Belaj *et al.* (2003), essa discrepância entre valores de índice de marca, observada para os dois marcadores, é causado pela grande influência do número de bandas no cálculo do valor final de MI. Marcadores de amostragem ampla e simultânea do genoma, como é o caso dos AFLPs, tendem a apresentar maiores valores de índice de marca do que marcadores loco-específico como os SSRs (Baraket *et al.* 2010).

No entanto, Pejic *et al.* (1998) e Gallego *et al.* (2004) citaram que a interpretação desses dados apontam para a maior informatividade dos SSRs, principalmente pelos altos valores de He e Nav. Enquanto que os AFLPs, por apresentarem os maiores valores de MI, Ai e E, são mais eficientes na detecção de grandes quantidades de polimorfismo com o uso de poucos ensaios. Já as análises dos RAPDs, mostraram que esses marcadores situam-se em posição intermediária para a maioria dos parâmetros avaliados, não sendo nem tão informativo como os SSRs e nem tão eficientes na detecção de polimorfismos como os AFLPs. Resultados semelhantes foram encontrados em cevada (Russel *et al.*, 1997), milho (Pejic *et al.*, 1998), oliva (Belaj *et al.*, 2003), damasco (Lamia *et al.*, 2010) e figueira (Baraket *et al.* 2010).

## CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que todos os três marcadores, apesar das vantagens e desvantagens, são eficientes para estudos genéticos em *C. canephora*. No entanto, a escolha de uma técnica em detrimento de outra deve ser feita com precaução, levando em consideração o propósito da pesquisa, a estrutura genética dos genótipos e os recursos disponíveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARAKET, G.; CHATTI, K.; SADDOD, O.; ABDELKARIM, A. B.; MARS, M.; TRIFI, M.; HANNACHI, A. S.; Comparative Assessment of SSR and AFLP Markers for Evaluation of Genetic Diversity and Conservation of Fig, *Ficus carica* L., Genetic Resources in Tunisia. **Plant Mol Biol Rep.** 2010.
- BELAJ, A.; SATOVIC, Z.; CIPRIANI, G.; BALDONI, L.; TESTOLIN, R.; RALLO, L.; TRUJILLO, I. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. **Theor Appl Genet.**, v.107, p.736–744, 2003.
- CONAB. **Cafés do Brasil: safra 2009/2010.** Brasília: MAPA/CONAB, dez. 2010.
- BRITO, G. G. **Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG: 2007.
- DINIZ, L. E. C.; SAKIYAMA, N. S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; ZAMBOLIM, E. M.; LOUREIRO, M. E.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Analysis of AFLP markers to the Mex-1 resistance locos in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 5: 387-393, 2005.
- FERRÃO, R. G.; FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A.; PACOVA, B. E. V.; Melhoramento genético de *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. (eds) **Café Conilon.** Vitória, ES: Incaper, p.123-173, 2007.
- FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; BARBOSA, W. M.; SOUZA, E. M. R. Genetic divergence in Conilon coffee revealed by RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology.** Londrina PR: v.9, p.63-74, 2009.
- MORGANTE M, RAFALSKI A, BIDDLE P, TINGEY S, OLIVIERI AM. Genetic mapping and variability of seven soybean sample sequence repeat loci. **Genome** 37:763–769, 1994.
- GALLEGO, F. G.; PÉREZ, M. A.; NÚNEZ, Y.; HIDALGO, P.; Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology** 22 (561–568).2005.
- LAMIA, K.; HEDIA, B.; JEAN-MARC, A.; NEILA, T.; Comparative analysis of genetic diversity in Tunisian apricot germplasm using AFLP and SSR markers. **Sci. Horti.**, doi:10.1016/j.scienta.2010.09.012, 2010.
- MALUF, M. P.; SILVESTRINI, M.; RUGGIERO, L. M. C.; FILHO, O. G.; COLOMBO, C. A. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. **Sci. Agric.**, v.62, p.366-373, 2005.
- MCGREGOR, C. E.; LAMBERT, C. A.; GREYLING, M. M.; LOUW, J. H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, 113: 135–144, 2000.
- MIGNOUNA, H. D.; ABANG, M. M.; FAGBEMI, S. A.; A comparative assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and SSR) for white yam (*Dioscorea rotundata*) germplasm characterisation. **Ann. appl. Biol.**, 142:269-276, 2003.
- MISSIO, R. F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; GUILHERME FERREIRA PENA, G. F.; RIBEIRO, A. P.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N. S. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. **Bragantia**, Campinas, SP: v.68, n.3, p.573-581, 2009.
- PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. **Theor Appl Genet.**, v.97, p.1248–1255, 1998.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Mol Breed.**, v.2, p.225-38, 1996.
- RUSSELL, J. R.; FULLER, J. D.; MACAULAY, M.; HATZ, B. G.; JAHOR, A.; POWELL, W.; WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theor Appl Genet.**, v.95, p.714–722, 1997.

SOUZA, F. F.; VENEZIANO, W.; SANTOS, M. M. Manejo de germoplasma de café em Rondônia. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2003, Porto Seguro. **Resumos**. Brasília: Embrapa, 2003.