

ALEXANDRE SANDRI CAPUCHO

HERANÇA E MAPEAMENTO DE QTLs DA RESISTÊNCIA DO
HÍBRIDO DE TIMOR À FERRUGEM DO CAFEEIRO

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C255h
2008

Capucho, Alexandre Sandri, 1981-
Herança e mapeamento de QTLs da resistência do
Híbrido de Timor à ferrugem do cafeeiro / Alexandre
Sandri Capucho. – Viçosa, MG, 2008.
x, 62f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Laércio Zambolim.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Café - Resistência à *Hemileia vastatrix*. 2. Marcadores
genéticos. 3. Mapeamento cromossômico. 4. Café -
Resistência a doenças e pragas. 5. *Hemileia vastatrix*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.7394

ALEXANDRE SANDRI CAPUCHO

HERANÇA E MAPEAMENTO DE QTLs DA RESISTÊNCIA DO
HÍBRIDO DE TIMOR À FERRUGEM DO CAFEEIRO

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2008.

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta
(Co-orientador)

Pesq. Eunize Maciel Zambolim
(Co-orientador)

Pesq. Antônio Alves Pereira

Prof. Ney Sussumu Sakiyama

Prof. Laércio Zambolim
(Orientador)

... nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém... ...quem acredita sempre alcança.

Aos meus pais, Osmar e Adelaide

Ao meu querido irmão, Andrey

Aos meus amigos, familiares, e a

Eunize, que sempre acreditaram em mim, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por ter colocado tantas pessoas boas na caminhada de minha vida.

A meus pais Osmar e Adelaide e meu irmão Andrey, sem os quais eu não teria chegado a lugar algum.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade em realizar este curso.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro do projeto.

À meu orientador Prof. Dr. Laércio Zambolim, pelo apoio, confiança e pelas lições que contribuíram para meu desenvolvimento.

À minha co-orientadora Dr. Eunize Maciel Zambolim, pelos valiosos ensinamentos, desde minha graduação, foram 6 anos de trabalho juntos, sem a qual eu não poderia ter alcançado as conquistas que obtive.

À pesquisadora da EMBRAPA e minha co-orientadora Dr. Eveline Teixeira Caixeta, pelo apoio, aconselhamentos, orientação e colaboração durante a realização dos trabalhos de laboratório e análises estatísticas.

Ao pesquisador da EPAMIG Dr. Antonio Alves Pereira, pela amizade e sugestões.

Ao Professor Dr. Ney Sussumu Sakiyama, pela confiança, sugestões e aconselhamentos.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos de curso e do laboratório, pelo convívio agradável. Em especial a Marcelo, Roberto, Geraldo, Maria Santana, Hyana, Everton, Robson Missio, Telma, Guilherme, Alessandra, Raphael, Ana, Andréa, Pedro Henrique, Valdir, Alini, Bárbara, Flávia, Marcelo Tomaz, Kátia, Júlio Barbosa, Rejane, Mateus, Samuel, Poliane, Thiago, Patrícia, Bruna, Danival, Antônio, Sérgio Milagres, Daniel, Tesfahun e Robson Almeida.

Ao graduando em agronomia e amigo Everton de Arruda Franchini pela ajuda nos ensaios de campo.

Ao Prof. Cosme Damião Cruz e seus co-orientados Rafael e Tatiana pelas contribuições nas análises estatísticas.

A todos os funcionários do viveiro do café, em especial ao Mário, Geraldo e Sebastião, pelo apoio na condução dos trabalhos de campo e pelos simples, porém, sábios ensinamentos.

A todos os meus companheiros e ex-companheiros de república, pela amizade e pelos momentos de descontração. Em especial para o Luciano, o colombiano Juan, Leonardo, Henrique, Thiago e o Daniel.

A amiga Liliane pelo companheirismo e ajuda nos momentos difíceis.

Aos amigos da seção 12 do Alojamento Velho da UFV, que me ajudaram muito durante a minha graduação, sempre me incentivando e dessa forma contribuindo para minha formação. Em especial ao Fabrício, Emerson, Marcelo, Leonardo, Cristiano e Mábio. Obrigado eterna seção 12.

A meus amigos de minha cidade natal que mesmo em minha ausência sempre estiveram torcendo por mim. Em especial para Alexandre, Bira, Oscar e Tinha.

A meus Tios, Tias e primos que sempre colaboraram, torceram e se orgulharam das minhas conquistas, mesmo sem saber o significado delas.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

ALEXANDRE SANDRI CAPUCHO, filho de Osmar Capucho e Adelaide Sandri Capucho, nasceu em Linhares, Espírito Santo, em 19 de setembro de 1981.

Em fevereiro de 2000 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 05 de maio de 2006.

No período de 2004 a 2006 foi bolsista de iniciação científica no Departamento de Fitopatologia da UFV, onde desenvolveu atividades de pesquisa em epidemiologia/control e marcadores moleculares.

Em 15 de maio de 2006 iniciou no Programa de Pós-graduação, em nível de Mestrado, em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 19 de fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
1-O CAFEIEIRO	1
2-A FERRUGEM DO CAFEIEIRO	2
3-GENES E FONTES DE RESISTÊNCIA A <i>Hemileia vastatrix</i>	4
4-ESTUDO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DO CAFEIEIRO A FERRUGEM ..	6
5-MARCADORES MOLECULARES E MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A FITOPATÓGENOS	8
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO 1 - HERANÇA DA RESISTÊNCIA DO HÍBRIDO DE TIMOR A <i>H.</i> <i>vastatrix</i>	17
1-INTRODUÇÃO	18
2-MATERIAL E MÉTODOS	19
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO 2 - MAPEAMENTO DE QTLs DO HÍBRIDO DE TIMOR ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA A <i>H. vastatrix</i>	37
1-INTRODUÇÃO	38
2-MATERIAL E MÉTODOS	40
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CONCLUSÕES GERAIS	62

RESUMO

CAPUCHO, Alexandre Sandri, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Herança e mapeamento de QTLs da resistência do Híbrido de Timor à ferrugem do cafeeiro.** Orientador: Laércio Zambolim. Co-Orientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Eunize Maciel Zambolim.

Este trabalho teve como objetivos estudar a herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 a *Hemileia vastatrix* e identificar QTLs associados à resistência à ferrugem do cafeeiro. Para o estudo da herança, foram utilizadas 246 plantas da população F₂, originadas da autofecundação controlada do F₁ H 511-1, 115 plantas do retrocruzamento suscetível (RC_S) e 87 do retrocruzamento resistente (RC_R), derivados de cruzamentos do F₁ com o genótipo Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) e o Híbrido de Timor UFV 443-3, respectivamente. Essas plantas foram inoculadas com a raça II de *H. vastatrix* e um isolado coletado de *Coffea arabica* 'Oeiras', de raça desconhecida, denominado patótipo 001, ambos isolados de lesões monopustulares. Para os dois patótipos, o Catuaí Amarelo UFV 2148-57 foi suscetível, enquanto que o Híbrido de Timor UFV 443-3, a F₁ e as plantas do RC_R foram resistentes. As plantas F₂, quando inoculadas com a raça II, apresentaram duas segregações significativas pelo teste Qui-quadrado, 15:1 (P=24,92%) e 61:3 (P=87,27%). A herança da resistência foi confirmada pela inoculação das plantas do RC_S que segregaram na proporção de 3:1 (P=17,83%), esperado para os dois genes, enquanto que a segregação 7:1, esperada para três genes, foi rejeitada. Estes dados sugerem que dois genes dominantes e independentes conferem a resistência desse Híbrido de Timor à raça II de *H. vastatrix*. Resultados semelhantes foram obtidos com o patótipo 001, onde foi observada segregação de 15:1 (P=92,13%) na F₂ e de 3:1 (P=78,78%) no RC_S, demonstrando, também, que dois genes dominantes e independentes controlam a resistência do Híbrido de Timor a esse outro patótipo. Para a identificação de QTLs associados à resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 a *H. vastatrix*, 286 marcadores moleculares (282 SSR e 4 RAPD) foram analisados nos parentais. Os marcadores polimórficos (21 SSR e 4 RAPD) foram utilizados para amplificar o DNA das 246 plantas F₂ e construir o mapa genético. Dos 25 marcadores analisados, dois não se ligaram a nenhum dos seis grupos de ligação formados pelos 23 marcadores restantes, que cobriram 277,90 cM do genoma. Três QTLs foram identificados e designados como QTLHv1, QTLHv2 e QTLHv3, que explicaram, respectivamente, 5,94%, 5,52% e 15,92% da variação

fenotípica. Os valores de LOD e distância entre as marcas e respectivos QTLs foram de 3,69 e 14 cM para o *QTLHv1*, 3,18 e 0,5 cM para o *QTLHv2* e 10,33 e 22 cM para o *QTLHv3*. Este é o primeiro relato da utilização de marcadores SSR na identificação de QTLs associados à resistência do cafeeiro a *H. vastatrix*. Esses QTLs poderão ser utilizados na seleção assistida para a introgressão de genes de resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 à ferrugem nos genótipos comerciais.

ABSTRACT

CAPUCHO, Alexandre Sandri, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008.

Inheritance and mapping of QTLs for resistance of Híbrido de Timor to the coffee leaf rust. Adviser: Laércio Zambolim. Co-Advisers: Eveline Teixeira Caixeta and Eunize Maciel Zambolim.

The objectives of this work were to study the resistance inheritance of the Híbrido Timor UFV 443-3 to *Hemileia vastatrix* and identify QTLs associated with resistance to coffee leaf rust. To study the inheritance we used a population of 246 individuals, produced from the controlled self-pollinated F₁ H 511-1, 115 susceptible backcrossing (BC_S) plants, and 87 resistant backcrossing (BC_R) plants, originated from the crossing between F₁ with Catuaí amarelo UFV 2148-57 and Híbrido de Timor UFV 443-3, respectively. These populations were inoculated with the race II, and a non-characterized field isolate, designated pathotype 001, both from a single pustule-isolate of *H. vastatrix*. For both pathotypes, the Catuaí amarelo UFV 2148-57 was susceptible, while the Híbrido de Timor, the F₁, and the BC_R plants were resistant. The F₂ plants inoculated with the race II showed two goodness of fit by the chi-square test, 15:1 (P=24.92%) and 61:3 (P=87.27%). The resistance inheritance was confirmed by the inoculation of BCs plants which segregated in a rate of 3:1 (P=17.83%), expected for the two genes, whereas the hypothesis of segregation 7:1, expected for three genes, was rejected. These results demonstrate that two independent dominant genes are responsible for the resistance of the Híbrido de Timor 443-3 to the race II of *H. vastatrix*. Similar results were observed with the pathotype 001 showing a segregation of 15:1 (P=92.13%) in the F₂, and 3:1 (P=78.78%) in the BCs. These data indicate that two independent dominant genes, also, control the resistance of the Híbrido de Timor to this pathotype. To identify QTLs associated with the resistance of the Híbrido de Timor UFV 443-3 to coffee leaf rust we tested 286 molecular markers (282 SSR and 4 RAPD) in the parental genotypes. Those polymorphic markers (21 SSR and 4 RAPD) were used to screening the 246 F₂ plants and to construct the linkage map. Among the 25 analyzed markers, two did not match to any of the six linkage groups formed by the 23 remaining markers, covering 277.90cM of the genome. Three QTLs were identified, QTLHv1, QTLHv2 and QTLHv3, that explain, 5.94%, 5.52% and 15.92% of the phenotypic variation respectively. The LOD score and the recombination frequency between the marker and respective QTLs were 3.69 and 14cM to the QTLHv1, 3.18 and 0.5cM to

the *QTLHv2*, and 10.33 and 22cM to the *QTLHv3*. This is the first report of SSR markers in the identification of QTLs associated to the coffee tree resistance to *H. vastatrix*. These QTLs could be used in the assisted selection for introgression of genes for resistance from the Híbrido de Timor UFV 443-3 to coffee leaf rust into commercial genotypes.

INTRODUÇÃO GERAL

1-O CAFEIEIRO

Segundo os historiadores, os primeiros povos a fazer uso do café foram os Árabes, em meados do século XV. Todavia, os Holandeses foram os primeiros europeus que o cultivaram na Indonésia, a partir de 1690. Em 1706 foi enviado ao Jardim Botânico de Amsterdã um exemplar desse cafeeiro. Da Holanda, sementes e mudas foram enviadas em 1718 para o Suriname, de onde outras sementes foram levadas em 1722 para a Guiana, e de onde vieram as primeiras sementes e mudas para o Estado do Pará pelas mãos de Francisco de Melo Palheta em 1727 (Carvalho, 1993).

Mudas e sementes do Pará foram enviadas ao Rio de Janeiro, e de um único cafeeiro que sobreviveu foi originado os primeiros cafezais desse Estado, e posteriormente de lavouras dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Carvalho, 1993). Dessa forma, os cafezais brasileiros são resultantes de uma progênie de um só cafeeiro, *Coffea arabica*, Café Arábica, também conhecido por Nacional, Criolo ou Típica. Esse material apresenta uniformidade e variabilidade genética, pelo fato histórico, mas também pela característica autógama da espécie (Carvalho, 1993).

Pesquisas realizadas em Campinas-SP indicaram que os cultivares de *C. arabica* são autocompatíveis, sendo a taxa de fecundação cruzada natural na ordem de 10% (Carvalho & Krug, 1949). Foi verificado ainda que os insetos e o vento são os principais agentes de fecundação cruzada (Carvalho & Monaco, 1962; Carvalho & Krug, 1949).

Análises citológicas revelaram que 11 é o número básico de cromossomos do gênero *Coffea*. Apenas a espécie *C. arabica* é tetraplóide com 44 cromossomos, enquanto cerca de outras 100 espécies são diplóides com 22 cromossomos (Pinto-Maglio, 2006).

As duas espécies de café exploradas comercialmente no Brasil são *C. arabica* (café arábica) e *C. canephora* (café robusta), representando, respectivamente, 70 e 30% da produção nacional (Matiello, 1998). Historicamente, o Brasil ocupa a posição de maior produtor e exportador de café no mercado internacional. Em 2006, a produção brasileira atingiu 42,5 milhões de sacas de café beneficiados, representando cerca de 30% da produção mundial (Conab, 2007).

A espécie cafeeira comercialmente mais importante no mundo é *C. arabica*, sendo o Brasil o seu maior produtor, e Minas Gerais o responsável por

aproximadamente 51% da produção nacional (Conab, 2007). A principal vantagem do cultivo da espécie *C. arabica* é a superioridade, mundialmente conhecida, na qualidade de sua bebida, comparada à de outras espécies de café. Porém, a susceptibilidade dessa espécie a doenças representa uma grande desvantagem. Dentre as doenças que infectam *C. arabica*, a ferrugem do cafeeiro desde a sua constatação no Brasil em 1970, constitui a principal doença da cultura, ocasionando perdas na ordem de 30%, dependendo das condições ambientais (Zambolim *et al.*, 1999; Kushalappa & Eskes, 1989).

2-A FERRUGEM DO CAFEIEIRO

Os principais danos causados pela ferrugem é função da queda precoce das folhas e seca dos ramos que, em consequência, reduz a produção de frutos no ano seguinte. Em todos os relatos sobre os danos causados pela ferrugem, existe correlação negativa entre a intensidade de ataque num ano e a produção do ano seguinte (Zambolim *et al.*, 1999; Matiello, 1998).

A ferrugem do cafeeiro tem como agente causal o fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., pertencente à ordem Uredinales e família Pucciniaceae, um parasita biotrófico exclusivo do gênero *Coffea*. Esse patógeno do grupo das ferrugens produz os estágios de urédia, télia e basídio, mas somente uredosporos dicarióticos são responsáveis pela doença. Não se conhece até o presente a função dos basidiósporos produzidos nos basídios. A ferrugem do cafeeiro foi descrita em 1869 por Berkeley e Broome, próximo ao lago Vitória, no Leste Africano (Silva *et al.*, 2006). O fungo se desenvolve a partir da superfície abaxial foliar do cafeeiro pela germinação de uredosporos na presença de água e temperatura favorável (18-24°C), em 6-8 horas, podendo emitir de um a três tubos germinativos. Na extremidade do tubo germinativo ocorre a formação de um apressório sobre um estômato, dando origem, em seguida, a hifa (*peg*) de penetração, a qual, após atravessar o ostíolo do estômato, diferencia-se em vesícula sub-estomática (Guzzo, 2004). O desenvolvimento subsequente da hifa de infecção na câmara sub-estomática leva à colonização das células subsidiárias e do mesófilo foliar do cafeeiro, com a formação de micélio intercelular e, em seguida, de haustórios (Zambolim *et al.*, 2002). Em cafeeiros susceptíveis, a colonização do mesófilo acaba dando origem aos soros uredospóricos, que esporulam na forma de buquê através dos estômatos (Silva *et al.*, 2006; Rijo & Rodrigues Jr., 1978).

Os sintomas da doença são observados na face inferior das folhas, onde surgem manchas de coloração amarelo-pálida, evoluindo para lesões de coloração amarelo-alaranjada de aspecto pulverulento (uredosporos), característica da doença, podendo coalescer com outras lesões. Na face superior das folhas observam-se manchas cloróticas amarelas, correspondendo aos limites da pústula na face inferior, que, posteriormente, necrosam e causam a queda da folha infectada (Zambolim *et al.*, 1999).

A principal medida de controle da ferrugem é o método químico, preventivamente com fungicidas protetores, sendo os cúpricos os mais efetivos, ou pelo emprego de fungicidas sistêmicos via foliar e/ou solo, formulados em associação com inseticidas sistêmicos ou separadamente. O controle pode também ser realizado por pulverizações com sulfato de cobre associado a micronutrientes (Calda Viçosa).

Apesar da eficiência dos fungicidas no controle da doença, o uso de cultivares resistentes constitui a medida mais importante de controle, por ser efetiva e econômica, além de preservar o ambiente (Zambolim *et al.*, 1999). Porém, o contínuo surgimento de raças fisiológicas do patógeno tem suplantado a resistência de alguns cultivares antes considerados resistentes, e a durabilidade da resistência das cultivares atuais é difícil de ser prevista (Várzea *et al.*, 2002). Este autor relata que alguns anos após a introdução e o cultivo em larga escala, na Índia, um cultivar da população Catimor ('Caturra' x "Híbrido de Timor CIFC 832/1"), começou a mostrar suscetibilidade à ferrugem. Estudos posteriores revelaram tratar-se de novas raças com capacidade para infectar toda a população de Catimor existente no CIFC-Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal.

A obtenção de cultivares de cafeeiros com resistência durável à ferrugem tem sido dificultada pela grande variabilidade genética das populações de *H. vastatrix*, característica muito comum à maioria dos patógenos biotróficos, especialmente os causadores de ferrugens (Várzea & Marques, 2005). Os primeiros estudos sobre a especialização fisiológica deste fungo foram realizados por Mayne na Índia (1942, 1939, 1936, 1935, 1932), quando foram identificadas quatro raças fisiológicas do patógeno, denominadas de *strains* 1, 2, 3 e 4. Posteriormente, após a criação do CIFC, foram identificadas, em 1955, 32 raças fisiológicas de *H. vastatrix*, de amostras coletadas de vários países (Várzea *et al.*, 2002; 2001). Devido à alta variabilidade, atualmente, esse número passou para 45 raças de *H. vastatrix* (Várzea & Marques, 2005). É possível que este número ainda seja maior que 45 raças, se considerarem que a prospecção de variabilidade não é realizada na maioria dos países produtores de café.

No Brasil, em todas as populações coletadas a partir de uredosporos nas diferentes regiões cafeeiras, enviadas para o CIFC em 1971, foi diferenciada, a princípio, apenas a raça II. A predominância da raça II foi atribuída à homogeneidade genética apresentada pelas cultivares comerciais de café arábica e a ampla distribuição e susceptibilidade dessas cultivares a esta raça (Zambolim *et al.*, 2005). Entretanto, em 1975 foram identificadas as raças I, II, III e XV (Ribeiro *et al.*, 1975). Os últimos trabalhos brasileiros mostram ser 14 o número de raças fisiológicas de *H. vastatrix* identificadas no País, raças I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, mantendo-se a raça II como a mais amplamente distribuída (Fazuoli *et al.*, 2002; Cardoso & Silva, 1992; Cardoso, 1988, 1986; Ribeiro *et al.*, 1975; Chiacchio, 1973).

A caracterização de raças fisiológicas de *H. vastatrix* baseia-se na leitura das expressões fenotípicas em uma série de clones de cafeeiros diferenciadores de raças (Várzea *et al.*, 2002). A formação de novas raças fisiológicas de *H. vastatrix* parece estar relacionada com a pressão de seleção exercida pelos genes de resistência do hospedeiro, notadamente em áreas onde se faz o uso de cultivares portadoras de genes de resistência. A causa principal de variabilidade em *H. vastatrix* tem sido atribuída a mutações genéticas, uma vez que a fase sexual, assim como hospedeiros alternativos, ainda não são conhecidos (Gonçalves *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2001; Várzea *et al.*, 2001; Vallejo & Muñoz, 1998; Cardoso, 1996; Eskes, 1980). Além disso, fenômenos de heterocariose podem estar relacionados ao surgimento de raças, à semelhança do que tem sido inferido para outras ferrugens, como *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Várzea *et al.*, 2002).

3-GENES E FONTES DE RESISTÊNCIA A *Hemileia vastatrix*

Nove genes dominantes (S_H1 a S_H9), simples ou associados, foram identificados condicionando a resistência de cafeeiros a *H. vastatrix*. Os genes S_H1 , S_H2 , S_H4 e S_H5 , foram caracterizados em *C. arabica* provenientes da Etiópia (Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967). O gene S_H3 foi caracterizado em seleções indianas denominadas S.288, S.333 e nas seleções das séries B.A., derivados da espécie *C. liberica* (Bettencourt & Rodrigues, 1988; Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Bettencourt & Carvalho, 1968; Wagner & Bettencourt, 1965).

Os genes S_H6, S_H7, S_H8 e S_H9, além do gene S_H5, foram encontrados em derivados de Híbrido do Timor (Bettencourt *et al.*, 1992; Bettencourt *et al.*, 1980; Bettencourt, 1973).

Além dos genes S_H já identificados pelo CIFC, um ou mais genes, que ainda não foram suplantados por raças fisiológicas de *H. vastatrix*, podem estar presentes nos genótipos do grupo fisiológico A das populações de Híbrido de Timor (Eskes *et al.*, 1990; Bettencourt & Rodrigues, 1988). Os pesquisadores do CIFC classificaram os cafeeiros em 40 grupos fisiológicos, de acordo com o espectro de reações apresentado em relação a *H. vastatrix*, denominados arbitrariamente por letras dos alfabetos grego e romano. Posteriormente, passaram a utilizar letras do alfabeto e números (Bettencourt, 1981; Rodrigues Jr. *et al.*, 1975; D'Oliveira & Rodrigues Jr., 1961). O grupo fisiológico A é representado por plantas que apresentam resistência vertical a todas as raças conhecidas de *H. vastatrix*.

O Híbrido de Timor é um híbrido provavelmente originado de um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora* (Bettencourt, 1973; Rodrigues & Bettencourt, 1965). O Híbrido de Timor foi provavelmente descoberto em 1927, numa lavoura do cultivar de *C. arabica*, denominado Typica, estabelecida por volta de 1917/18, na Ilha de Timor (Bettencourt, 1981). Neste cafeeiro não foi observado quaisquer sintomas de *H. vastatrix* no período de 1962 a 1975 (Gonçalves *et al.*, 1978).

Admite-se que as populações de Híbrido de Timor tenham a sua origem numa única planta (Rodrigues Jr. *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 1978). Sementes colhidas do Híbrido de Timor, da planta supostamente original, de cerca de 9 m de altura e com bom aspecto vegetativo, mas com baixa produção, foram utilizadas pela Empresa Sociedade Agrícola Pátria e Trabalho (S.A.P.T.), para o estabelecimento de pequenos cafezais. Em face dos resultados obtidos nessas lavouras experimentais, sementes das melhores plantas do Híbrido de Timor foram utilizadas, a partir de 1956, para a formação, em larga escala, de novos cafezais por toda Ilha de Timor (Bettencourt, 1981).

Progênes do Híbrido de Timor chegaram a ocupar, em 1981, mais de 50% da área antes ocupada por café arábica em Timor. Esses cafeeiros apresentavam fenótipo semelhante ao do arábica, mas com acentuada heterogeneidade, porém com alta resistência a *H. vastatrix*. Em 1955, sementes do Híbrido de Timor supostamente original foram enviadas para o CIFC pela Junta de Exportação do Café, em Lisboa. No CIFC foi realizada a seleção e caracterização de plantas resistentes a todas as raças de *H. vastatrix* conhecidas, e duas foram denominadas CIFC 832/1 e CIFC 832/2. Essas plantas e derivados dos seus cruzamentos com as principais cultivares de *C. arabica*

foram introduzidas em quase todos os centros experimentais do cafeeiro do mundo, inclusive no Brasil (Bettencourt, 1973).

Com a introdução de plantas portadoras de genes de resistência a ferrugem, em 1970/71, iniciou-se as pesquisas de melhoramento genético do cafeeiro no Estado de Minas Gerais, na UFV (Universidade Federal de Viçosa). No mesmo período foi criado o PIPAEMG (Programa Integrado de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), hoje denominado EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), e desde então essas instituições trabalham em parceria com o principal objetivo de desenvolver cultivares de cafeeiros portadores de genes de resistência à ferrugem do cafeeiro (Pereira *et al.*, 2005).

Os acessos do Híbrido de Timor são as fontes de resistência mais utilizada nos programas de melhoramento do Brasil. Essa fonte é principalmente utilizada nos programas de melhoramento da UFV/EPAMIG e do IAPAR (Instituto Agrônomico do Paraná), além do IAC (Instituto Agrônomico de Campinas). A descendência do Híbrido de Timor constitui um valioso germoplasma, com grande variabilidade genética e portador de genes de resistência contra, não só a *H. vastatrix*, como a outros patógenos, como *Colletotrichum kahawae*, *Pseudomonas syringae* pv. *garçae* e *Meloidogyne exigua* (Pereira *et al.*, 2005; Rodrigues Jr. *et al.*, 2004). No programa de melhoramento do IAC, além de progênies do Híbrido de Timor, o cultivar Icatú e seus derivados, como o Catucaí são utilizados como fonte de resistência a *H. vastatrix*. O Icatú foi selecionado a partir de 1950 e liberado comercialmente em 1992, e corresponde a um genótipo derivado do cruzamento entre *Coffea canephora* (com número de cromossomos duplicados) e *C. arabica* cv. Bourbon Vermelho, com dois retrocruzamentos para *C. arabica* cv. Mundo Novo (Dechen *et al.*, 2007).

4-ESTUDO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DO CAFEEIRO A FERRUGEM

Para se fazer uso adequado do germoplasma em um programa de melhoramento genético, é importante que se conheça a relação genética entre as várias fontes de resistência, estabelecendo primeiramente o modo de herança de cada fonte. Se os padrões forem simples nas fontes, posteriormente, deve-se determinar se a resistência nas diferentes fontes está no mesmo ou em diferentes locos (Buss *et al.*, 1989).

Os primeiros estudos de herança da resistência de *Coffea* spp. a *H. vastatrix* iniciaram em 1932, na Índia, quando os trabalhos de Mayne (1942, 1939, 1936, 1935, 1932) permitiram interpretar geneticamente a resistência de *Coffea* spp. a *H. vastatrix*. Nesses trabalhos, foram relatadas quatro raças, denominadas na época por *strains*, responsáveis pela doença em alguns genótipos de café na Índia. Mais tarde, com a criação do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) em 1955, em Portugal, outros pesquisadores caracterizaram, além de outras, as raças II, I, IX e VII, que correspondem às quatro raças identificadas por Mayne, denominadas *strains* 1, 2, 3 e 4, respectivamente (Fazuoli *et al.*, 2005; Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967).

Posteriormente, Kukhang *et al.* (1993), estudando a herança da resistência do gene S_{H3} à raça II de *H. vastatrix*, na Indonésia, observaram em plantas F_2 , a clássica segregação mendeliana de 3:1 (3 plantas resistentes para 1 suscetível), indicando a presença de um gene dominante condicionando a resistência do gene S_{H3} à raça II. Este mesmo gene foi estudado mais tarde, e foi observado a mesma segregação em uma população F_2 derivada de *C. liberica* (Prakash *et al.*, 2004).

Em estudos com a raça II e XXV de *H. vastatrix*, observou-se, para ambas as raças, herança monogênica na geração F_2 do híbrido H 421, originada do Híbrido de Timor UFV 427-15. Além disso, observaram, também para ambas as raças, três genes dominantes e independentes governando a resistência nas gerações F_2 dos híbridos H 419, H 430, H 447, H 464, H 469 e H 484, resultantes do cruzamento das seleções de Híbridos de Timor UFV 445-46, UFV 442-105, UFV 377-1, UFV 334-19, UFV 446-8, UFV 443-3, respectivamente (Pereira, 1995). Em todas as populações foi realizado inoculações nos respectivos retrocruzamentos resistente e suscetível com o objetivo de confirmar a segregação observada na geração F_2 .

Mais tarde, Brito (2007) também estudou o Híbrido de Timor UFV 427-15. Da mesma forma que Pereira (1995), foi observado herança monogênica dominante quando as populações F_2 , retrocruzamentos resistente e suscetível foram inoculadas com a raça II de *H. vastatrix*.

Na literatura encontram-se outros trabalhos sobre a herança da resistência à raça II de *H. vastatrix* em cafeeiros oriundos de cruzamento entre genótipos suscetíveis e acessos do Híbrido de Timor (HDT). Os trabalhos de Barbosa *et al.* (2005), Caixeta *et al.* (2003) e Tedesco *et al.* (2000) observaram, na população F_2 , que as fontes de resistência HDT UFV 420-22, 427-15 e 376-2 apresentam herança monogênica,

conferida por um gene dominante para a raça II de *H. vastatrix*. Também em uma população F₂, originada do cruzamento do Catuaí Amarelo UFV 2154-344 com a fonte de resistência HDT UFV 440-10, foi observado que dois genes dominantes e um recessivo de segregação independente governam a resistência dessa fonte à raça II de *H. vastatrix* (Oliveira *et al.*, 2004). Também foi observado em duas populações F₂ originadas de cruzamentos com o HDT UFV 440-22, que três genes governam a resistência desse Híbrido de Timor quando inoculadas com a raça II de *H. vastatrix*. Na população derivada do HDT UFV 440-22 e o Mundo Novo UFV 2190-100 foram observados um gene dominante e dois recessivos independentes, enquanto na população F₂ derivada do HDT UFV 440-22 e o Catuaí UFV 2143-193 foram observados um gene dominante e dois recessivos complementares, controlando a resistência (Barbosa *et al.* 2006; 2005).

5-MARCADORES MOLECULARES E MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A FITOPATÓGENOS

Os marcadores de DNA surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. Os marcadores de DNA exibem neutralidade fenotípica, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos (Borém & Caixeta, 2006).

Os marcadores moleculares podem auxiliar o melhorista de café a minimizar o problema do longo período necessário para a obtenção de linhagens melhoradas. O café é uma cultura perene, de ciclo longo, onde o melhoramento é efetuado utilizando vários ciclos de autofecundação e, ou, retrocruzamentos, sendo, portanto, um processo muito demorado. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças facilitarão a piramidação desses genes em cultivares comerciais (Alzate-Marin *et al.*, 2001). Dessa forma, as técnicas moleculares oferecem novas oportunidades para a manipulação dos genes de resistência associados a Seleção Assistida por Marcadores (SAM) (Geffroy *et al.*, 1998).

Para disponibilizar a tecnologia da SAM, é necessária a identificação de marcadores moleculares ligados aos genes de interesse. Para isso, é preciso a identificação de marcadores que revelem polimorfismo entre genitores contrastantes

para uma característica, e que, portanto, segregarão na população F₂ proveniente do cruzamento entre eles.

Vários marcadores moleculares estão disponíveis atualmente, entre eles os microssatélites (Brunelli *et al.*, 2002; Chin *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1994).

Os genomas eucariotos são densamente povoados por seqüências simples repetidas, de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem*, altamente polimórficos, denominadas de microssatélites ou SSR-*Single Sequence Repeats* (Caixeta *et al.*, 2006).

Os SSRs são distribuídos de maneira aleatória em genomas eucariotos (Caixeta *et al.*, 2006; Brunelli *et al.*, 2002; Hearne *et al.*, 1992). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a obtenção de *primers* específicos que amplificam, via PCR-*Polymerase Chain Reaction*, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Quando os microssatélites são individualmente amplificados, utilizando um par de *primers* complementares às seqüências que os flanqueiam, eles quase que invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho de bandas. A variação do tamanho dos produtos de PCR é uma consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite (Cregan *et al.*, 1999). Essa variação pode ter origem em *crossing-over* desigual ou erro da DNA polimerase durante a replicação (*slippage*).

Dessa forma, cada microssatélite, independente do elemento repetitivo, constitui um loco genético altamente variável, multialélico, facilmente reprodutível e de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia da PCR favorecem a utilização desses marcadores em estudos de mapeamento de genes eucarióticos (Brunelli *et al.*, 2002).

A maioria dos caracteres de importância agrônômica, que são avaliados em programas de melhoramento é determinado por vários locos, tais caracteres são denominados quantitativos. Os locos genéticos que afetam um caráter quantitativo são denominados de QTLs-*Quantitative Trait Loci*, podendo ser um único gene ou um segmento do cromossomo (Falconer & Mackay, 1996).

O mapeamento de QTLs é baseado em testes de ligação entre marcadores moleculares e características fenotípicas. A análise mais simples utilizada na identificação dessa associação é o de Marca Simples. Essa análise não requer a construção de mapas e apenas detecta associação entre marcadores e QTLs, sem localizar sua posição no mapa (Edwards *et al.*, 1987).

O mapeamento por Marca Simples é utilizado para uma abordagem inicial no mapeamento de QTLs e fornece a base para o desenvolvimento de outros métodos de mapeamento mais complexos. Nesta análise, a distribuição dos valores do fenótipo é examinada separadamente, para cada loco marcador. Assim, cada teste de associação fenótipo-marcador é realizado independentemente da informação dos outros locos marcadores. A estratégia de detecção é baseada na comparação entre os valores médios da característica fenotípica associados aos diferentes genótipos marcadores. Uma diferença significativa entre as médias das classes genotípicas dos marcadores indica a presença de pelo menos um QTL associado ao marcador. Geralmente são utilizados os métodos de Análise de Variância, de Regressão e uma terceira possibilidade para verificar se há ligação entre QTL e marca, nesta análise, é pelo método de Máxima Verossimilhança. A vantagem desta análise é a possibilidade de além de identificar QTLs e estimar a sua posição com relação ao marcador, ela fornece a estatística do LOD *score*, que facilita a interpretação do teste (Cruz & Silva, 2006; Lander & Botstein, 1989).

Além desta, outras metodologias de identificação de QTLs podem ser empregadas, as quais envolvem a análise de mapas de ligação, dentre elas destacam-se o mapeamento por Intervalo Simples e por Intervalo Composto.

O mapeamento por Intervalo Simples aumenta o poder de detecção da associação QTL-fenótipo, através da estimativa da magnitude do efeito e a posição do QTL no mapa genético. Esta metodologia é baseada na segregação dos marcadores utilizando a função de Máxima Verossimilhança para estimar a frequência de recombinação e o efeito do QTL entre dois marcadores do mapa genético (Lander & Botstein, 1989). É baseado na estimativa de probabilidades de um par de marcas adjacentes flanquear um QTL, diferentemente do método de análise de Marcas Simples que compara as médias fenotípicas de diferentes grupos alélicos dos marcadores.

O mapeamento por Intervalo Composto foi proposto por Jansen (1993) e Zeng (1994). O método combina a análise de Marcas Simples com a estatística de Máxima Verossimilhança, permitindo que sejam estimados todos os parâmetros envolvidos na análise, como a média, o efeito dos QTLs, a variância e a distância entre o QTL e os marcadores, o que torna o mapeamento mais preciso (Lander & Botstein, 1989). A desvantagem do método é isolar o intervalo analisado do restante do genoma, desconsiderando os efeitos de outros QTLs próximos ao QTL contido no intervalo estudado.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M.R., SARTORATO, A., RAVA, C.A., BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1:125-133. 2001.
- BARBOSA, J.C., CAIXETA, E.T., CAPUCHO, A.S., KOEHLER, A., MAIA, T.A., SAKIYAMA, N.S. & ZAMBOLIM, L. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 440-22 à raça II de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. pp. 123 In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília (Resumos). 2005.
- BARBOSA, J.C., CAIXETA, E.T., ZAMBOLIM, E.M., CAPUCHO, A.S., RUFINO, R., ZAMBOLIM, L. Caracterização da resistência vertical e horizontal do cafeeiro à ferrugem em acessos de Híbrido de Timor. In: Anais do IV Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Londrina (Resumos). 2005.
- BARBOSA, J.C., CAIXETA, E.T., KOEHLER, A., MAIA, T., CAPUCHO, A.S., ZAMBOLIM, L., SAKIYAMA, N. S. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 440-22 à raça II de *Hemileia vastatrix*. In: Anais do XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília (Resumos). 2004.
- BETTENCOURT, A.J., LOPES, J. & PALMA, S. Factores genéticos que condicionam a resistência às raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. dos clones-tipo dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de Híbrido de Timor. *Broteria Genética* XIII (LXXX):185-194. 1992.
- BETTENCOURT, A.J. & RODRIGUES, C.J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. London Elsevier Applied Science Publishers. 199-234p. 1988.
- BETTENCOURT, A.J. Melhoramento genético do cafeeiro: transferência de factores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L. *Doctor Scientiae*, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Lisboa, Portugal. 1981.
- BETTENCOURT, A.J., NORONHA-WAGNER, M. & LOPES, J. Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Broteria Genética* I (LXXVI):53-58. 1980.
- BETTENCOURT, A.J. Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timor'. Instituto Agrônomo de Campinas, Circular nº 23:20p. 1973.
- BETTENCOURT, A.J. & NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Agronomia Lusitana* 31:285-292. 1971.
- BETTENCOURT, A.J. & CARVALHO, A. Melhoramento visando à resistência do cafeeiro à ferrugem. *Bragantia* 27:35-68. 1968.
- BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. Marcadores Moleculares. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 374p. 2006.
- BRITO, G.G. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. *Doctor Scientiae*, Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2007.

- BRUNELLI, K.R., SILVA, H.P. & CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em Milho. *Fitopatologia Brasileira* 27:134-140. 2002.
- BUSS, G.R., CHEN, S., TOLIN, A. & ROANE, C.W. Breeding soybeans for resistance to Soybean mosaic virus. pp.1144-1154 In: PASCALE, A.J. (Ed.) Proc. World Soybean Res. Conf. IV. Buenos Aires-Argentina: Argentina Soybean Association. 1989.
- CAIXETA, E.T., OLIVEIRA, A.C.B., BRITO, G.G. & SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. pp.9-79 In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. (Eds.) Marcadores Moleculares. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- CAIXETA, E.T., RUFINO, R.J.N., OLIVEIRA, A.C.B., SAKIYAMA, N.S., ZAMBOLIM, E.M. & ZAMBOLIM, L. Caracterização da resistência genética do Híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro. pp. 226-226 In: III Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Porto Seguro (Resumos). 2003.
- CARDOSO, R.M.L. Prospecção de raças de *Hemileia vastatrix* em germoplasma de café, para seleção de cafeeiros de grupos fisiológicos com elevada resistência à ferrugem. pp. 305 In: Simpósio Internacional sobre Café Adensado, Londrina (Resumos). 1996.
- CARDOSO, R.M.L. & SILVA, E. Raças de *Hemileia vastatrix* identificadas em cafeeiros de genótipos simples e complexos no Estado do Paraná. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Araxá-MG (Resumos). 1992.
- CARDOSO, R.M.L., ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. coletada do germoplasma de *Coffea arabica* L. no Estado de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 12:343-346. 1988.
- CARDOSO, R.M.L. Novas raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no Brasil, métodos de identificação, e detecção de grupos fisiológicos em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. *Magister Scientiae*, Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1986.
- CARVALHO, A. Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil. Documento nº 34 - Instituto Agrônomo de Campinas, 8pp. 1993.
- CARVALHO, A. & KRUG, C.A. Agentes da polinização da flor do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Bragantia* 9:11-24. 1949.
- CARVALHO, A. & MONACO, L.C. Natural cross-pollination in *Coffea arabica* L. pp. 447-449 In: International Horticultural Congress, Brussels, Belgium (Resumos). 1962.
- CHIACCHIO, F.P.B. Identificação de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., em material proveniente dos Estados da Bahia e Espírito Santo. *Magister Scientiae*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1973.
- CHIN, E.C.L., SENIOR, M.L. & SMITH, J.S.C. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome* 39:866-873. 1996.
- CIFC - Relatório do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro. Oeiras, Portugal: 29pp. 1971.
- CONAB - Levantamento da produção de café - Safra 2007/2008. <http://www.conab.gov.br>. Acessado em 25/06/2007. 11pp. 2007.

- CREGAN, P.B., JARVIK, T., BUSH, A.L., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., KAHLER, A.L., KAYA, N., VANTOAI, T.T., LOHNES, D.G., CHUNG, J. & SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean. *Crop Science* 39:1464-1490. 1999.
- CRUZ, C.D. & SILVA, L.C. Análise de Marcadores Moleculares. pp.307-374 In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. (Eds.) Marcadores Moleculares. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- D'OLIVEIRA, B. & RODRIGUES JR., C.J. O problema das ferrugens do cafeeiro: Determinação da resistência à *Hemileia vastatrix* em *Coffea arabica*. *Revista do Café Português* 8:5-50. 1961.
- DECHEN, S.C.F., POMMER, C.V., SALVA, T.J.G., FAZUOLI, L.C. & TEIXEIRA, K.P.F. A ferrugem alaranjada do cafeeiro e a obtenção de cultivares resistentes. *Boletim Técnico-Informativo do Instituto Agrônômico. O Agrônômico* 59:80pp. 2007.
- EDWARDS, M.D., STUBER, C.W. & WENDELL, J.F. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. *Genetics* 116:113-125. 1987.
- ESKES, A.B. Ocorrência de um isolado da raça v3v5 de *Hemileia vastatrix* pouco virulento em condições de laboratório. pp. 81-82 In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Campos do Jordão (Resumos). 1980.
- ESKES, A.B., HOOGSTRATEN, J.G.J., TOMA-BRAGINI, M. & CARVALHO, A. Race-specificity and inheritance of incomplete resistance to coffee leaf rust in some Icatu coffee progenies and derivatives of Híbrido de Timor. *Euphytica* 47:11-19. 1990.
- FALCONER, D.S. & MACKAY, T.F.C. Introduction Quantitative Genetics. London: Longman Scientific & Technical. 464p. 1996.
- FAZUOLI, L.C., BRAGHINI, M.T. & CONCEIÇÃO, A.S. Levantamentos de raças de *Hemileia vastatrix*. pp. 439-440 In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu (Resumos). 2002.
- FAZUOLI, L.C., OLIVEIRA, A.C.B., TOMA-BRAGINI, M. & SILVAROLLA, M.B. Identification and use of sources of durable resistance to Coffee Leaf Rust at the IAC. pp.137-186 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VÁRZEA, V.M.P. (Eds.) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (3). Brasília: Embrapa-Cenargen. 220p. 1998.
- GEFFROY, V., CREUSOT, F., FALQUET, J., SÉVIGNAC, M., ADAM-BLONDON, A.F., BANNEROT, H., GEPTS, P. & DRON, M. A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics* 96:494-502. 1998.
- GONÇALVES, M.M., RODRIGUES, M.L., MEXIA, J.N. & DAEHNHARDT, E. Melhoramento da cafeicultura em Timor face à *Hemileia vastatrix* B. & Br. Garcia de Orta, Sér. Est. Agron. 5:3-10. 1978.

- GONÇALVES, S.M., ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., PEREIRA, A.A. & SAKIYAMA, N.S. Monitoramento de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros (*Coffea arabica*) que receberam aplicação de fungicidas sistêmicos. pp. 267-268 In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu (Resumos). 2002.
- GUZZO, S.D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. *Doctor Scientiae*, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP. 2004.
- HEARNE, C.N., GHOSH, S. & TODD, J.A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics* 8:288-294. 1992.
- JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135:205-211. 1993.
- KUKHANG, T.D., MAWARDI, S. & ESKES, A.B. Studies on the inheritance of the S_H3 resistance factor to coffee leaf rust. pp. 776-778 In: Colloque Scientifique International sur le Café. ASIC, v. 2, Montpellier, França (Resumos). 1993.
- KUSHALAPPA, A.C. & ESKES, A.B. Coffee rust: epidemiology, resistance and management. Boca Roton: CRC Press. 345p. 1989.
- LANDER, E.S. & BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199. 1989.
- MATIELLO, J.B. Café conillon. Rio de Janeiro: MMA/SDR/PROCAFÉ/PNFC. 162p. 1998.
- MAYNE, W.W. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Nature* 129:510. 1932.
- MAYNE, W.W. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. The Mysore Coffee Experiment Station. Bulletin nº 13:28pp. 1935.
- MAYNE, W.W. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. The Mysore Coffee Experiment Station. Bulletin nº 14:21pp. 1936.
- MAYNE, W.W. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. The Mysore Coffee Experiment Station. Bulletin nº 13:28pp. 1939.
- MAYNE, W.W. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. The Mysore Coffee Experiment Station. Bulletin nº 24:1942.
- NORONHA-WAGNER, M. & BETTENCOURT, A.J. Genetic study of resistance of *Coffea* sp. to leaf rust-Identification and behaviour of four factor conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal of Botany* 45:2021-2031. 1967.
- OLIVEIRA, A.C.B., SAKIYAMA, N.S., CAIXETA, E.T., CAPUCHO, A.S., RUFINO, R. Análise genética da resistência de cafeeiros derivados do Híbrido de Timor à raça II de *Hemileia vastatrix*. In: Anais do 30º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, São Loureiro (Resumos). 2004.
- PEREIRA, A.A. Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. *Doctor Scientiae*, Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1995.

- PEREIRA, A.A., SAKIYAMA, N.S., ZAMBOLIM, L., MOURA, W.M., ZAMBOLIM, E.M. & CAIXETA, E.T. Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust in the UFV/EPAMIG breeding program. pp.215-232 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VARZEA, V.M.P. (Eds.) Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- PINTO-MAGLIO, C.A.F. Cytogenetics of coffee. Brazilian Journal Plant Physiology 18:37-44. 2006.
- PRAKASH, N.S., MARQUES, D.V., VARZEA, V.M.P., SILVA, M.C., COMBES, M.C. & LASHERMES, P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. Theoretical and Applied Genetics 109:1311-1317. 2004.
- RIBEIRO, I.J.A., SUGIMORI, M.H., MORAES, S.A. & MONACO, L.C. Raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no Estado de São Paulo. Summa Phytopathologica 1:19-22. 1975.
- RIJO, L. & RODRIGUES Jr., C.J. Processo de infecção da *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cultivares susceptíveis e resistentes de *Coffea arabica* L. Garcia de Orta 5:23-24. 1978.
- RODRIGUES Jr., C.J., GONÇALVES, M.M. & VÁRZEA, V.M.P. Importância do Híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. Revista de Ciências Agrárias 27:203-213. 2004.
- RODRIGUES, J.C., VÁRZEA, V., SILVA, M., GUERRA-GUIMARÃES, L., ROCHETA, M. & MARQUES, D. Recent advances on coffee leaf rust. pp.179-193 In: PRAKASH, N.S., DEVASIA, J. (Ed.). Proceedings of the International Scientific Symposium on Coffee. Bangalore Central Coffee Research Institute. 2001.
- RODRIGUES Jr., C.J., BETTENCOURT, A.J. & RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Phytopathology 13:49-70. 1975.
- RODRIGUES Jr., C.J. & BETTENCOURT, A.J. Routine screening for resistance to *Hemileia vastatrix* B. et Br. on *Coffea arabica* L. acessions from different coffee producing regions of the world. Prog. Rept., 1960-1965, Oeiras, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro 47-99. 1965.
- SILVA, M.D.C., VÁRZEA, V., GUIMARÃES, L.G., AZINHEIRA, H.G., FERNANDEZ, D., PETITOT, A.S., BERTRAND, B., LASHERMES, P. & NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. Brazilian Journal of Plant Physiology 18:119-147. 2006.
- TEDESCO, N.S., SAKIYAMA, N.S., ZAMBOLIM, L., TEIXEIRA-CABRAL, T. & PEREIRA, A.A. Marcadores OPF-151280 e OPC-091120 ligados ao gene de resistência à Ferrugem do Cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). pp. 569-571 In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, MG (Resumos). 2000.
- VALLEJO, L.F.G. & MUÑOZ, J.D. Identificación de la raza XXII (v5v6) de *Hemileia vastatrix* em Colombia. Revista del Centro Nacional de Investigaciones de Café 49:340-344. 1998.

- VÁRZEA, V.M.P. & MARQUES, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. pp.53-74 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VÁRZEA, V.M.P. (Eds.) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- VÁRZEA, V.M.P., RODRIGUES, C.J., SILVA, M.C.M.L., GOUVEIA, M., MARQUES, D.V., GUERRA-GUIMARÃES, L. & RIBEIRO, A. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. pp.297-320 In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2002.
- VÁRZEA, V.M.P., RODRIGUES JR., C.J., SILVA, M.C., MARQUES, D.V., MORENO, G., CASTILLO, J., ALVARADO, G., RAMACHAN-DRAN, M., MAIDU, R. & BHAT, S.S. Pathotypes of *Hemileia vastatrix* with ability to break the resistance of improved commercial coffee varieties. pp. A127 In: International Conference on Coffee Science, Trieste (Resumos). 2001.
- WAGNER, M. & BETTENCOURT, A.J. Inheritance of reaction to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. in *Coffea arabica* L. Progress Report: 1960-1965, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal:121-123. 1965.
- YU, Y.G., SAGHAI MARROF, M.A., BUSS, G.R., MAUGHAN, P.J. & TOLIN, S.A. RFLP and microsatellite mapping of a gene for *Soybean mosaic virus* resistance. *Phytopathology* 84:60-64. 1994.
- ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M., VALE, F.X.R, PEREIRA, A.A., SAKIYAMA, N.S., CAIXETA, E.T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in Brazil. pp.75-115 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VARZEA, V.M.P. (Eds.) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R.D., COSTA, H., PEREIRA, A.A. & CHAVES, G.M. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. pp.369-450 In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2002.
- ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R.D., PEREIRA, A.A. & CHAVES, G.M. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. pp.134-215 In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) Produção de café com qualidade. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 1999.
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1466. 1994.

CAPÍTULO 1 - HERANÇA DA RESISTÊNCIA DO HÍBRIDO DE TIMOR A *H.*

vastatrix

1-INTRODUÇÃO

A ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., é considerada a principal doença do cafeeiro, cujo controle pode ser realizado pela associação de medidas de natureza química e genética (Zambolim *et al.*, 1999). Apesar da eficiência dos fungicidas cúpricos e/ou sistêmicos, o desenvolvimento de cultivares com resistência genética é economicamente a melhor alternativa para o controle da doença (Bettencourt & Carvalho, 1968).

A obtenção de cultivares geneticamente resistentes, visando diminuir os custos de produção, tem sido um constante desafio para os melhoristas. Cultivares resistentes, ao longo do tempo, podem tornar-se suscetíveis a novas raças do patógeno que se desenvolvem por meio de mutações genéticas, com potencial para suplantar a resistência de determinados cafeeiros (Várzea *et al.*, 2001; Cardoso, 1986).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008), existem cerca de 103 cultivares no Registro Nacional de Cultivares colocados à disposição dos produtores. Desse total, 41 cultivares apresenta resistência vertical e/ou horizontal a *H. vastatrix*, sendo 26 derivadas de cruzamentos de cultivares suscetíveis com acessos do Híbrido de Timor, listadas a seguir: Tupi IAC 1669-33, Obatã IAC 1669-20 (Fazuoli *et al.*, 2002), IAPAR 59, IPR 97, IPR 98, IPR 99, IPR 104, IPR 105, IPR 107, IPR 108 (Sera *et al.*, 2005), Oeiras MG 6851, Paraíso MG H 419-1, Araponga MG1 e MG2, Sacramento MG1, Catiguá MG1 e MG2 e Pau-Brasil MG1 (Pereira *et al.*, 2005), além de Acauã, Canário, IBC-Palma-1 e 2, Sabiá precoce, médio e tardio, e Siriema 842.

Os acessos denominados Híbrido de Timor e as progênies derivadas do seu cruzamento com outros cultivares, vêm sendo estudados em diversas regiões cafeeiras do mundo como fonte de resistência a *H. vastatrix* (Várzea *et al.*, 2002). O Híbrido de Timor é provavelmente um híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora* (Bettencourt, 1981; Bettencourt, 1973; Rodrigues & Bettencourt, 1965). Esse germoplasma tem sido valioso para os programas de melhoramento, visando à obtenção de resistência durável à ferrugem. Além de alguns acessos como CIFC 832/1 e CIFC 832/2 se manterem resistentes a todas as raças conhecidas do patógeno até o momento, eles são tetraplóides e se hibridizam facilmente com as cultivares de *C. arabica*, permitindo a transferência dos genes de resistência (Várzea & Marques, 2005; Carvalho *et al.*, 1989).

O conhecimento da herança da resistência do Híbrido de Timor a *H. vastatrix* é importante para fornecer um sólido entendimento da base genética da resistência nestes acessos e direcionar o melhoramento genético do cafeeiro.

Os trabalhos de Mayne (1942, 1939, 1936, 1935, 1932) foram os primeiros estudos de herança que interpretaram geneticamente a resistência de *Coffea* spp. a *H. vastatrix*. Nestes trabalhos, foram relatados quatro genes, responsáveis pela resistência de alguns genótipos de café às raças de *H. vastatrix* predominantes na Índia (Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967).

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura estudando a herança dos genes de resistência nesse patossistema, que além de escassos são pouco informativos, reforçando a importância desse tipo de estudo. Dois trabalhos foram encontrados na literatura sobre a herança da resistência do gene S_H3 a *H. vastatrix*, em populações F_2 derivadas de *C. liberica* (Prakash *et al.*, 2004; Kukhang *et al.*, 1993). O trabalho de Pereira (1995), utilizando a raça II e XXV de *H. vastatrix*, foi o primeiro estudo de herança dos genes que governam a resistência dos Híbridos de Timor UFV 445-46, UFV 442-105, UFV 377-1, UFV 334-19, UFV 446-8 e UFV 443-3. Existem outros estudos sobre a herança de genes existentes em derivados de Híbridos de Timor (Brito, 2007; Brito *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Caixeta *et al.*, 2003; Tedesco *et al.*, 2000).

Assim, com o objetivo de aumentar as informações genéticas básicas sobre os genes de resistência a ferrugem do cafeeiro existentes em acessos do Híbrido de Timor, foi caracterizada a herança da resistência a esta doença no Híbrido de Timor UFV 443-3. No patossistema *Coffea-Hemileia vastatrix*, este é o primeiro estudo de herança em que o inóculo utilizado foi derivado de lesões monopustulares de *H. vastatrix*.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-POPULAÇÕES DE CAFEEIROS

O Híbrido de Timor UFV 443-3 foi autofecundado e as plantas originadas foram utilizadas para confirmar a homozigose dos genes de resistência. Para a caracterização da herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 a *H. vastatrix*, esta fonte de resistência foi utilizada como genitor masculino no cruzamento com os genótipos suscetíveis Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) e Mundo Novo IAC 515-3 (UFV

2164-193). As plantas F₁, denominadas H 511-1 (UFV 2148-57 x UFV 443-3) e H 484-1 (UFV 2164-193 x UFV 443-3), foram submetidas à autofecundações controladas para obtenção da geração segregante F₂. A planta F₁ H 511-1 foi retrocruzada com o Híbrido de Timor UFV 443-3 e com o Catuaí Amarelo UFV 2148-57. A descrição das plantas estudadas encontra-se na Tabela 1.

Os cruzamentos para a obtenção das plantas F₁ foram realizados por Pereira (1995). O Híbrido de Timor UFV 443-3, os genótipos Catuaí Amarelo UFV 2148-57 e Mundo Novo UFV 2164-193, assim como os híbridos F₁, se encontram no Campo de Seleção de Híbridos nº 8, da área experimental do Fundão do Departamento de Fitopatologia da UFV. As mudas da autofecundação controlada do Híbrido de Timor UFV 443-3, dos retrocruzamentos e das gerações F₂ foram produzidas em 2004/05 e mantidas sob condições de viveiro e, posteriormente, transplantadas no campo.

Tabela 1: Populações de cafeeiros avaliadas no estudo de herança.

Descrição	Número de plantas
Híbrido de Timor UFV 443-3	1
Catuaí Amarelo UFV 2148-57 ^a	1
Mundo Novo UFV 2164-193 ^b	1
Planta F ₁ H 511-1 (cruzamento 1)	1
Planta F ₁ H 484-1 (cruzamento 2)	1
Híbrido de Timor UFV 443-3 autofecundado	50
F ₂ do cruzamento 1	246
RC _R do cruzamento 1	87
RC _S do cruzamento 1	115
F ₂ do cruzamento 2	240
Total de plantas	743

^a - Genitor feminino no cruzamento com o Híbrido de Timor UFV 443-3, denominado cruzamento 1, originando a planta F₁ H 511-1; ^b - Genitor feminino no cruzamento com o Híbrido de Timor UFV 443-3, denominado cruzamento 2, originando a planta F₁ H 484-1.

2.2-OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *H. vastatrix*

A raça II de *H. vastatrix* foi caracterizada biologicamente em 1986 por Cardoso e desde então está sendo mantida pelo laboratório BioCafé/UFV por inoculações periódicas em mudas de Catuaí Vermelho IAC 44. Um isolado, designado “patótipo 001”, também foi utilizado no estudo de herança. O patótipo 001 foi coletado de uma lesão monopustular, em lavoura comercial da cultivar Oeiras, na região de Viçosa-MG. Esse isolado foi selecionado por ser capaz de infectar o cultivar Oeiras, um derivado do

cruzamento entre o Híbrido de Timor CIFC 832/1 com Caturra Vermelho CIFC 19/1, além do cultivar Icatú Vermelho, um derivado do cruzamento entre *C. canephora* e *C. arabica*. Estes genótipos foram lançados comercialmente como resistentes à raça II de *H. vastatrix* a cerca de 9 e 15 anos, respectivamente.

Para a obtenção dos isolados monopustulares, as superfícies abaxiais de folhas do cafeeiro Catuaí Vermelho IAC 44 foram inoculadas, separadamente, com uredosporos da raça II e do patótipo 001 de *H. vastatrix*. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para uma câmara de nevoeiro sob condições controladas (22°C e umidade relativa (UR)~90%), onde permaneceram por 48 horas. Após esse período, foram transferidas para uma câmara com temperatura controlada de 22°C e fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram até a manifestação da doença (Zambolim & Chaves, 1974).

Uma pequena pústula da raça II e do patótipo 001 foram transferidas, separadamente, e imediatamente multiplicadas em Catuaí Vermelho IAC 44, e mantidas em compartimentos individualizados para evitar misturas (Figura 1). A metodologia utilizada para a obtenção de isolados monopustulares foi semelhante à descrita para *Puccinia psidii* (Junghans, 2001), *Puccinia tritici* (Kolmer *et al.*, 2007; Chaves & Barcellos, 2006) e *Uromyces appendiculatus* (Faleiro, 1997). Após a obtenção, os uredosporos monopustulares foram inoculados nos clones diferenciadores de raças de *H. vastatrix* do BioCafé/UFV para confirmar a caracterização biológica do patógeno.

A multiplicação dos uredosporos caracterizados foi realizada segundo a metodologia descrita por Zambolim & Chaves (1974). Os uredosporos do patógeno foram depositados, com auxílio de um pincel de pêlo de camelo, em folhas jovens e completamente desenvolvidas de cafeeiro Catuaí Vermelho IAC 44. Em seguida, as folhas foram aspergidas com água destilada até obter-se um leve molhamento superficial. As plantas foram mantidas no escuro, a 22°C e UR~90% por 48 horas, e em seguida transferidas para uma câmara de 22°C e fotoperíodo de 12 horas. Após abundante esporulação, os uredosporos foram coletados e acondicionados em ampolas de vidro vedadas com algodão. As ampolas foram colocadas dentro de um dessecador contendo na parte inferior solução de ácido sulfúrico, densidade de 1,8 e concentração de 32,6% (v/v), de modo a manter a umidade relativa em torno de 50% no ambiente interno. O dessecador foi acondicionado em geladeira a 4°C.

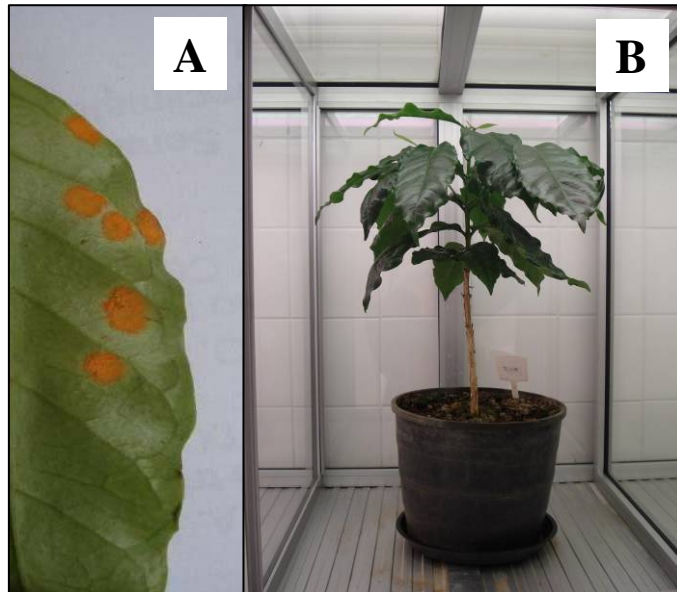


Figura 1: **A** - Lesões monopustulares coletadas para a multiplicação dos uredosporos. **B** - câmara individualizada utilizado para a multiplicação de uredosporos de *H. vastatrix* utilizados no estudo.

2.3-INOCULAÇÃO DAS PLANTAS

A caracterização biológica de raças foi determinada de acordo com a reação de resistência ou susceptibilidade manifestada nos clones diferenciadores de raças mantidos pelo BioCafé/UFV (Quadro 1). A metodologia de disco de folhas, com duas repetições cada, foi utilizada para a caracterização dos uredosporos, da raça II e do patótipo 001 de *H. vastatrix*, utilizados no experimento (Tamayo *et al.*, 1995).

Antes da inoculação das populações de cafeeiros, a viabilidade dos uredosporos de *H. vastatrix* foi avaliada pelo teste de germinação em meio ágar-água 2%, utilizando o método descrito por Zambolim & Chaves (1974). Somente os uredosporos com viabilidade superior a 30% foram considerados adequados para os testes de inoculação.

Para a avaliação da resistência genética das plantas, foi utilizada a metodologia de disco de folhas, por ser um método rápido na obtenção dos resultados, apesar do alto gasto de inóculo (Tamayo *et al.*, 1995). Para cada planta das populações foram utilizados 16 discos de 1,5 cm de diâmetro de folhas. Cada disco foi inoculado na face abaxial com uredosporos do patógeno, com o auxílio de pincel de pêlo de camelo. Após a inoculação, os discos foram colocados sobre uma tela de nylon e espuma, saturada com água, no interior de um gerbox, e então atomizados com água destilada. Os gerbox contendo os discos de folhas foram fechados e mantidos na ausência de luz durante 48

horas a 22°C e, em seguida, transferidas para uma câmara com condições controladas de temperatura e luminosidade (22°C, 12 horas de luz) (Tamayo *et al.*, 1995). Como os discos foram retirados de folhas colhidas nas populações mantidas em condições de campo, quatro de cada amostra, foram reservados sem inocular, como controle negativo, a fim de eliminar falsos positivos. Os discos inoculados foram limpos com o auxílio de algodão, 48 horas após a inoculação.

Durante a incubação, foi verificado, semanalmente, o nível de água no interior dos gerbox. Após cumprir o período latente dos controles positivos, progenitores suscetíveis, entre 25 e 30 dias, foi iniciada a avaliação da resistência das populações de acordo com a escala de notas proposta por Tamayo *et al.* (1995). As plantas das populações inoculadas foram divididas em duas classes fenotípicas com base na ausência de uredosporos: (a) resistente, notas 1, 2 e 3; ou presença de uredosporos: (b) suscetíveis, notas 4, 5 e 6. Nota 1: ausência de sintomas; nota 2: lesões cloróticas pequenas; nota 3: lesões cloróticas grandes, sem esporulação; nota 4: lesões cloróticas grandes com pequena esporulação, ocupando menos de 25% da área da lesão com uredosporos; nota 5: lesões com esporulação ocupando de 25 a 50% de sua área e nota 6: lesões com esporulação ocupando mais de 50% de sua área (Figura 2).

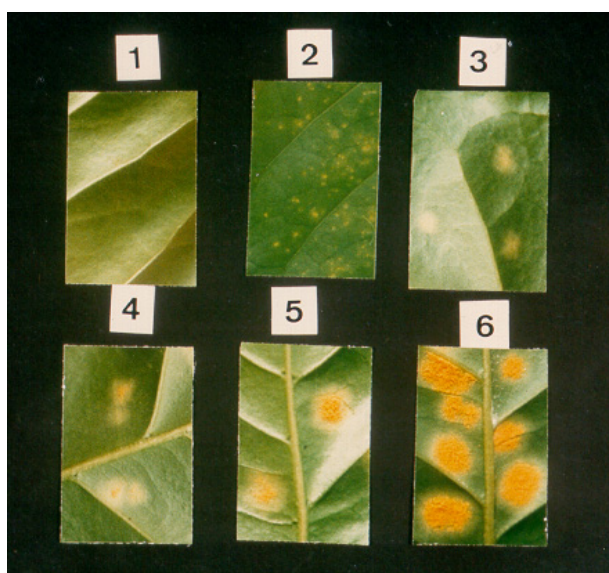


Figura 2: Índice de esporulação proposta por Tamayo *et al.* (1995) para avaliação da resistência de cafeeiros à infecção por *H. vastatrix*.

Quadro 1: Raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk et Br. identificadas no Brasil, com seus respectivos genes de virulência e resistência. Adaptado de Várzea *et al.* (2005); Cardoso (1986); Bettencourt (1981).

Raças fisiológicas de <i>H. vastatrix</i> presentes no Brasil	Genes de virulência deduzidos	Genes do Hospedeiro																
		Coffea spp. e Híbridos Interespecíficos																
		Bourbon	832/1 - H. Timor	128/2 - Dilla & Alghe	HW 17/12	H 147/1	1343/269 - H. Timor	134/4 - S.12 Kaffa	87/1 - Geisha	H 152/3	32/1 - DK 1/5	33/1 - S. 288 -23	110/5 - S. 4 Agaro	1006/10 - KP 532	H 153/2	635/3 - S.12 Kaffa	644/18 - H. Kawisari	
		E	A	α	O	T	R	I	C	Y	D	G	J	L	Z	W	M	3
I	V _{2,5}	S								S								
II	V ₅	S																
III	V _{1,5}	S	S					S										
VII	V _{3,5}	S									S							
X	V _{1,4,5}	S	S				S	S				S			S			
XIII	V _{5,?}	S														S		
XV	V _{4,5}	S										S						
XVI	V _{1,2,3,4,5}	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S			
XVII	V _{1,2,5}	S	S					S		S			S					
XXI	V _?																	
XXII	V _{5,6}	S				S												
XXIII	V _{1,2,4,5}	S	S	S		S	S	S	S			S	S		S			
XXIV	V _{2,4,5}	S							S	S		S						
XXV ou XXXI	V _{2,5,6} ou V _{2,5,6,9}	S				S				S							*	

S - Suscetível. Os espaços em branco correspondem a reação de resistência do hospedeiro. * - Falta confirmar a caracterização, pois apenas a raça XXXI infecta o diferenciador H 419/20, que não foi utilizado no trabalho de Cardoso (1986).

2.4-ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise da segregação fenotípica das plantas foi realizada por meio do teste Qui-quadrado (χ^2), utilizando o programa GQMOL (Cruz, 2007). As diferentes proporções fenotípicas foram analisadas, para um gene (3:1), dois genes (15:1 e 13:3) e três genes (63:1, 61:3, 55:9, 37:27, 57:7, 51:13, 49:15 e 43:21), procurando-se detectar aquela que melhor explicasse as frequências de classes fenotípicas observadas.

As inoculações para a observação das segregações das populações foram realizadas em períodos diferentes, sendo as repetições constituídas de cada período. A unidade amostral foi constituída de 16 discos de folha para cada planta das populações. Para as plantas originadas da autofecundação controlada do Híbrido de Timor UFV 443-3 foi realizada uma repetição. Para a população F₂ originada do F₁ H 511-1 foram realizadas três repetições. O mesmo número de repetições realizados para a população F₂ originado do F₁ H 484-1. Foi dois o número de repetições realizados para a população de retrocruzamento suscetível, enquanto para o retrocruzamento resistente foi realizada uma repetição.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

A raça II e o patótipo 001 de *H. vastatrix* foram inoculados nos diferenciadores de raças mantidos pelo BioCafé/UFV (Quadro 1), com o objetivo de caracterizar as raças fisiológicas utilizadas no experimento. Os resultados obtidos confirmaram a raça II (v5) caracterizada por Cardoso (1986) como II, pelos sinais apresentados no diferenciador do grupo fisiológico E (S_{H5}) e a ausência de sinais nos diferenciadores dos outros grupos fisiológicos. O patótipo 001, embora também caracterizado como raça II, infectou os cultivares Oeiras e Icatú Vermelho. A raça II caracterizada por Cardoso (1986) não infecta esses cultivares. Esses resultados indicam que o patótipo 001 apresenta um ou mais genes de virulência não detectado(s) pelos diferenciadores de raças do BioCafé/UFV. Como estes genótipos, lançados como resistentes à raça II de *H. vastatrix*, apresentam outro(s) gene(s) diferente(s) do S_{H5} correspondente ao gene de virulência v5 da raça II, é possível que este isolado seja uma raça nova de *H. vastatrix*. A confirmação dessa hipótese necessita de estudos complementares e, portanto, este isolado foi denominado de patótipo.

A possibilidade da existência de novas raças de *H. vastatrix* coletadas de derivados de Híbrido de Timor (HDT) tem sido relatada por pesquisadores do CIFIC - Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro. Nos últimos anos, amostras coletadas de derivados de HDT, como Catimor, Sarchimor e no cultivar Colômbia, tem sido caracterizadas incorretamente como raça II (v5) (Várzea & Marques, 2005). Os mesmos autores afirmam que após a caracterização inicial de 12 isolados como raça II, coletados do cultivar Colômbia (S_H6), originado do HDT 1343, inoculações adicionais confirmaram que esses isolados apresentavam outros genes de virulência (v5,? ou v5,7,? ou v5,7,9,?).

Portanto, o patótipo 001, embora caracterizado como raça II pela série diferenciadora de raças do BioCafé/UFV, pode apresentar gene(s) de virulência adicional(is) (v5,?).

3.1-INOCULAÇÕES COM A RAÇA II

Antes de iniciar o estudo de herança, o Híbrido de Timor UFV 443-3 e as 50 plantas derivadas da sua autofecundação controlada foram inoculadas com a raça II de *H. vastatrix*. Todas as plantas foram resistentes (Tabela 2), o Híbrido de Timor apresentou notas entre 1 e 2, enquanto as 50 plantas da autofecundação do Híbrido de Timor UFV 443-3, entre 1 e 3. Estes resultados sugerem a possibilidade de que os genes de resistência existentes neste genótipo podem estar em homozigose, portanto, nos testes de segregação do estudo de herança realizados considerou-se a hipótese de homozigose dos locos do progenitor resistente.

Os progenitores femininos Catuaí Amarelo UFV 2148-57 e Mundo Novo UFV 2164-193 mostraram-se susceptíveis quando inoculados com a raça II de *H. vastatrix*, apresentando pústulas com notas entre 5 e 6. Ambas as plantas F₁ avaliadas, H 511-1 e H 484-1, foram resistentes apresentando notas entre 1 e 2 (Tabelas 2 e 5).

Para o cruzamento da fonte de resistência Híbrido de Timor UFV 443-3 com Catuaí Amarelo UFV 2148-57 foram avaliadas as reações da raça II de *H. vastatrix* nas plantas das gerações F₂ e retrocruzamentos resistente e suscetível (Tabelas 2 e 3).

Os híbridos F₁ e as 87 plantas do retrocruzamento resistente foram resistentes a raça II ($\chi^2=0,0$; P=100%; Tabela 2). Esses resultados demonstram que um ou mais genes de resistência existentes no Híbrido de Timor UFV 443-3 são dominantes.

Na geração F₂, um total de 246 plantas foi analisado, sendo observada resistência em 235 (95,5%) e susceptibilidade em 11 plantas (4,5%) (Tabela 4). Na Tabela 3 encontram-se os testes das segregações, considerando diferentes proporções fenotípicas para um, dois e três genes. Os resultados obtidos pelo teste qui-quadrado sugerem duas interpretações. Na primeira, a resistência é governada por três genes, sendo dois dominantes e um recessivo, independentes, demonstrados pela segregação de 61:3 ($\chi^2=0,02$; P=87,27%). E na segunda, a resistência é governada por dois genes dominantes e independentes, indicado pelo padrão de segregação de 15:1 ($\chi^2=1,33$; P=24,92%). Inicialmente acreditou-se que a segregação de 61:3 seria a mais adequada, uma vez que, esta proporção foi mais significativa pelo teste qui-quadrado (Tabela 3).

Para confirmar esses resultados, foi analisada a população de retrocruzamento suscetível. Nesta população foi inoculado um total de 115 plantas, sendo observada a reação de resistência em 80 plantas (69,6%) e susceptibilidade em 35 (30,4%). Foram testadas duas proporções fenotípicas 3:1 (3 plantas resistentes para 1 suscetível), esperado para dois genes dominantes e independentes; e 7:1 esperado para três genes, dois dominantes e um recessivo, independentes. Foi observada uma segregação de 3:1 ($\chi^2=1,81$; P=17,83%; Tabela 2), enquanto a outra hipótese (7:1) foi rejeitada (Tabela 2). Esses resultados demonstram que a segregação observada na população F₂ adequada seria de 15:1 e não 61:3 como poderia ser considerado ao analisar apenas a segregação observada na geração F₂. Portanto, a análise genética, que incluiu as populações F₂, de RC_S e RC_R, além dos progenitores e da planta F₁, demonstrou que os genes presentes no Híbrido de Timor UFV 443-3 são dominantes e homozigotos, e que dois genes dominantes e independentes que conferem resistência à raça II de *H. vastatrix*.

Para a outra população originada do cruzamento do Híbrido de Timor UFV 443-3 com Mundo Novo UFV 2164-193, um total de 240 plantas F₂ foi inoculado com a raça II de *H. vastatrix*. A resistência foi observada em 228 indivíduos (95%), enquanto 12 (5%) foram suscetíveis. Com esse resultado, as segregações de 61:3 ($\chi^2=0,05$; P=81,88%) e 15:1 ($\chi^2=0,64$, P=42,37%) foram aceitas (Tabela 5). Nesta população não foram realizadas inoculações nos retrocruzamentos resistente e suscetível.

Tabela 2: Segregação de resistência e suscetibilidade à raça II de *H. vastatrix*, nas populações provenientes do cruzamento entre Catuaí Amarelo UFV 2148-57 e o Híbrido de Timor UFV 443-3.

População	Raça II						χ^2	Probabilidade (%)
	Nº. Plantas		Proporção Observada		Proporção Esperada			
	R	S	R	S	R	S		
UFV 443-3	1	0	1	0	1	0	-	-
UFV 443-3 □	50	0	1	0	1	0	-	-
UFV 2148-57	0	1	0	1	0	1	-	-
F ₁ H511-1	1	0	1	0	1	0	-	-
RC _R ^a	87	0	1	0	1	0	0,00	100,00
F ₂ (H 511-1)	235	11	64,0	3	61 ^c	3	0,02	87,27
RC _S ^b	80	35	2,3	1	7 ^c	1	33,82	0,00
F ₂ (H 511-1)	235	11	21,4	1	15 ^d	1	1,33	24,92
RC _S ^b	80	35	2,3	1	3 ^d	1	1,81	17,83

^a - Retrocruzamento resistente; ^b - Retrocruzamento suscetível; ^c - Hipótese de segregação de três genes (61:3 na geração F₂ e 7:1 no RC_S). ^d - Hipótese de segregação para dois genes (15:1 na geração F₂ e 3:1 no RC_S). **R** - Plantas resistentes, **S** - Suscetíveis, χ^2 - Valor de qui-quadrado.

Tabela 3: Teste de proporções fenotípicas em progênie F₂ de cafeeiros derivados da autofecundação controlada do F₁ H 511-1 (Catuaí Amarelo UFV 2148-57 x Híbrido de Timor UFV443-3), inoculadas com isolado monopustular da raça II de *H. vastatrix*.

Proporções Testadas		Nº. Plantas Observado		Nº. Plantas Esperado		χ^2	Probabilidade (%)
R	S	R	S	R	S		
3	1			185	61	55,29	0,00
15	1			231	15	1,33	24,92
13	3			200	46	32,92	0,00
63	1			242	4	13,53	0,02
61	3			234	12	0,02	87,27
55	9	235	11	211	35	18,72	0,00
37	27			142	104	143,47	0,00
57	7			219	27	10,56	0,11
51	13			196	50	38,13	0,00
49	15			188	58	49,31	0,00
43	21			165	81	89,62	0,00

R - Plantas resistentes, **S** - Suscetíveis, χ^2 - Valor de qui-quadrado.

Tabela 4: Plantas F₂ resistentes e suscetíveis à raça II de *Hemileia vastatrix*. **R** - Planta sem sinais do patógeno. **S** - Com sinais do patógeno. * - Plantas suscetíveis também quando inoculados com o patótipo 001. **R. II** - Raça II de *H. vastatrix*.

F ₂	R. II	F ₂	R. II	F ₂	R. II	F ₂	R. II	F ₂	R. II	F ₂	R. II
1	R	42	R	83	R	124	R	165	R	206	R
2	R	43	R	84	R	125	R	166	R	207	R
3	R	44	R	85	R	126	R	167	R	208	R
4	R	45	R	86	R	127	R	168*	S	209	R
5	R	46	R	87	R	128	R	169	R	210	R
6	R	47	R	88	R	129	R	170	R	211*	S
7	R	48	R	89	R	130	R	171	R	212	R
8	R	49	R	90	R	131	R	172	R	213	R
9	R	50	R	91	R	132	R	173	R	214	R
10	R	51	R	92	R	133	R	174	R	215	R
11	R	52	R	93	R	134	R	175	R	216	R
12	R	53	R	94	R	135	R	176	R	217	R
13	R	54	R	95	R	136	R	177	R	218	R
14	R	55	R	96	R	137	R	178	R	219	R
15	R	56*	S	97	R	138	R	179	R	220	R
16	R	57	R	98*	S	139	R	180	R	221	R
17	R	58	R	99	R	140	R	181	R	222	R
18	R	59	R	100	R	141	R	182	R	223	R
19	R	60	R	101	R	142	R	183	S	224	R
20	R	61	R	102	R	143	R	184	R	225	R
21	R	62	R	103	R	144	R	185	R	226	R
22	R	63	R	104	R	145	R	186	R	227	R
23	R	64	R	105	S	146	R	187	R	228	R
24	R	65	R	106	R	147	R	188	R	229	R
25	R	66*	S	107	R	148	R	189	R	230	R
26	R	67	R	108	R	149	R	190	R	231	R
27	R	68	R	109	R	150	R	191	R	232	R
28	R	69	R	110	R	151	R	192	R	233	R
29	R	70	R	111	R	152	R	193	R	234	R
30	R	71	R	112	R	153	R	194	R	235	R
31	R	72	R	113	R	154*	S	195	R	236	R
32	R	73	R	114	R	155	R	196	R	237	R
33	R	74	R	115	R	156	R	197	R	238	R
34	R	75	R	116	R	157	R	198	R	239	R
35	R	76	R	117	R	158	R	199	R	240	R
36	R	77	R	118	R	159*	S	200	R	241	R
37	R	78	R	119	R	160	R	201	R	242	R
38	R	79	R	120*	S	161	R	202	R	243	R
39*	S	80	R	121	R	162	R	203	R	244	R
40	R	81	R	122	R	163	R	204	R	245	R
41	R	82	R	123	R	164	R	205	R	246	R

Tabela 5: Segregação de resistência e suscetibilidade das populações de cafeeiros provenientes do cruzamento entre Mundo novo 2164-193 e o Híbrido de Timor UFV 443-3, inoculados com a raça II de *H. vastatrix*.

População	Raça II						χ^2	Probabilidade (%)
	Nº. Plantas		Proporção Observada		Proporção Esperada			
	R	S	R	S	R	S		
UFV 2164-193	0	1	0	1	0	1	-	-
F ₁ H 484-1	1	0	1	0	1	0	-	-
F ₂ (H 484-1) ^a	228	12	57	3	61	3	0,05	81,88
F ₂ (H 484-1) ^b	228	12	19	1	15	1	0,64	42,37

^a - Hipótese de segregação de três genes (61:3 na geração F₂). ^b - Hipótese de segregação para dois genes (15:1 na geração F₂). **R** - Plantas resistentes, **S** - Suscetíveis, χ^2 - Valor de qui-quadrado.

3.2-INOCULAÇÕES COM O PATÓTIPO 001

Analisando as reações das plantas provenientes da autofecundação do Híbrido de Timor UFV 443-3 inoculadas com o patótipo 001 de *H. vastatrix*, foram observados, para este isolado, que os genes de resistência deste progenitor também estão em homozigose. O genótipo Catuaí Amarelo UFV 2148-57 mostrou-se suscetível e o Híbrido de Timor resistente.

A natureza da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 foi determinada após a análise de segregação fenotípica das plantas das populações F₂ provenientes de autofecundação controlada do F₁ H 511-1, e respectivos retrocruzamentos, derivados de cruzamentos com o Híbrido de Timor UFV 443-3 e o Catuaí Amarelo UFV 2148-57. A planta F₁ H 511-1 avaliada foi resistente, apresentando notas entre 1 e 2 (Tabela 6).

Como as 87 plantas do retrocruzamento resistente (F₁ H 511-1 x Híbrido de Timor UFV 443-3) não apresentaram sinais do patógeno ($\chi^2=0,0$; P=100%; Tabela 6), é possível sugerir que os genes que conferem reação de resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 ao patótipo 001 de *H. vastatrix* são dominantes.

Tabela 6: Segregação de resistência e suscetibilidade ao isolado monopustular do patótipo 001 de *H. vastatrix*, nas populações provenientes do cruzamento entre Catuaí Amarelo UFV 2148-57 e o Híbrido de Timor UFV443-3.

População	Patótipo 001						χ^2	Probabilidade (%)
	Nº. Plantas		Proporção Observada		Proporção Esperada			
	R	S	R	S	R	S		
UFV 443-3	1	0	1	0	1	0	-	-
UFV 443-3 □	50	0	1	0	1	0	-	-
UFV 2148-57	0	1	0	1	0	1	-	-
F ₁ H 511-1	1	0	1	0	1	0	-	-
RC _R ^a	87	0	1	0	1	0	0,00	100,00
F ₂ (H 511-1)	231	15	15,4	1	15 ^c	1	0,01	92,13
RC _S ^b	85	30	2,8	1	3 ^c	1	0,07	78,78
F ₂ (H 511-1)	231	15	46,2	3	61 ^d	3	1,09	29,54
RC _S ^b	85	30	2,8	1	7 ^d	1	19,41	0,00

^a - Retrocruzamento resistente; ^b - Retrocruzamento suscetível; ^c - Hipótese de segregação para dois genes (15:1 na geração F₂ e 3:1 no RC_S); ^d - Hipótese de segregação de três genes (61:3 na geração F₂ e 7:1 no RC_S); **R** - Plantas Resistentes; **S** - Suscetíveis; χ^2 - Valor de qui-quadrado.

As 246 plantas F₂, originadas da autofecundação do F₁ H 511-1, foram inoculadas com o patótipo 001 de *H. vastatrix* e 231 foram resistentes (93,9%), enquanto 15 foram suscetíveis (6,1%) (Tabela 7). Com esses resultados, duas segregações fenotípicas, também, foram significativas, 15:1 e 61:3 (Tabela 8). Para o padrão de segregação de 15:1 foi obtido um valor de qui-quadrado muito baixo ($\chi^2=0,01$), ou seja, existe uma pequena diferença entre os dados esperados e os observados, com uma probabilidade (P=92,13%) bem superior da obtida para a razão de 61:3. Para o padrão de segregação de 61:3 obteve-se um valor de qui-quadrado (χ^2) de 1,09 com uma probabilidade de 29,54% (Tabela 8).

Tabela 7: Plantas F₂ resistentes e suscetíveis ao patótipo 001 de *Hemileia vastatrix*. **R** - Planta sem sinais do patógeno. **S** - Com sinais do patógeno. * - Plantas suscetíveis também quando inoculados com a raça II de *H. vastatrix*. **Pat. 1** - Patótipo 001 de *H. vastatrix*.

F ₂	Pat. 1	F ₂	Pat. 1	F ₂	Pat. 1	F ₂	Pat. 1	F ₂	Pat. 1	F ₂	Pat. 1
1	R	42	R	83	R	124	R	165	R	206	R
2	R	43	R	84	R	125	R	166	R	207	R
3	R	44	R	85	R	126	R	167	R	208	R
4	R	45	R	86	R	127	R	168*	S	209	R
5	R	46	R	87	R	128	R	169	R	210	R
6	R	47	R	88	R	129	R	170	R	211*	S
7	R	48	R	89	R	130	R	171	R	212	R
8	R	49	R	90	R	131	R	172	R	213	R
9	R	50	R	91	S	132	R	173	R	214	R
10	R	51	S	92	R	133	R	174	R	215	R
11	R	52	R	93	R	134	R	175	R	216	R
12	S	53	R	94	R	135	R	176	R	217	R
13	R	54	R	95	R	136	R	177	R	218	R
14	R	55	R	96	R	137	R	178	R	219	R
15	R	56*	S	97	R	138	R	179	R	220	R
16	R	57	R	98*	S	139	R	180	R	221	R
17	R	58	R	99	R	140	R	181	R	222	R
18	R	59	R	100	R	141	R	182	R	223	R
19	R	60	R	101	R	142	R	183	R	224	R
20	R	61	R	102	R	143	R	184	R	225	R
21	R	62	R	103	R	144	R	185	R	226	R
22	S	63	R	104	R	145	R	186	R	227	R
23	R	64	R	105	R	146	R	187	R	228	R
24	R	65	R	106	R	147	R	188	R	229	R
25	R	66*	S	107	R	148	R	189	R	230	R
26	R	67	R	108	R	149	R	190	R	231	S
27	R	68	R	109	R	150	R	191	R	232	R
28	R	69	R	110	R	151	R	192	R	233	R
29	R	70	R	111	R	152	R	193	R	234	R
30	R	71	R	112	R	153	R	194	R	235	R
31	R	72	R	113	R	154*	S	195	R	236	R
32	R	73	R	114	R	155	R	196	R	237	R
33	R	74	R	115	R	156	R	197	R	238	R
34	R	75	R	116	R	157	R	198	R	239	R
35	R	76	R	117	R	158	R	199	S	240	R
36	R	77	R	118	R	159*	S	200	R	241	R
37	R	78	R	119	R	160	R	201	R	242	R
38	R	79	R	120*	S	161	R	202	R	243	R
39*	S	80	R	121	R	162	R	203	R	244	R
40	R	81	R	122	R	163	R	204	R	245	R
41	R	82	R	123	R	164	R	205	R	246	R

Tabela 8: Proporções fenotípicas em progênie F₂ de cafeeiros derivados da autofecundação controlada do F₁ H 511-1 (Catuaí Amarelo UFV 2148-57 x Híbrido de Timor UFV443-3), inoculados com o isolado monopustular patótipo 001 de *H. vastatrix*.

Proporções Testadas		Nº. Plantas Observado		Nº. Plantas Esperado		χ^2	Probabilidade (%)
R	S	R	S	R	S		
3	1			185	62	46,88	0,00
15	1			231	15	0,01	92,13
13	3			200	46	25,85	0,00
9	7			138	108	141,72	0,00
63	1			242	4	32,89	0,00
61	3	231	15	234	12	1,09	29,54
55	9			211	35	12,91	0,03
37	27			142	104	131,37	0,00
57	7			219	27	30,71	0,00
51	13			196	50	41,22	0,00
49	15			188	58	79,64	0,00
43	21			165	81	46,88	0,00

R - Plantas resistentes, **S** - Suscetíveis, χ^2 - Valor de qui-quadrado.

As plantas do retrocruzamento suscetível foram inoculadas para confirmar os resultados. Nesta população foi observada uma segregação de 3:1 ($\chi^2=0,07$; $P=78,78\%$; Tabela 6), esperado para dois genes governando a reação de resistência. A segregação 7:1, esperada para três genes, foi rejeitada (Tabela 6). Estes resultados confirmam os resultados obtidos na inoculação da população F₂, demonstrando que a segregação 15:1 é mais adequada. Dessa forma, e com base nos dados obtidos, é possível inferir que existem dois genes dominantes e independentes controlando a reação de resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 ao patótipo 001 de *H. vastatrix*.

4-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, J.C., CAIXETA, E.T., CAPUCHO, A.S., KOEHLER, A., MAIA, T.A., SAKIYAMA, N.S. & ZAMBOLIM, L. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 440-22 à raça II de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. pp. s123 In: XXXVIII Congresso de Fitopatologia, Brasília (Resumos). 2005.
- BARBOSA, J.C., CAIXETA, E.T., KOEHLER, A., MAIA, T., CAPUCHO, A.S., ZAMBOLIM, L., SAKIYAMA, N. S. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 440-22 à raça II de *Hemileia vastatrix*. In: Anais do XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília (Resumos). 2004.
- BETTENCOURT, A.J. Melhoramento genético do cafeeiro: transferência de factores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L. *Doctor Scientiae*, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Lisboa, Portugal. 1981.
- BETTENCOURT, A.J. Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timor'. Instituto Agrônomo de Campinas, Circular nº 23:20p. 1973.
- BETTENCOURT, A.J. & NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Agronomia Lusitana* 31:285-292. 1971.
- BETTENCOURT, A.J. & CARVALHO, A. Melhoramento visando à resistência do cafeeiro à ferrugem. *Bragantia* 27:35-68. 1968.
- BRITO, G.G. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. *Doctor Scientiae*, Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2007.
- BRITO, G.G., GALLINA, A.P., CAIXETA, E.T., ZAMBOLIM, E.M., ZAMBOLIM, L., ALMEIDA, R.M., DIOLA, V., SAKIYAMA, N. & LOUREIRO, M.E. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do Híbrido de Timor à *Hemileia vastatrix*. pp. CD ROM In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Águas de Lindóia (Resumos). 2007.
- CAIXETA, E.T., RUFINO, R.J.N., OLIVEIRA, A.C.B., SAKIYAMA, N.S., ZAMBOLIM, E.M. & ZAMBOLIM, L. Caracterização da resistência genética do Híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro. pp. 226-226 In: III Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Porto Seguro (Resumos). 2003.
- CARDOSO, R.M.L. Novas raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no Brasil, métodos de identificação, e detecção de grupos fisiológicos em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. *Magister Scientiae*, Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1986.
- CARVALHO, A., FAZUOLI, L.C. & COSTA, W.M. Melhoramento do cafeeiro: XLI. Produtividade do Híbrido de Timor, de seus derivados e de outras fontes de resistência a *Hemileia vastatrix*. *Bragantia* 48:73-86. 1989.
- CHAVES, M.S. & BARCELLOS, A.L. Especialização fisiológica de *Puccinia tritici* no Brasil em 2002. *Fitopatologia Brasileira* 31:57-62. 2006.
- CRUZ, C.D. Programa GQMOL - Genética Quantitativa e Molecular. 2007. www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm.

- FALEIRO, F.G. Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência do feijoeiro. *Magister Scientiae*, Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1997.
- FAZUOLI, L.C., MEDINA FILHO, H.P., GONÇALVES, W., GUERREIRO, FILHO, O. & SILVAROLLA, M.B. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agronômico de Campinas. pp.163-215 In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2002.
- FLOR, H.H. Host-parasite interaction in flax-rust, its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:680-685. 1955.
- JUNGHANS, D.T. Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores moleculares RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis*. *Doctor Scientiae*, Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001.
- KOLMER, J.A., LONG, D.L. & HUGHES, M.E. Physiologic Specialization of *Puccinia Triticina* on Wheat in the United States in 2005. *Plant Disease* 91:979-984. 2007.
- KUKHANG, T.D., MAWARDI, S. & ESKES, A.B. Studies on the inheritance of the S_{H3} resistance factor to coffee leaf rust. pp. 776-778 In: Colloque Scientifique International sur le Café. ASIC, v. 2, Montpellier, França (Resumos). 1993.
- MAYNE, W.W. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Nature* 129:510. 1932.
- MAYNE, W.W. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. The Mysore Coffee Experiment Station. Bulletin n° 13:28pp. 1935.
- MAYNE, W.W. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. The Mysore Coffee Experiment Station. Bulletin n° 14:21pp. 1936.
- MAYNE, W.W. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. The Mysore Coffee Experiment Station. Bulletin n° 13:28pp. 1939.
- MAYNE, W.W. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. The Mysore Coffee Experiment Station. Bulletin n° 24:1942.
- NORONHA-WAGNER, M. & BETTENCOURT, A.J. Genetic study of resistance of *Coffea* sp. to leaf rust-Identification and behaviour of four factor conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal of Botany* 45:2021-2031. 1967.
- OLIVEIRA, A.C.B., SAKIYAMA, N.S., CAIXETA, E.T., CAPUCHO, A.S., RUFINO, R. Análise genética da resistência de cafeeiros derivados do Híbrido de Timor à raça II de *Hemileia vastatrix*. In: Anais do 30º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, São Loureiro (Resumos). 2004.
- PEREIRA, A.A. Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. *Doctor Scientiae*, Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1995.

- PEREIRA, A.A., SAKIYAMA, N.S., ZAMBOLIM, L., MOURA, W.M., ZAMBOLIM, E.M. & CAIXETA, E.T. Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust in the UFV/EPAMIG breeding program. pp.215-232 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VARZEA, V.M.P. (Eds.) Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- RODRIGUES Jr., C.J. & BETTENCOURT, A.J. Routine screening for resistance to *Hemileia vastatrix* B. et Br. on *Coffea arabica* L. accessions from different coffee producing regions of the world. Prog. Rept., 1960-1965, Oeiras, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro 47-99. 1965.
- SERA, T., SERA, G.H., ITO, D.S. & DOI, D.S. Coffee breeding for durable resistance to leaf rust disease at Instituto Agrônômico do Paraná. pp.187-214 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VARZEA, V.M.P. (Eds.) Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- TAMAYO, P.J., VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. & PEREIRA, A.A. Resistência do Catimor à ferrugem e virulência de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Fitopatologia Brasileira 20:572-576. 1995.
- TEDESCO, N.S., SAKIYAMA, N.S., ZAMBOLIM, L., TEIXEIRA-CABRAL, T. & PEREIRA, A.A. Marcadores OPF-151280 e OPC-091120 ligados ao gene de resistência à Ferrugem do Cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). pp. 569-571 In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, MG (Resumos). 2000.
- VÁRZEA, V.M.P. & MARQUES, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. pp.53-74 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VÁRZEA, V.M.P. (Eds.) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- VÁRZEA, V.M.P., RODRIGUES, C.J., SILVA, M.C.M.L., GOUVEIA, M., MARQUES, D.V., GUERRA-GUIMARÃES, L. & RIBEIRO, A. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. pp.297-320 In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2002.
- VÁRZEA, V.M.P., RODRIGUES JR., C.J., SILVA, M.C., MARQUES, D.V., MORENO, G., CASTILLO, J., ALVARADO, G., RAMACHAN-DRAN, M., MAIDU, R. & BHAT, S.S. Pathotypes of *Hemileia vastatrix* with ability to break the resistance of improved commercial coffee varieties. pp. A127 In: International Conference on Coffee Science, Trieste (Resumos). 2001.
- ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M., VALE, F.X.R, PEREIRA, A.A., SAKIYAMA, N.S., CAIXETA, E.T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in Brazil. pp.75-115 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VARZEA, V.M.P. (Eds.) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R.D., PEREIRA, A.A. & CHAVES, G.M. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. pp.134-215 In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) Produção de café com qualidade. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 1999.
- ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseolityca* Arth. Experientiae 151-184. 1974.

CAPÍTULO 2 - MAPEAMENTO DE QTLs DO HÍBRIDO DE TIMOR
ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA A *H. vastatrix*

1-INTRODUÇÃO

A resistência do cafeeiro à *H. vastatrix* tem sido atribuída a nove genes dominantes (S_H1 a S_H9), simples ou em associação. Os genes S_H1, S_H2, S_H4 e S_H5, foram caracterizados em *C. arabica* (Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Bettencourt & Carvalho, 1968; Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967). O gene S_H3, supostamente derivado de seleções de *C. liberica* (Bettencourt & Rodrigues, 1988; Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Wagner & Bettencourt, 1965). Os genes S_H6, S_H7, S_H8 e S_H9 foram identificados em derivados do Híbrido do Timor (Bettencourt *et al.*, 1992; Bettencourt *et al.*, 1980) e em outros híbridos interespecíficos tetraplóides (Bettencourt & Rodrigues, 1988; Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). A existência de outros genes de resistência em derivados do Híbrido de Timor e em outros híbridos interespecíficos tem sido confirmada pela suplantação de resistência de alguns desses cafeeiros em relação a novas raças de *H. vastatrix* (Rodrigues *et al.*, 2000). Além disso, alguns autores têm referido a possível existência de outros genes menores conferindo resistência incompleta em derivados do Híbrido de Timor (Eskes *et al.*, 1990, 1983).

Apenas os genes maiores identificados em cafeeiros têm sido utilizados em programas de melhoramento visando a obtenção de genótipos resistentes à *H. vastatrix*. Embora a base genética da resistência duradoura em plantas não seja ainda bem compreendida (Johnson, 1981), frequentemente ela tem sido atribuída a genes menores. Enquanto essa questão não é esclarecida a combinação da resistência vertical com a horizontal pode resultar na resistência durável.

A resistência vertical é específica a certas raças do patógeno, completa e é considerada como oligogênica ou monogênica (qualitativa), por ser condicionada por um ou poucos genes de efeito maior (Van der Plank, 1963). A resistência horizontal, também conhecida como resistência quantitativa, atua sobre todas as raças do patógeno em maior ou menor grau e pode se manifestar em diferentes etapas da patogênese. A sua característica marcante é a existência de um nível gradual de resistência no hospedeiro que pode variar 0 a 100% quanto à intensidade de doença (Parlevliet, 1979). Este tipo de resistência é influenciado por inúmeros fatores ambientais e pode ser governada por vários genes de efeito menores (Van der Plank, 1963).

Uma das alternativas para combinar diferentes genes de resistência de efeito maior (resistência vertical) e menor (resistência horizontal) em genótipos comerciais seria a piramidação de genes. Piramidação pode ser definido como o acúmulo ou

introgressão de vários genes em um cultivar (Milach & Cruz, 1997). Entretanto, acumular genes em um mesmo genótipo é uma tarefa difícil de ser realizada pelos métodos tradicionais de melhoramento.

Uma ferramenta eficiente e que pode auxiliar a piramidação de genes, além de outras estratégias de melhoramento genético visando resistência a doenças, é o uso de marcadores moleculares. Esses marcadores poderiam ser utilizados nos programas de melhoramento para a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), a qual possibilita inferir de forma rápida e eficiente a presença dos genes de resistência pela presença de marcadores moleculares nas progênies (Borém & Caixeta, 2006; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Outra vantagem é que os marcadores não são influenciados pelo ambiente. A seleção poderá ser realizada precocemente, diminuindo os esforços e custos com as avaliações de populações cafeeiras, além de reduzir o tamanho das populações a cada geração e, conseqüentemente, o tempo necessário para a obtenção de genótipos de cafeeiros resistentes a *H. vastatrix*.

Nesse contexto, é preciso, primeiramente, identificar marcadores moleculares ligados aos genes maiores e menores associados a resistência à *H. vastatrix*. Isso pode ser realizado detectando e mapeando QTLs (*Quantitative Trait Loci*) para a resistência a esse patógeno. A identificação de locos ligados a características quantitativas é uma estratégia importante para conhecer melhor a genética de uma espécie. Por meio de marcadores moleculares pode-se mapear QTLs e entender o número, a localização no genoma, efeito dos genes de resistência a doenças e a interação entre eles. Esses conhecimentos poderiam facilitar os melhoristas na busca para resistência a doenças.

Diversos tipos de marcadores podem ser utilizados, destacando-se entre eles os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*). Os SSR são altamente polimórficos, co-dominantes e são distribuídas de maneira aleatória em genomas de organismos eucariotos (Caixeta *et al.*, 2006). Tomadas em conjunto, essas características favorecem a utilização desse marcador em estudos de mapeamento, principalmente no caso de *C. arabica* que apresenta base genética muito estreita (Maluf *et al.*, 2005; Pearl *et al.*, 2004; Carvalho & Fazuoli, 1993; Berthaud & Charrier, 1988).

Em espécies do gênero *Coffea*, poucos são os trabalhos que mapearam marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à *H. vastatrix* (Brito, 2007; Prakash *et al.*, 2004). O trabalho de Prakash *et al.* (2004) foi realizado em uma população F₂ oriunda de *C. liberica*, constituída de 101 plantas e portadora do gene de resistência S_{H3}. Os autores mapearam 21 marcas AFLP ligadas a este gene de

resistência. Brito (2007) trabalhando com 160 plantas F_2 , tendo como um dos progenitores o Híbrido de Timor 427-15, mapeou marcas AFLP ligadas a um gene de resistência à raça II de *H. vastatrix*.

A partir de *primers* microsatélites disponíveis na literatura e outros desenvolvidos no BioCafé/UFV, objetivou-se mapear Locos de Característica Quantitativa (QTLs) associados à resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 a *H. vastatrix*.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-MATERIAL GENÉTICO E AVALIAÇÃO DA DOENÇA

Para a identificação de QTLs associados a resistência do cafeeiro a *H. vastatrix*, o Híbrido de Timor UFV 443-3, resistente, foi utilizado como progenitor masculino no cruzamento com o genótipo suscetível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57). A planta F_1 H 511-1 foi autofecundada para obtenção da geração F_2 constituída de 246 plantas.

Os progenitores e as plantas da geração F_2 foram inoculados com a raça II e o patótipo 001 de *H. vastatrix*. A metodologia de inoculação utilizada foi a de disco de folhas (Tamayo *et al.*, 1995). Após a inoculação, os discos foram atomizados com água destilada. Gerbox contendo os discos das populações foram mantidos na ausência de luz durante 48 horas a 22°C e, em seguida, transferidos para uma câmara com condições controladas de temperatura e luz (22°C, 12 horas de luz). Os discos inoculados foram limpos com o auxílio de algodão 48 a 72 horas após a inoculação.

A avaliação da doença foi iniciada após cumprir o período latente do controle positivo (progenitor suscetível) de acordo com uma escala de notas (Tamayo *et al.*, 1995). A severidade da doença foi estimada com o auxílio desta escala de notas que variou de 1 a 6. Nota 1: ausência de sintomas; nota 2: lesões cloróticas pequenas; nota 3: lesões cloróticas grandes, sem esporulação; nota 4: lesões cloróticas grandes com pequena esporulação, ocupando menos de 25% da área da lesão com uredosporos; nota 5: lesões com esporulação ocupando de 25 a 50% de sua área e nota 6: lesões com esporulação ocupando mais de 50% de sua área.

2.2-EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA

Foi realizada a extração do DNA genômico dos progenitores, Híbrido de Timor UFV 443-3 e Catuaí Amarelo UFV 2148-57, da planta F₁ H 511-1 e das 246 plantas da população F₂.

A extração de DNA seguiu a metodologia descrita por Diniz *et al.* (2005), com adaptações. Dois tampões foram preparados, o primeiro denominado tampão de lise (Sorbitol 0,35 M, Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, EDTA 5 mM) e o segundo de extração (NaCl 2 mM, CTAB 2%, Tris-HCl 0,2 M, EDTA 0,05 M). Os dois tampões foram misturados e acrescidos de sarcosil (5%), bissulfito de sódio (1%), carvão ativo (0,1%) e PVP-40 (2%). Após esse preparo, 1,5 mL da solução de extração, pré-aquecido a 65°C, foi adicionado dentro de cada tubo de 2 ml contendo 50 mg de tecido vegetal macerado de cada amostra. A seguir, os tubos foram deixados em banho-maria a 65°C por 40 min. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 18704 g e o sobrenadante transferido para novos tubos, com a adição de 1 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados até completa homogeneização e centrifugados por 5 minutos a 18704 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo com o mesmo volume de isopropanol e mantido por 2 horas a -20°C. Após este período o material foi centrifugado por 20 minutos a 18704 g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70% e 95%. O *pellet* foi tratado com RNase (10 mg/μL) após ser secado e ressuspensionado em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0). O DNA foi precipitado com NaCl, incubado por 2 horas a -20°C recolhido por centrifugação por 20 minutos a 18704 g. O sobrenadante foi descartado e após tratamento com etanol 70% e 95%, foi ressuspensionado em 200 μL de TE. A qualidade e quantidade do DNA foram avaliados em espectrofotômetro. O DNA foi diluído para a concentração de 25 ng/μL e armazenado a -20°C até o uso.

2.3-AMPLIFICAÇÃO DOS PRIMERS

Foram utilizados 282 *primers* SSR, sendo 158 disponibilizados na literatura, 109 desenvolvidos a partir de dados do Projeto Brasileiro do Genoma Café e 15 de biblioteca genômica enriquecida, estes dois últimos desenvolvidos no Laboratório BioCafé/UFV (dados não publicados). Além dos *primers* SSR, foram utilizados quatro *primers* RAPD da *Operon Technologies* (OPA 1, OPA 14, OPA 17 e OPAB 9).

Os *primers* SSR da literatura foram desenvolvidos por meio de bibliotecas genômicas de *C. arabica* cv. Caturra (Moncada & McCouch, 2004; Combes *et al.*, 2000; Rovelli *et al.*, 2000), bibliotecas genômicas de Híbrido de Timor (Baruah *et al.*, 2003), sequências de *C. arabica* e *C. canephora* depositados no *GenBank* (Poncet *et al.*, 2004; Coulibaly *et al.*, 2003), além de ESTs de um híbrido entre *C. canephora* x *C. congensis* (Bhat *et al.*, 2005).

Um total de 286 *primers* SSR e RAPD foi utilizado para amplificar o genoma dos progenitores da população F₂, Híbrido de Timor UFV 443-3 e Catuai Amarelo UFV 2148-57. Todos os *primers* polimórficos entre os progenitores foram utilizados para o estudo de mapeamento de QTLs na população F₂.

A reação de amplificação com os *primers* SSR consistiu de 0,1 µM de cada *primer* SSR (*forward* e *reverse*), 150 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 50 ng de DNA genômico, tampão (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 500 mM), MgCl₂ 1,0 mM, e água milli-Q estéril em quantidade suficiente para completar 20 µL para cada reação. A amplificação foi efetuada em termociclador modelo PTC-200, da *MJ Research*, utilizando o procedimento de *touchdown* PCR. As condições de amplificação foram as mesmas definidas por Rufino *et al.* (2005) e consistiram de dez ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos, reduzindo a temperatura gradualmente de 1°C a cada ciclo, de 66 a 57°C e extensão por 30 segundos a 72°C. Em seguida, foram realizados outros 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A reação foi finalizada com uma extensão de 72°C, por 8 minutos. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata.

Cada reação de amplificação dos *primers* RAPD consistiu de um volume total de 25 µl, contendo os seguintes componentes: 25 ng de DNA genômico, 1 U de Taq DNA polimerase, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 µM de *primer*, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl pH 8,3 e 2 mM de MgCl₂ e o volume final completado com água milli-Q estéril. As condições de amplificação consistiram de desnaturação a 95°C por 1 min, 39 ciclos para amplificação (94°C por 15 segundos, 35°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos) e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos das reações de

amplificação foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

2.4-ANÁLISE ESTATÍSTICA

A determinação da ordem dos marcadores moleculares nos grupos de ligação do mapa genético e suas distâncias foram obtidas com o auxílio do programa GQMOL (Cruz, 2007). O agrupamento dos marcadores foi feito adotando uma frequência de recombinação máxima de 0,40 e um LOD *score* mínimo de 3,0. Os valores obtidos pela frequência de recombinação foram apresentados em centiMorgan (cM).

As marcas com segregação distorcidas foram consideradas na construção do mapa genético, porém, desconsideradas nas análises de identificação de QTLs.

O mesmo programa foi utilizado para detectar os QTLs associados a resistência no Híbrido de Timor UFV 443-3 à raça II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix*. Para isso, dois testes estatísticos foram utilizados, Marca Simples e Intervalo Simples. No primeiro foram utilizados três métodos: Análise de Variância, Análise de Regressão e Máxima Verossimilhança, todos a 5% de probabilidade. Para confirmar os QTLs foi utilizada a análise por Intervalo Simples associado ao Método de Máxima Verossimilhança ($P < 0,05$). Somente foram considerados os QTLs significativos em todos os testes estatísticos.

Para verificar o efeito fenotípico dos QTLs na severidade média da doença, foi realizado um teste de comparação de médias, Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A severidade média da doença para cada planta F₂ foi estimada pela nota média de três repetições utilizando a escala de Tamayo *et al.* (1995). As análises foram realizadas com auxílio do programa ESTAT (UNESP-Jaboticabal, SP).

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-CONSTRUÇÃO DE MAPA GENÉTICO

A primeira etapa para o mapeamento genético foi selecionar marcadores moleculares que apresentaram polimorfismo entre o Híbrido de Timor UFV 443-3 e o Catuaí Amarelo UFV 2148-57. De um total de 286 *primers* avaliados, 21 microssatélites e 4 RAPD foram polimórficos nos progenitores (8,74%). O baixo

polimorfismo obtido pode ser atribuído à base genética estreita de *C. arabica* (Maluf *et al.*, 2005; Pearl *et al.*, 2004; Carvalho & Fazuoli, 1993; Berthaud & Charrier, 1988) e ao fato dos progenitores utilizados nesse estudo serem derivados de uma espécie comum. O Híbrido de Timor apesar de ser um híbrido interespecífico, uma das espécies que o originou é o *C. arabica*. Além disso, tem sido mencionado na literatura que os acessos de Híbrido de Timor estão mais próximos geneticamente de *C. arabica* que a outra espécie de origem, *C. canephora* (Moncada & McCouch, 2004). Estes autores estudaram a diversidade genética de cafeeiros diplóides e tetraplóides com marcadores microssatélites. Seus resultados mostraram que a maior parte dos alelos de dois Híbridos de Timor derivou de *C. arabica*. Uma de suas justificativas foi atribuída a origem interespecífica desse híbrido entre *C. arabica* e *C. canephora* (Bettencourt, 1973; Rodrigues & Bettencourt, 1965), onde um ou mais retrocruzamentos com *C. arabica* podem ter ocorrido, como também sugere Moreno (1989).

Em outro trabalho, Prakash *et al.* (2004) encontraram polimorfismo em 18,75% dos *primers*, utilizando marcador AFLP. A população F₂ utilizada por estes autores é altamente contrastante, pois é proveniente de cruzamento interespecífico, *C. arabica* cultivar Matari e *C. liberica*, o que justifica o maior polimorfismo encontrado em seu trabalho. Oliveira *et al.* (2007), trabalhando com uma população de retrocruzamento derivada de Híbrido de Timor e Catuaí, utilizou marcadores RAPD para construir um mapa genético e observou polimorfismo em 10,58% dos *primers* analisados.

Os 25 *primers* polimórficos foram utilizados para amplificar o genoma de toda a população F₂, constituída de 246 indivíduos (Tabela 1). A segregação dos marcadores moleculares na população foi verificada utilizando o teste qui-quadrado (χ^2) a 5% de probabilidade, com uso da correção de Bonferroni. Esta análise, além de levar em consideração os desvios entre os valores esperados e observados, também é sensível ao número de indivíduos (Cruz & Silva, 2006). Estes autores recomendam utilizar a correção de Bonferroni quando se realizam testes conjuntos para várias marcas. Esta correção estabelece um nível crítico de significância que reduz a probabilidade de rejeição de uma hipótese verdadeira. Assim, evita-se que se cometa o erro estatístico Tipo I, ou seja, rejeitar a razão de segregação observada quando esta é verdadeira. Portanto, para o experimento, a probabilidade após a correção de Bonferroni foi dada pela razão entre a probabilidade individual (5%) e o número de testes, que corresponde as 25 marcas utilizadas. Dessa forma, o valor de probabilidade do experimento com a correção de Bonferroni foi de 0,20%.

Tabela 1: *Primers* SSR e RAPD polimórficos nos progenitores Híbrido de Timor UFV 443-3 e Catuaí Amarelo UFV 2148-57.

Nome	Nº Acesso	Repetição	Tm °C	Tamanho (pb)	Forward primer (5'>3')	Reverse primer (5'>3')	Referência
SSR 8	E8-3CTG	(CA) ₁₄	60-55	198	CACTGGCATTAGAAAGCACC	GGCAAAGTCAATGATGACTC	Rovelli <i>et al.</i> (2000)
SSR 16	AJ250252	(GT) ₄ /(GA) ₄ /(GT) ₄ /(GT) ₆	60-55	140-146	ACCCGAAAGAAAGAACCAAG	CCACACAACCTCTCCTCATTC	Combes <i>et al.</i> (2000)
SSR 18	AJ250254	(CA) ₁₅ (CG) ₄ CA	60-55	132-166	GGCTCGAGATATCTGTTTAG	TTTAATGGGCATAGGGTCC	Combes <i>et al.</i> (2000)
SSR 30	AJ308745	-	60-55	220	ATGGGGCCAACTTGAATATG	CAGGGATCTATCTACTTCTCTTT	Poncet <i>et al.</i> (2004)
SSR 45	AJ308793	-	58	194	CTGAGCGCATGGAAGGAGTA	GGAGACGCAGGTGGTAGAAG	Poncet <i>et al.</i> (2004)
SSR 95	CFGA249	(AG) ₁₃	60-55	352	TAAGAAGCCACGTGACAAGTAAGG	TATGGCCCTTCTCGCTTTAGTT	Moncada (2004)
SSR 100	CFGA465	(AG) ₁₈	60-55	157	ACCCTTTACTACTTATTTACTCTC	ACATCCCCTTGCCATTTCTTC	Moncada (2004)
AC 1	-	-	60-55	180	-	-	não publicado
AT 12	-	(AT) ₇	61-58	108	-	-	não publicado
AT 21	-	(TA) ₇	62-56	109	-	-	não publicado
AT 25	-	(AT) ₆	58-55	139	-	-	não publicado
AAC 12	-	(T) ₁₉ /(TTA) ₂ /(TA) ₂ /(TA) ₂	61	119	-	-	não publicado
AAT 9	-	-	60	155	-	-	não publicado
AAT 10	-	-	60-55	200	-	-	não publicado
CCG 3	-	(CCG) ₅	64-60	100	-	-	não publicado
CCG 5	-	(AATT) ₂ /(CCG) ₆	61-60	101	-	-	não publicado
CCG 15	-	(GGC) ₅ /(GAA) ₇	59-56	259	-	-	não publicado
ACGG 1	-	-	60-55	152	-	-	não publicado
ACTA 13	-	-	60-55	170	-	-	não publicado
Nome	-	-	-	Tamanho (pb)	Seqüência	-	Referência
OPA 1	-	-	-	1450	CAGGCCCTTC	-	Operon Technologies
OPA 14	-	-	-	1300	TCTGTGCTGG	-	Operon Technologies
OPA 17	-	-	-	860	GACCGTTGT	-	Operon Technologies
OPAB 9	-	-	-	1150	GGGCGACTAC	-	Operon Technologies

Na análise da razão de segregação foram observados cinco marcadores microssatélites (SSR) segregando como marcador dominante, CCG 3, SSR 45, SSRCa 23, AT 12 e SSR 100; ou seja, segregaram numa proporção de 3:1. Os outros 16 marcadores SSR segregaram na proporção esperada para marcador co-dominante, razão de 1:2:1 (Tabela 2).

Os marcadores denominados SSRCa 23, SSR 100 e AT 21 apresentaram distorção na razão de segregação esperada, correspondendo a 12% de marcas distorcidas (Tabela 2). Encontram-se na literatura trabalhos com café, em populações F₂, onde foi observada distorção em 24,85% das marcas, utilizando marcadores RAPD (Lashermes *et al.*, 2001) e em 12% com marcadores AFLP (Paillard *et al.*, 1996). Em populações de retrocruzamento, foi encontrado 5,5% dos marcadores RAPD distorcidos (Teixeira-Cabral *et al.*, 2004) e, em outro trabalho, 24,72% dos marcadores RAPD (Oliveira *et al.*, 2007).

Inicialmente foram construídos dois mapas, um contendo apenas as marcas que não apresentaram distorção de segregação e outro contendo todas as marcas, distorcidas e não distorcidas. Como não houve alteração na ordem e distância das marcas, foram utilizadas todas as marcas para a construção do mapa genético (Figura 1). Silva (2006) e Moreira (2004), utilizando marcadores SSRs para localizar QTLs associados a genes de resistência a doenças, também consideraram as marcas que apresentaram distorção de segregação na construção do mapa, pois as mesmas não prejudicaram a ordenação e a ligação dos marcadores que não apresentaram distorção. Estas são as principais influências na precisão do mapeamento genético (Cruz & Silva, 2006; Xian-Liang *et al.*, 2006).

Um total de 23 marcadores formaram seis grupos de ligação, cobrindo uma distância de 277,90 cM do genoma (Figura 1). As marcas SSR 30 e SSR 95 não se ligaram em nenhum dos grupos de ligação formados. As 23 marcas apresentaram-se bem distribuídas, considerando-se o pequeno número de marcadores utilizados.

Tabela 2: Valores de qui-quadrado (χ^2) e respectivas probabilidades obtidas da análise de segregação de 25 marcas moleculares na população F₂ originada da F₁ H 511-1, com utilização da correção de Bonferroni.

Marcador	Classes ^a						Hipótese	χ^2	Probabilidade (%) ^b
	0	1	2	3	4	9			
CCG 3^c			60		186		3:1	0,05	82,520 ns
SSR 45^c			77		168	1	3:1	5,40	2,014 ns
SSRCa 23^c			173		70	3	3:1	276,54	0,000 *
OPA 14			54		192		3:1	1,21	26,945 ns
OPA 17			48		195	3	3:1	3,57	5,891 ns
AT 12^c	60			184		2	3:1	0,02	88,247 ns
SSR 100^c	99			146		1	3:1	31,02	0,000 *
OPA 1	74			168		4	3:1	4,02	4,506 ns
OPAB 9	62			183		1	3:1	0,01	91,188 ns
CCG 5	52	127	66			1	1:2:1	1,93	38,087 ns
ACTA 13	83	110	52			1	1:2:1	10,39	0,552 ns
AAC 12	66	130	50				1:2:1	2,87	23,716 ns
ACGG 1	50	123	72			1	1:2:1	3,95	13,841 ns
AT 21	85	127	33			1	1:2:1	22,40	0,001 *
AAT 9	68	124	54				1:2:1	1,61	44,714 ns
SSR 16	77	120	46			1	1:2:1	7,95	1,881 ns
AC 1	79	104	63				1:2:1	7,95	1,877 ns
AT 25	65	121	60				1:2:1	0,27	87,446 ns
CCG 15	54	129	60			3	1:2:1	1,22	54,275 ns
AAT 10	49	148	48			1	1:2:1	10,62	0,493 ns
SSR 95	49	137	58			2	1:2:1	4,35	11,347 ns
SSR 18	59	132	47			8	1:2:1	4,05	13,197 ns
SSRCa 52	64	134	48				1:2:1	4,05	13,207 ns
SSR 8	55	123	67			1	1:2:1	1,18	55,4440 ns
SSR 30	60	120	63			3	1:2:1	0,11	94,5959 ns

^a - As classes 2 e 4 referem-se a marcadores dominantes em aproximação, 4 refere-se a presença de fragmento, 2 ausência. As classes 0 e 3 são marcadores dominantes em repulsão, 3 significa presença de fragmento, 0 ausência. As classes 0, 1 e 2 referem-se a marcas co-dominantes, 0 significa presença de fragmento no progenitor resistente, 1 heterozigoto e 2 presença no progenitor suscetível. A classe 9 significa dados perdidos; ^b ns - não significativo. * - significativo a 0,20%. ^c - Marcadores SSRs que segregaram como marcadores dominantes.

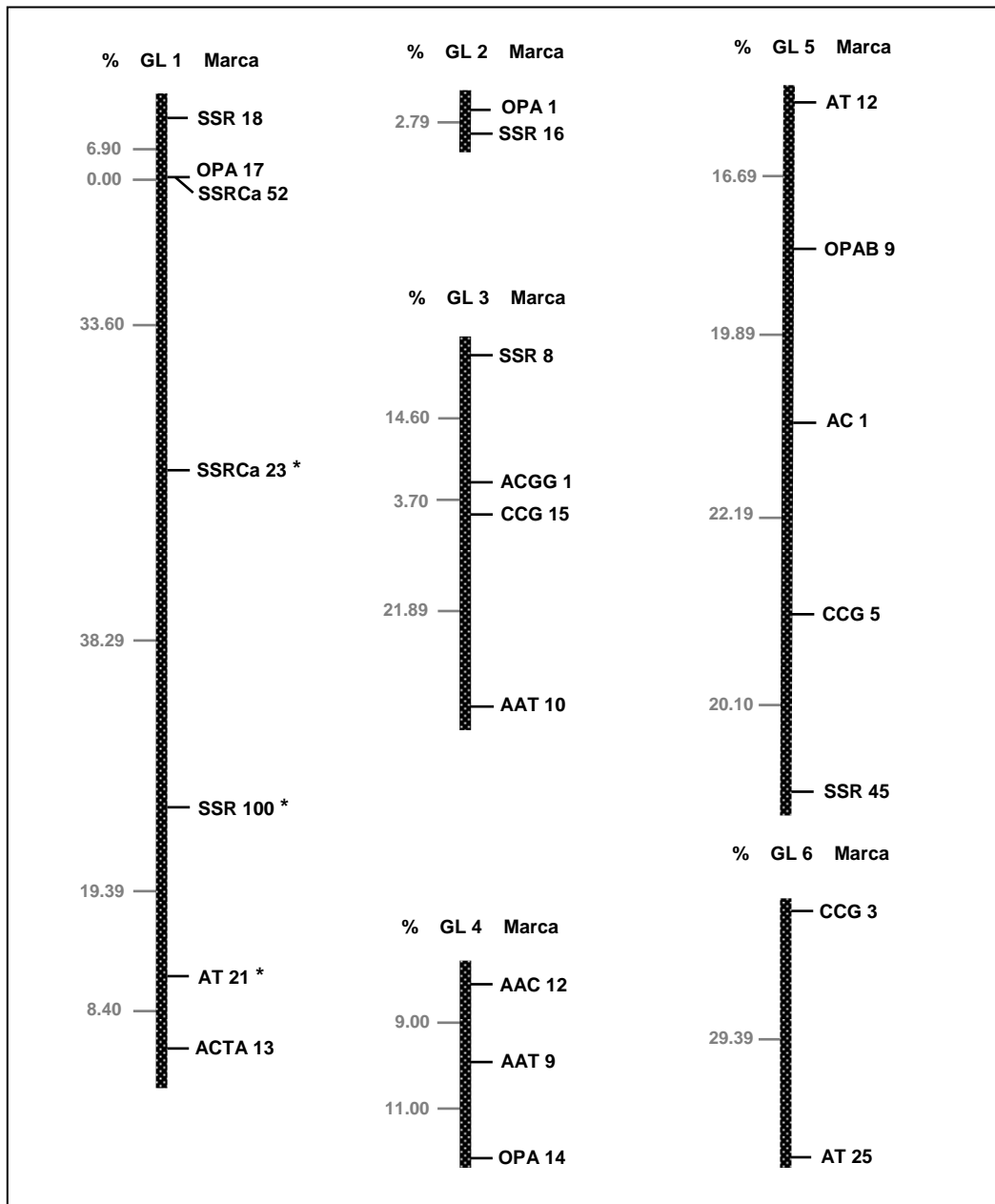


Figura 1: Mapa parcial de ligação genética do cafeeiro, construído com um LOD *score* mínimo de 3,0 e freqüência de recombinação máxima de 0,40. * Marcas com distorção de segregação.

3.2-ANÁLISE FENOTÍPICA E LOCALIZAÇÃO DE QTLs

Após a inoculação das plantas dos progenitores e das 246 plantas da população F₂, com a raça II e com o patótipo 001 de *H. vastatrix*, a intensidade de doença foi estimada de acordo com uma escala de notas (Tamayo *et al.*, 1995). O Híbrido de Timor obteve nota entre 1 e 2 e o Catuaí entre 5 e 6, para raça II e para patótipo 001. Para a população F₂, cada planta recebeu uma nota que variou entre 1 e 6, e foi utilizada para a detecção dos QTLs associados a resistência do cafeeiro à ferrugem.

Na análise por Marca Simples, o primeiro método utilizado foi o de Análise de Variância. Os marcadores microssatélite CCG 3, ACGG 1, SSR 16, CCG 15 e SSR 8 apresentaram associações significativas ($P < 0,05$) com QTLs que conferem resistência à raça II de *H. vastatrix*. O marcador RAPD OPA 1 e os microssatélites ACTA 13 e SSR 16 foram significativos a outros QTLs relacionados à resistência ao patótipo 001 de *H. vastatrix* (Tabela 3).

Posteriormente, uma análise de regressão entre os marcadores e a resistência a raça II e ao patótipo 001 também foi realizada para confirmar os QTLs identificados e verificar a magnitude do efeito fenotípico (R^2) explicado por cada marcador associado ao QTL. Os mesmos QTLs identificados na análise de variância, para a raça II e para o patótipo 001 de *H. vastatrix*, foram detectados na análise de regressão. Em ambos os testes de associações marcador-QTL foram adotados nível de significância de 5% de probabilidade (Tabela 3).

Tabela 3: Locos marcadores associados à resistência a raça II e ao patótipo 001 de *Hemileia vastatrix*.

Loco Marcador	Grupo de Ligação	Análise de Variância (%)	Análise de Regressão (%)	R² (%)
Raça II				
CCG 3	6	0,24 **	0,24 **	3,71
ACGG 1	3	0,10 **	0,10 **	5,52
SSR 16	2	0,06 **	0,10 **	5,94
CCG 15	3	4,17 *	4,20 *	2,61
SSR 8	3	0,90 **	0,90 **	3,81
Patótipo 001				
OPA 1	2	0,06 **	0,06 **	4,76
ACTA 13	1	2,85 *	2,90 *	2,90
SSR 16	2	0,00 **	0,00 **	15,92

* - Significância de 5% de probabilidade pelo teste F. ** - Significância de 1% de probabilidade pelo teste F. R² - Coeficiente de determinação da análise de regressão.

Adicionalmente, o método de máxima verossimilhança foi utilizado para confirmar a detecção dos QTLs e estimar suas distâncias com os marcadores. Neste método gráfico, o pico da curva indica a frequência de recombinação que melhor explica os dados obtidos. Para a análise de frequência de recombinação por este método utiliza-se o valor de LOD para facilitar a visualização da superioridade do valor de probabilidade encontrado, associado à estatística de verossimilhança para cada marcador (Cruz & Silva, 2006; Lander & Botstein, 1989). Nesta análise foram considerados apenas marcadores com valor de LOD superior a 3,0 e que foram significativos na análise de variância e de regressão (Tabela 3).

Três QTLs foram confirmados como associados aos genes de resistência à *H. vastatrix*, dois para a raça II e um para o patótipo 001. Na Figura 2 encontra-se a análise por Marca Simples pelo método gráfico da Máxima Verossimilhança do marcador SSR 16 para a raça II. O pico do gráfico encontra-se a 14 cM, o qual corresponde à distância do marcador com um QTL, denominado QTLHv1. O valor de LOD foi superior a 3,00 (3,69), que corresponde a uma probabilidade de ligação do marcador com o QTLHv1 1000 vezes maior que a hipótese de ausência de ligação (Cruz & Silva, 2006). Para esta mesma raça II foi detectado outro QTL, denominado QTLHv2, associado ao marcador ACGG 1, o qual apresentou uma frequência de recombinação de 0,50 cM com um valor LOD de 3,18 (Figura 3). Para o patótipo 001, o marcador SSR 16 se mostrou associado

a um QTL, denominado QTLHv3, a 22 cM de distância, com um valor LOD de 10,33 (Figura 4).

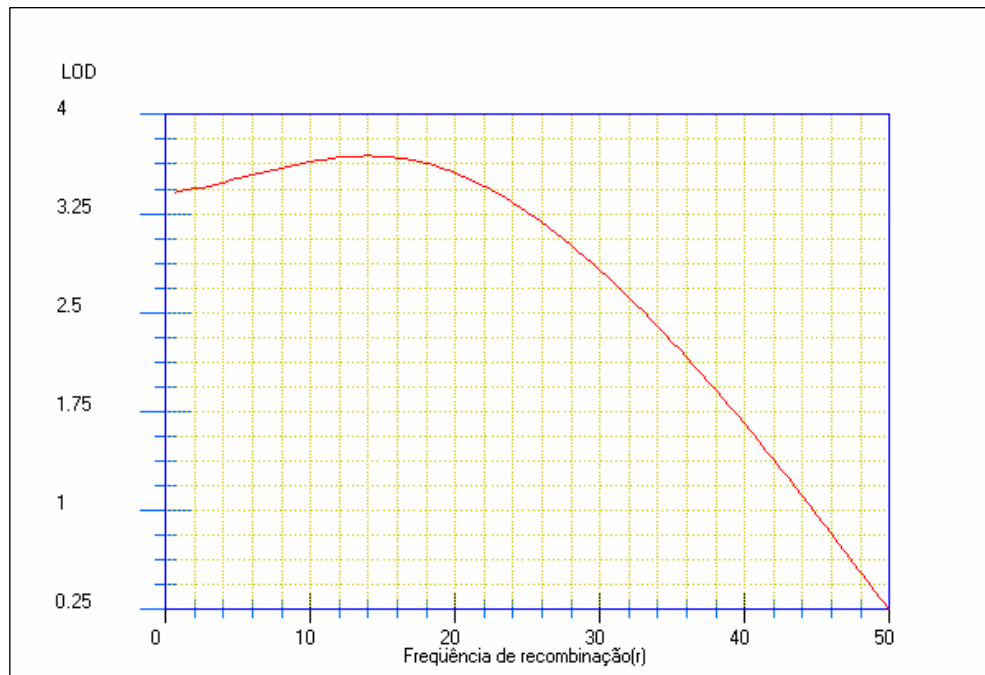


Figura 2: Análise por Marca Simples pelo Método da Máxima Verossimilhança, utilizando o marcador microssatélite SSR 16 para a raça II de *Hemileia vastatrix*. Marcador com valor de LOD máximo de 3,69 a 14 cM do QTLHv1.

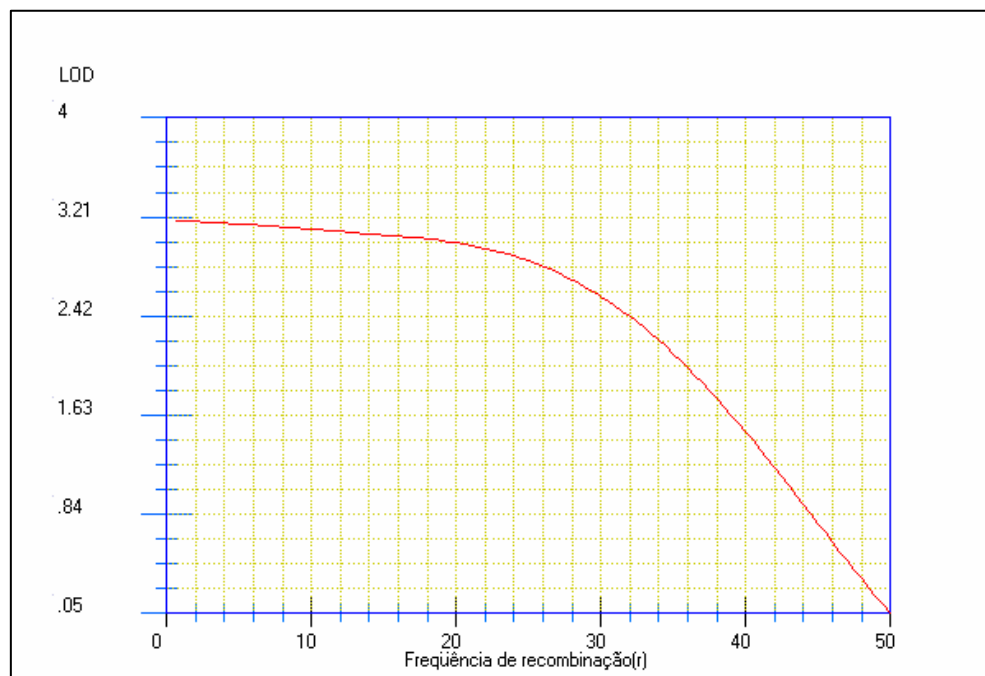


Figura 3: Análise por Marca Simples pelo Método da Máxima Verossimilhança, utilizando o marcador microssatélite ACGG 1 para a raça II de *Hemileia vastatrix*. Marcador com valor de LOD máximo de 3,18 a 0,50 cM do QTLHv2.

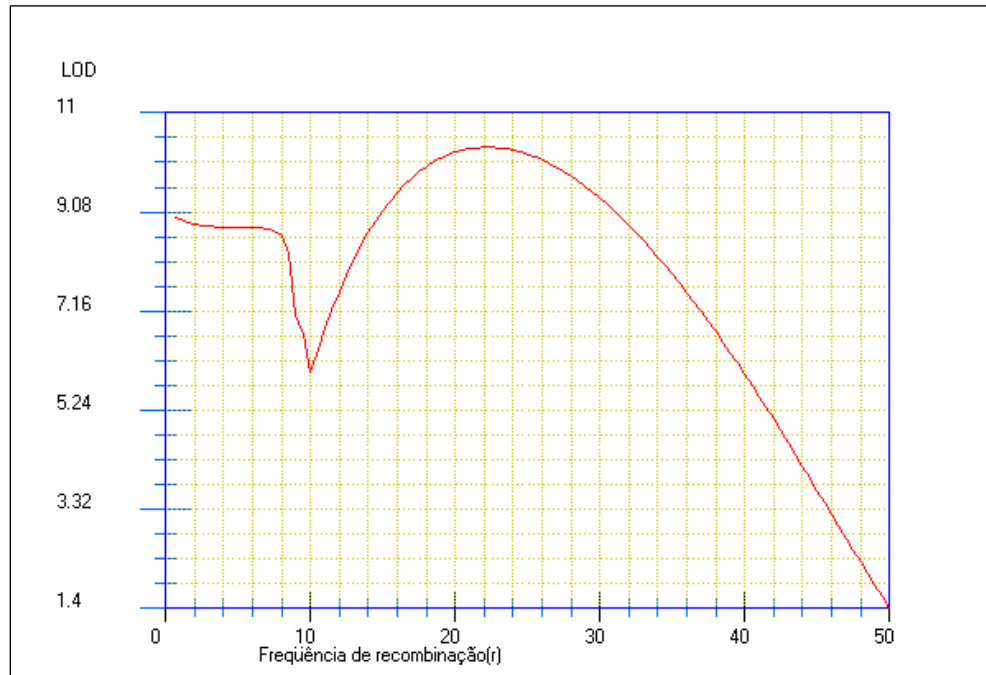


Figura 4: Análise por Marca Simples pelo Método da Máxima Verossimilhança, utilizando o marcador microssatélite SSR 16 para o patótipo 001 de *Hemileia vastatrix*. Valor de LOD máximo de 10,33 a 22 cM do QTLHv3.

As porcentagens de variação fenotípicas explicada por cada QTL foram de 5,52 e 5,94% para o QTLHv1 e QTLHv2, respectivamente, enquanto para a raça II foi de 15,92% para o QTL associado ao patótipo 001, QTLHv3 (Tabela 4). Alguns trabalhos, em que se objetivou localizar QTLs associados a genes de resistência a doenças, também apresentaram baixo valor de porcentagem de variação fenotípica explicada pelos QTLs. Flament *et al.* (2001) mapearam cinco QTLs associados à resistência a *Phytophthora palmivora*, com porcentagem de variação fenotípica explicada pelos QTLs variando de 9 a 17%. Risterucci *et al.* (2003) encontraram 13 QTLs associados a resistência à *Phytophthora* spp., mapeados com marcadores microssatélites e AFLP. A porcentagem de variação fenotípica explicada pelos QTLs variou de 7,5 a 12,4%.

O valor de variação fenotípica explicado pela regressão (R^2) pode ser afetado pela distância do marcador com o QTL e pela herdabilidade da característica. Por isso, é possível que os valores do coeficiente de determinação das associações dos marcadores com os respectivos QTLs encontrados no experimento tenham sido subestimados.

Tabela 4: Locos marcadores associados à resistência a raça II e ao patótipo 001 de *Hemileia vastatrix*.

Marcador / QTL	Grupo de Ligação	Média de Severidade ^c	Análise de Variância (%)	Análise de Regressão		
				Probabilidade (%)	R ² (%)	
SSR 16 / QTLHv1 ^a	2	A ₁ A ₁	1,74 b	0,06 **	0,10 **	5,94
		A ₁ A ₂	1,75 b			
		A ₂ A ₂	2,12 a			
ACGG 1 / QTLHv2 ^a	3	A ₁ A ₁	2,09 a	0,10 **	0,10 **	5,52
		A ₁ A ₂	1,95 ab			
		A ₂ A ₂	1,76 b			
SSR 16 / QTLHv3 ^b	2	A ₁ A ₁	1,74 b	0,00 **	0,00 **	15,92
		A ₁ A ₂	2,09 b			
		A ₂ A ₂	2,73 a			

^a - QTLs associados a raça II de *H. vastatrix*. ^b - QTL associado ao patótipo 001 de *H. vastatrix*. ^c - Média de severidade para cada classe genotípica, onde A₁A₁ são dos indivíduos homozigotos para alelos do progenitor resistente, A₁A₂ indivíduos heterozigotos e A₂A₂ homozigotos para alelos do progenitor suscetível. Dentro de cada loco marcador, médias na coluna seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ** - Significância de 1% de probabilidade pelo teste F.

Os resultados do efeito fenotípico dos QTLs na severidade média da doença mostram que para a raça II, na associação SSR 16/QTLHv1, a severidade média para a classe genotípica homozigota para o alelo do progenitor resistente (A₁A₁) foi de 1,74, enquanto que a severidade média para a classe homozigota para o alelo do progenitor suscetível (A₂A₂) foi de 2,12 (Tabela 4). Para a classe heterozigota (A₁A₂), a média de severidade foi de 1,75. Neste loco, o alelo do progenitor resistente contribuiu em 17,92% na redução da severidade da doença quando em heterozigose. Quando em homozigose para o alelo do progenitor resistente, a diminuição foi de 17,45% (Tabela 4). Nesta associação, a redução na severidade da doença foi significativamente igual, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, para um ou dois alelos do progenitor resistente, indicando que apenas um alelo do progenitor resistente é suficiente para que ocorra reação da expressão do fenótipo de resistência. Na associação ACGG 1/QTLHv2 a severidade média da classe homozigota para o alelo do progenitor resistente (A₁A₁) foi de 2,09, ao passo que para a classe homozigota para o alelo do progenitor suscetível (A₂A₂) foi de 1,76, o que representa um aumento de 18,75% na severidade da doença. A classe heterozigota (A₁A₂) obteve média de severidade de 1,95 (Tabela 4) e foi significativamente igual, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, à média de

severidade da doença da classe homocigota para o alelo do progenitor suscetível, A_2A_2 . Portanto, nesta associação, houve um aumento da severidade da doença apenas quando dois alelos do progenitor resistente estavam nas progênies.

Para o patótipo 001, na associação SSR 16/QTLHv3, a severidade média da doença para a classe genotípica dos alelos do progenitor resistente (A_1A_1) foi de 1,74, enquanto que a severidade média para a classe homocigota para o alelo do progenitor suscetível (A_2A_2) foi de 2,73. Para a classe heterocigota (A_1A_2), a média de severidade foi de 2,09. Assim, o alelo do progenitor resistente contribuiu em 23,44% na redução da severidade da doença quando em heterocigose, neste loco. Quando em homocigose para o alelo do progenitor resistente a diminuição da severidade foi de 36,26% (Tabela 4). Nesta associação, a redução na severidade da doença também foi significativamente igual, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, para um ou dois alelos do progenitor resistente, indicando que apenas um alelo do progenitor resistente é suficiente para que ocorra a reação da expressão do fenótipo de resistência.

Após realizar os três métodos de análise por marca simples, foi realizada a segunda análise estatística, Intervalo Simples, baseado no Método de Máxima Verossimilhança. Nesta análise foi possível confirmar, no intervalo do grupo de ligação 3, uma frequência de recombinação semelhante àquela encontrada na análise de Marca Simples entre o QTLHv2 e o marcador ACGG 1 (Figura 5).

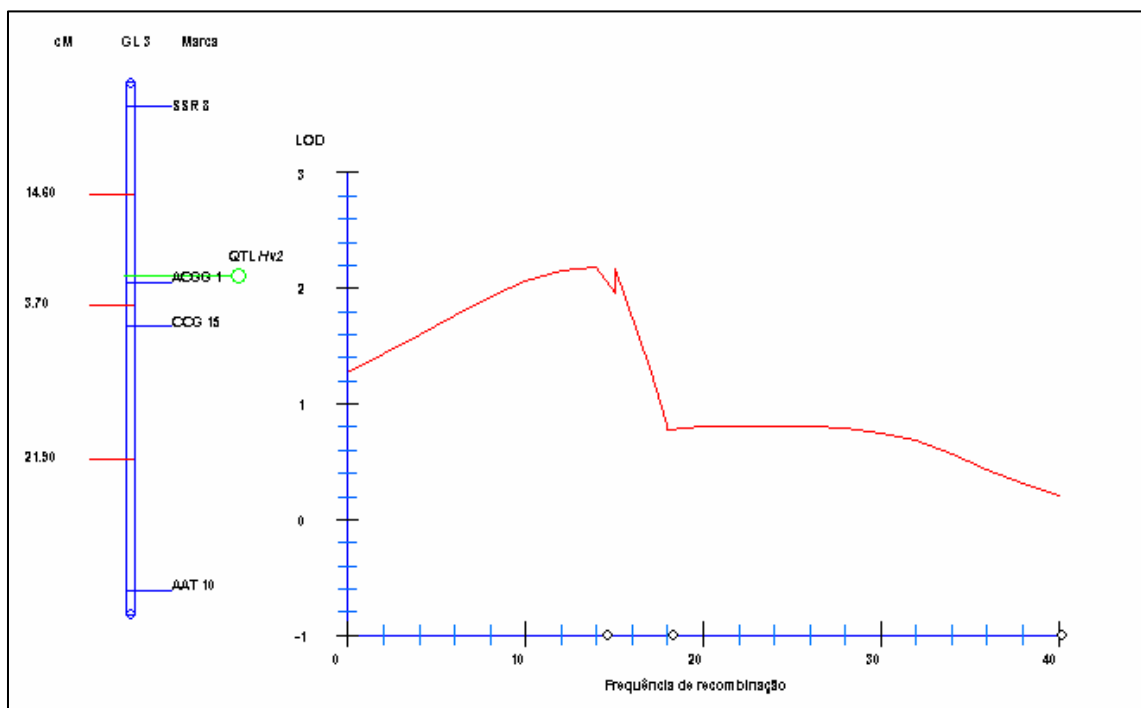


Figura 5: Análise por Intervalo Simples pelo Método da Máxima Verossimilhança, utilizando o intervalo do grupo de ligação 3 associado à raça II de *Hemileia vastatrix*. Valor de LOD máximo de 2,18 e QTLHv2 a 0,60 cM do marcador ACGG 1.

Na análise por Marca Simples, a frequência de recombinação obtida entre o marcador e o QTL foi de 0,50 cM, enquanto que na análise por Intervalo Simples foi de 0,60 cM. Para os outros dois QTLs, que estão localizados no grupo de ligação 2, entre o marcador dominante OPA 1 e o co-dominante SSR 16, não foi possível realizar a análise de Intervalo Simples, devido a inexistência de programas estatísticos que utilizam mapas com marcadores dominantes e co-dominantes conjuntamente.

Os resultados obtidos com as quatro análises permitiram detectar dois QTLs associados a resistência do Híbrido de Timor à raça II e um QTL para resistência ao patótipo 001 de *H. vastatrix*. A partir da identificação e determinação da frequência de recombinação dos QTLs com os marcadores foi construído um novo mapa genético com a adição desses QTLs (Figura 6).

Por meio do mapa obtido, observou-se que o *QTLHv1* e o *QTLHv3* estão localizados no mesmo grupo de ligação e estão relativamente próximos um do outro, podendo indicar uma região cromossômica importante para a resistência do cafeeiro à *H. vastatrix*. Esses QTLs, *QTLHv1* para a raça II e o *QTLHv3* para o patótipo 001, estão ligados ao marcador microssatélite SSR 16. O agrupamento de genes de resistência a patógenos já foi relatado em diversas espécies de plantas. Um exemplo é o loco *M* de resistência à ferrugem do linho, causada pelo fungo *Melampsora lini*. Neste loco, agrupamentos em *tandem* de genes de resistência são encontrados no genoma da planta (Ellis *et al.*, 1998). Análises moleculares do loco Cf-9 em tomateiro (Jones *et al.*, 1994) e do loco *N* em tabaco para resistência ao vírus do mosaico do tabaco, também têm revelado agrupamentos de genes (Whitham *et al.*, 1994).

É possível inferir ainda que os QTLs aqui identificados possam estar relacionados aos genes de resistência a *H. vastatrix* identificados no estudo de herança (capítulo 1). No estudo de herança, a resistência foi analisada como característica qualitativa, considerando as plantas com apenas duas classes fenotípicas, resistentes e suscetíveis. Foram encontrados dois genes dominantes independentes no Híbrido de Timor UFV 443-3 controlando a resistência à raça II e outros dois para o patótipo 001 de *H. vastatrix*. Na identificação de QTLs, a resistência foi analisada como característica quantitativa, considerando seis classes fenotípicas, correspondendo as notas de 1 a 6 da escala de notas de Tamayo *et al.* (1995). Para a raça II, foram identificados dois QTLs, *QTLHv1* e *QTLHv2*, que podem corresponder aos dois genes maiores que controlam a resistência do cafeeiro a esta raça. Para a resistência ao patótipo 001 foi detectado apenas um QTL, o *QTLHv3*, que pode ser um dos genes

maiores que governam a resistência para esse isolado. O outro gene pode não ter sido identificado com os marcadores analisados neste trabalho.

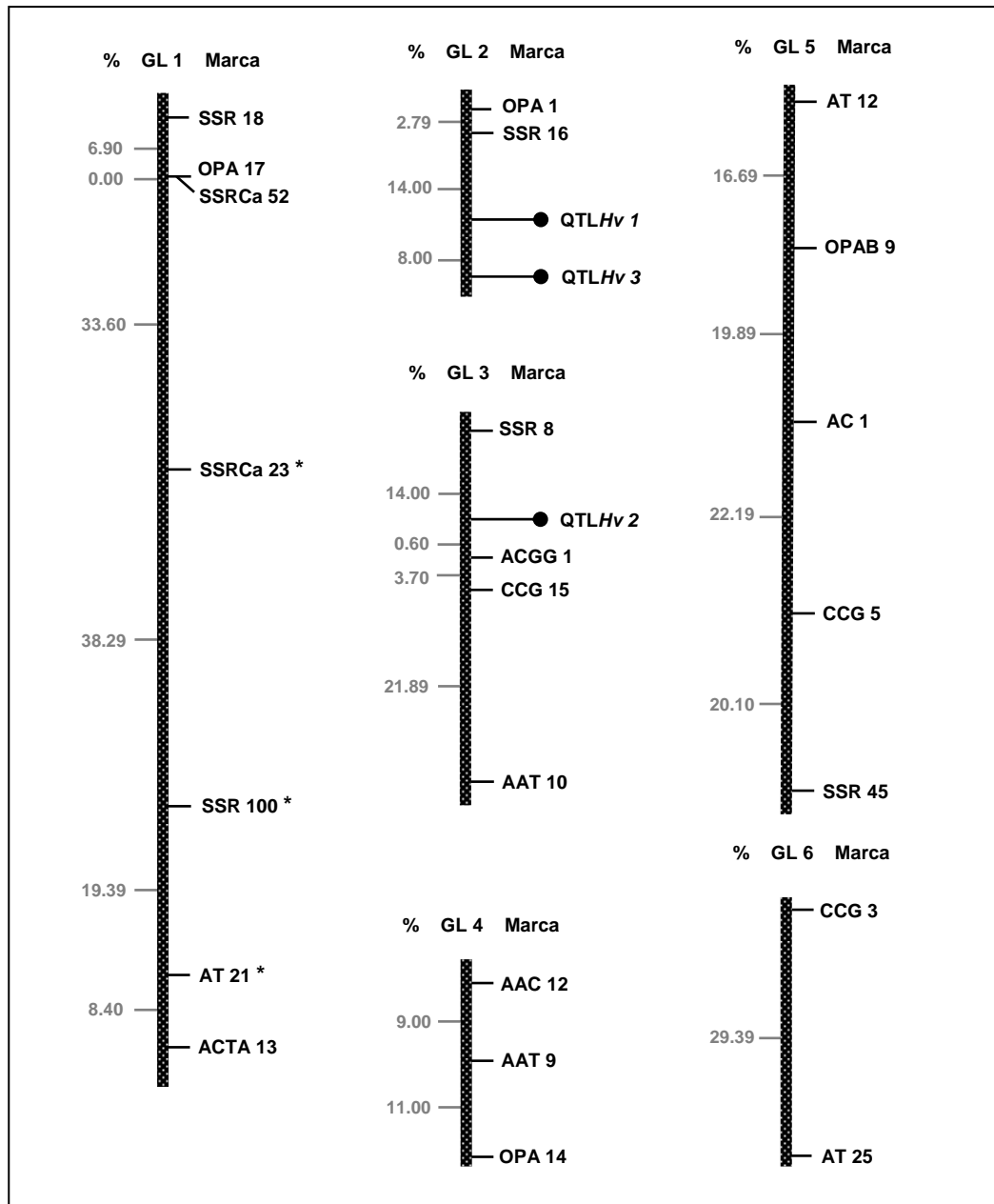


Figura 6: Mapa genético da população F₂ derivada da F₁ H 511-1, contendo os QTLs associados à resistência a raça II e ao patótipo 001 de *Hemileia vastatrix*. * Marcas com distorção de segregação.

Este trabalho apresenta o primeiro relato da utilização de marcadores microssatélites para identificar QTLs associados a genes de resistência do cafeeiro a *H. vastatrix*.

O primeiro trabalho de mapeamento de genes de resistência à *H. vastatrix* em *Coffea* spp. foi realizado com marcadores AFLP (Prakash *et al.*, 2004). Estes autores, ao analisarem em uma população F₂ derivada de *C. liberica*, identificaram 21 marcas AFLP ligadas ao gene de resistência S_{H3}, distanciadas entre zero e 6,30 cM do gene. Porém, a ocorrência no Brasil, no Estado de Minas Gerais, das raças VII (v3,5) (Cardoso, 1986) e XVI (v1,2,3,4,5) (Cardoso *et al.*, 1988), virulentas para cafeeiros que apresentam o gene S_{H3}, poderia dificultar, em parte, o uso isolado desse gene nos programas de melhoramento do Brasil. Esses marcadores poderiam ser utilizados na pirâmidação, em um mesmo cultivar, do gene S_{H3} de *C. liberica* associado a outros genes existentes no Híbrido de Timor (S_{H6} a S_{H9}).

O trabalho de Brito (2007) foi o primeiro a obter marcadores moleculares AFLP flanqueando um gene de resistência a *H. vastatrix* existentes em Híbrido de Timor. Este autor localizou marcas ligadas a um gene de resistência à raça II de *H. vastatrix* existente no Híbrido de Timor UFV 427-15.

Os QTLs associados a resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 aqui identificados, somados aos marcadores ligados ao gene S_{H3} existente em *C. liberica* (Prakash *et al.*, 2004), e às marcas identificadas por Brito em 2007, poderiam ser utilizados na pirâmidação desses genes com potencial uso na seleção assistida por marcadores moleculares para a obtenção de genótipos com resistência durável ao agente causal da ferrugem do cafeeiro.

Portanto, para disponibilizar o uso desses marcadores associados à resistência do cafeeiro a ferrugem, há necessidade de adicionar mais marcas no mapa aqui construído, objetivando-se identificar outros marcadores moleculares também próximos de regiões cromossômicas importantes não somente para a resistência do cafeeiro a ferrugem, mas também para outros patógenos, como *Colletotrichum kahawae*, *Cescospora coffeicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *garçae* e *Meloidogyne* spp.

4-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARUAH, A., NAIK, V., HENDRE, P.S., RAJKUMAR, R., RAJENDRAKUMAR, P. & AGGARWAL, R.K. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. *Molecular Ecology Notes* 3:647-650. 2003.
- BERTHAUD, J. & CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. pp.1-42 In: CLARKE, R.J. & MACRAE, R. (Eds.) *Coffee*. London: Elsevier Applied Science. 1988.
- BETTENCOURT, A.J., LOPES, J. & PALMA, S. Factores genéticos que condicionam a resistência às raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. dos clones-tipo dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de Híbrido de Timor. *Broteria Genética* XIII (LXXX):185-194. 1992.
- BETTENCOURT, A.J. & RODRIGUES, C.J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. London Elsevier Applied Science Publishers. 199-234p. 1988.
- BETTENCOURT, A.J., NORONHA-WAGNER, M. & LOPES, J. Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Broteria Genética* I (LXXVI):53-58. 1980.
- BETTENCOURT, A.J. Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timor'. Instituto Agrônomo de Campinas, Circular nº 23:20p. 1973.
- BETTENCOURT, A.J. & NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Agronomia Lusitana* 31:285-292. 1971.
- BETTENCOURT, A.J. & CARVALHO, A. Melhoramento visando à resistência do cafeeiro à ferrugem. *Bragantia* 27:35-68. 1968.
- BHAT, P.R., KRISHNAKUMAR, V., HENDRE, P.S., RAJENDRAKUMAR, P., VARSHNEY, R.K. & AGGARWAL, R.K. Identification and characterization of expressed sequence tags-derived simple sequence repeats markers from robusta coffee variety 'CxR' (an interspecific hybrid of *Coffea canephora* × *Coffea congensis*). *Molecular Ecology Notes* 5:80-83. 2005.
- BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. Marcadores Moleculares. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 374p. 2006.
- BRITO, G.G. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. *Doctor Scientiae*, Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2007.
- CAIXETA, E.T., OLIVEIRA, A.C.B., BRITO, G.G. & SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. pp.9-79 In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. (Eds.) *Marcadores Moleculares*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- CARDOSO, R.M.L. Novas raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no Brasil, métodos de identificação, e detecção de grupos fisiológicos em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. *Magister Scientiae*, Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1986.

- CARDOSO, R.M.L., ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. coletada do germoplasma de *Coffea arabica* L. no Estado de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 12:343-346. 1988.
- CARVALHO, A. & FAZUOLI, L.C. Café. pp.29-76 In: FURLANI, A.M.C. & VIÉGAS, G.P. (Eds.) O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas. 1993.
- COMBES, M.C., ANDRZEJEWSKI, S., ANTHONY, F., BERTRAND, B., ROVELLI, P., GRAZIOSI, G. & LASHERMES, P. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology* 9:1178-1180. 2000.
- COULIBALY, I., REVOL, B., NOIROT, M., LORIEUX, M., CARASCO-LACOMBE, C., MINIER, J., DUFOUR, M. & HAMON, P. AFLP and SSR polymorphism in a *Coffea* interspecific backcross progeny [(*C. heterocalyx* x *C. canephora*) x *C. canephora*]. *Theoretical and Applied Genetics* 107:1148-1155. 2003.
- CRUZ, C.D. Programa GQMOL - Genética Quantitativa e Molecular. 2007. www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm.
- CRUZ, C.D. & SILVA, L.C. Análise de Marcadores Moleculares. pp.307-374 In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. (Eds.) Marcadores Moleculares. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- 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 associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5:387-393. 2005.
- ELLIS, J.C., LAWRENCE, G.L., PEACOCK, W.J., PRYOR, A.J. Approaches to cloning plant genes conferring resistance to fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 236:245-263. 1988.
- ESKES, A.B. & COSTA, W.M. Characterization of incomplete resistance to *Hemileia vastatrix* in the Icatu coffee population. *Euphytica* 32:649-657. 1983.
- ESKES, A.B., HOOSGSTRATEN, J.G.J., TOMA-BRAGHINI, M. & CARVALHO, A. Race-specificity and inheritance of incomplete to coffee leaf rust in some Icatu coffee progenies de Timor derivatives of Hibrido de Timor. *Euphytica* 47:11-19. 1990.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (3). Brasília: Embrapa-Cenargen. 220p. 1998.
- FLAMENT, M.H., KEBE, I., CLÉMENT, D., PIERETTI, I., RISTERUCCI, A.M., N'GORAN, J.A.K., CILAS, C., DESPRÉAUX, D. & LANAUD, C. Genetic mapping of resistance to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome* 44:79-85. 2001.
- JOHNSON, R. Durable resistance: definition of, genetic control and attainment in plant breeding. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, n. 6, p. 567-568. 1981.
- JONES, D.A., THOMAS, C.M., HAMMOND-KOSACK, K.E., BALINT-KURTI, P.J., JONES, J.D.G. Isolation of the tomato CF-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266:789-792. 1994.
- LANDER, E.S. & BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199. 1989.

- LASHERMES, P., COMBES, M.C., PRAKASH, N.S., TROUSLOT, P., LORIEUX, M. & CHARRIER, A. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. *Genome* 44:589-596. 2001.
- MALUF, M.P., SILVESTRINI, M., RUGGIERO, L.M.D.C., FILHO, O.G. & COLOMBO, C.A. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR markers systems. *Scientiae Agrícola* 62:366-373. 2005.
- MILACH, S.C.K., CRUZ, R.P. Piramidação de genes de resistência às ferrugens em cereais. *Ciência Rural*, v. 27, n.4, p. 685-689, 1997.
- MONCADA, P. & MCCOUCH, S. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome* 47:501-509. 2004.
- MORENO, R.G. Étude du polymorphisme de l'Hybride de Timor em vue de l'amélioration du café arabica: variabilité enzymatique et agronomique dans les populations d'origine; résistance incomplète à *Hemileia vastatrix* DNAs les croisements avec *Coffea arabica*. *Doctor Scientiae*. École nationale supérieure agronomique de Montpellier, Montpellier, France.
- MOREIRA, J.U.V. Mapeamento de QTLs para reação à doença mancha de *Phaeosphaeria* em Milho. *Doctor Scientiae*, Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba-SP. 2004.
- NORONHA-WAGNER, M. & BETTENCOURT, A.J. Genetic study of resistance of *Coffea* sp. to leaf rust-Identification and behaviour of four factor conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal of Botany* 45:2021-2031. 1967.
- OLIVEIRA, A.C.B., SAKIYAMA, N.S., CAIXETA, E.T., ZAMBOLIM, E.M., RUFINO, R.J.N. & ZAMBOLIM, L. Partial map of *Coffea arabica* L. and recovery of the recurrent parent in backcross progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7:196-203. 2007.
- PAILLARD, M., LASHERMES, P. & PÉTIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theoretical and Applied Genetics* 93:41-47. 1996.
- PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* 17:203-222. 1979.
- PEARL, H.M., NAGAI, C., MOORE, P.H., STEIGER, D.L., OSGOOD, R.V. & MING, R. Construction of a genetic map for arabica coffee. *Theoretical and Applied Genetics* 108:829-835. 2004.
- PONCET, V., HAMON, P., MINIER, J., CARASCO, C., HAMON, S. & NOIROT, M. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome* 47:1071-1081. 2004.
- PRAKASH, N.S., MARQUES, D.V., VARZEA, V.M.P., SILVA, M.C., COMBES, M.C. & LASHERMES, P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1311-1317. 2004.
- RISTERUCCI, A.M., PAULIN, D., DUCAMP, M., N'GORAN, J.A.K. & LANAUD, C. Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of *Phytophthora*. *Theoretical and Applied Genetics* 108:168-174. 2003.

- RODRIGUES Jr., C.J., VÁRZEA, V.M.P., SILVA, M.C., GUERRA-GUIMARÃES, L., ROCHETA, M., MARQUES, D.V. Recent advantages on coffee leaf rust. In: International Scientific Symposium on Coffee. pp. 179-193. Bangalore, Índia, Central Coffee Research Institute. (Resumos). 2000.
- RODRIGUES Jr., C.J., BETTENCOURT, A.J. & RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Phytopathology* 13:49-70. 1975.
- RODRIGUES Jr., C.J. & BETTENCOURT, A.J. Routine screening for resistance to *Hemileia vastatrix* B. et Br. on *Coffea arabica* L. accessions from different coffee producing regions of the world. Prog. Rept., 1960-1965, Oeiras, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro 47-99. 1965.
- ROVELLI, P., METTULIO, R., ANTHONY, F., ANZUETO, F., LASHERMES, P. & GRAZIOSI, G. Microsatellites in *Coffea arabica* L. pp. 123-133 In: International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry, Londrina (Resumos). 2000.
- RUFINO, R.J.N., CAIXETA, E.T., PENA, G.F., ZAMBOLIM, E.M., ZAMBOLIM, L. & SAKIYAMA, N.S. A validação dos *primers* de Marcadores Microsatélites desenvolvidos e publicados na literatura para espécie *Coffea arabica*. pp. In: Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Londrina (Resumos). 2005.
- SILVA, M.F.D. Mapeamento e validação de QTLs de resistência ao nematóide de cisto da soja. *Doctor Scientiae*, Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2006.
- TAMAYO, P.J., VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. & PEREIRA, A.A. Resistência do Catimor à ferrugem e virulência de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Fitopatologia Brasileira* 20:572-576. 1995.
- TEIXEIRA-CABRAL, T.A., SAKIYAMA, N., ZAMBOLIM, L., PEREIRA, A.A. & SCHUSTER, I. Single-locus inheritance and partial linkage map of *Coffea arabica* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4:416-421. 2004.
- VAN der PLANK, J.E. Plant diseases. Epidemics and control. New York: Academic Press, 1963.
- WAGNER, M. & BETTENCOURT, A.J. Inheritance of reaction to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. in *Coffea arabica* L. Progress Report: 1960-1965, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal:121-123. 1965.
- WHITHAM, S., DINESH-KUMAR, S.P., CHOI, D., HEHL, R., CORR, C., BAKER, B. The product of the *Tabacco mosaic virus* resistance gene *N*: Similarity to Toll and interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101-1115, 1994.
- XIAN-LIANG, S., XEU-ZHEN, S. & TIAN-ZHEN, Z. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 3:163-169. 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que:

- 1) A herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 à raça II (v5) e ao patótipo 001 (v5,?) de *Hemileia vastatrix* foi governada por dois genes dominantes e independentes.
- 2) Foram detectados 2 QTLs associados aos genes de resistência à raça II (v5) de *H. vastatrix* existentes no Híbrido de Timor UFV 443-3.
- 3) Apenas um QTL foi identificado para um dos genes de resistência ao patótipo 001 (v5,?) de *H. vastatrix* existentes no Híbrido de Timor UFV 443-3. Este QTL localizou-se em uma mesma região cromossômica de um dos QTLs identificados para a raça II. O outro QTL pode não ter sido identificado com os marcadores analisados neste trabalho, necessitando saturar o mapa aqui construído para identificar mais marcas importantes para a resistência do cafeeiro a ferrugem.