

EMILLY RUAS ALKIMIM

SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES  
MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA À  
FERRUGEM E À ANTRACNOSE DOS FRUTOS DO  
CAFEEIRO

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

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

T

A415s  
2013 Alkimim, Emilly Ruas, 1989-  
Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência  
múltipla à ferrugem e à antracnose dos frutos do cafeeiro / Emilly Ruas  
Alkimim. - Viçosa, MG, 2013.  
x, 40f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Eveline Teixeira Caixeta.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.34-40.

1. Café - Melhoramento genético. 2. Marcadores genéticos. 3.  
Genes. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.  
Mestrado em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.732

EMILLY RUAS ALKIMIM

SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES  
MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA À  
FERRUGEM E À ANTRACNOSE DOS FRUTOS DO  
CAFEEIRO

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

APROVADA: 29 de julho de 2013.

---

Laércio Zambolim

---

Felipe Lopes da Silva

---

Antônio Alves Pereira  
(Coorientador)

---

Eveline Teixeira Caixeta  
(Orientadora)

*“Não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”*

*Augusto Cury*

*Dedico a Deus, que esteve comigo em  
todos os momentos, sem Ele nada seria.  
E aos meus pais e meu esposo pelo amor  
e dedicação.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por sempre me ajudar nos momentos difíceis.

Agradeço a Universidade Federal De Viçosa (UFV) e ao Curso de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade e pelo ensino de excelência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

À Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pela orientação, ensinamentos transmitidos, pela oportunidade e por toda amizade e compreensão.

Aos meus coorientadores Dr. Antonio Carlos Baião de Oliveira e Dr. Antônio Alves Pereira pelos conhecimentos e sugestões valiosas.

Ao professor Laércio Zambolim e o professor Felipe Lopes da Silva por aceitarem participar da minha banca de defesa e pelas importantes sugestões no trabalho.

À Dra. Eunize Maciel Zambolim, pelo auxílio na condução dos trabalhos e pela amizade.

Agradeço aos meus pais, Jodecy e Sheila, que são exemplos para mim, por todo amor, carinho e esforço dedicado e por sempre acreditarem e confiarem em mim.

Aos meus amados irmãos, Emílio e Esley, por todo amor, carinho e amizade.

Ao meu esposo Tiago, por estar ao meu lado em toda essa caminhada gratificante, me apoiando e sempre acreditando em mim e pelo inestimável amor e carinho.

Aos colegas do Laboratório BioCafé, pela eterna amizade, pelos conselhos e por dividir comigo grandes momentos, em especial a Kátia e Dani por sempre me ajudarem.

## **BIOGRAFIA**

EMILLY RUAS ALKIMIM, filha de Jodecy Soares Alkimim e Sheila Cristina Ruas Alkimim, nasceu no dia 03 de agosto de 1989, em Francisco Sá, Estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino fundamental em 2003, na Escola Estadual Tiburtino Pena em Francisco Sá-MG e o ensino médio em 2006, no Colégio Pirâmide em Francisco Sá-MG.

Em dezembro de 2011 diplomou-se em Agronomia na Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES). Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Biotecnologia, sob orientação da Dra. Márcia Regina Costa.

Em março de 2012, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração Genética Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob orientação da Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pesquisadora da Embrapa Café.

Atualmente está aprovado no curso de doutorado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG, onde iniciará seus trabalhos, sob orientação da Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pesquisadora da Embrapa Café.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	4
2.1. <i>Objetivos Específicos</i> .....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1. <i>Importância socioeconômica da cultura do café no Brasil</i> .....	4
3.2. <i>Antracnose dos frutos do cafeeiro- Coffee Berry Disease (CBD)</i> .....	5
3.3. <i>Ferrugem do cafeeiro</i> .....	6
3.4. <i>Melhoramento para resistência a Hemileia vastatrix</i> .....	7
3.5. <i>Uso de marcadores moleculares</i> .....	9
3.6. <i>Seleção assistida por marcadores moleculares</i> .....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
4.1. <i>Material Genético</i> .....	14
4.2. <i>Validação dos marcadores ligados ao gene <math>S_{H3}</math> que confere resistência à ferrugem do cafeeiro</i> .....	20
4.3. <i>Validação dos marcadores SCAR ligados ao gene <math>S_H?</math> do Híbrido de Timor que confere resistência à ferrugem do cafeeiro</i> .....	20
4.4. <i>Validação dos marcadores SSR ligados ao gene <math>Ck-1</math> que confere resistência à antracnose dos frutos do cafeeiro</i> .....	21
4.5. <i>Seleção assistida por marcadores moleculares</i> .....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
5.1. <i>Seleção assistida para o gene <math>S_{H3}</math> que confere resistência à ferrugem do cafeeiro</i> .....	22
5.2. <i>Seleção assistida para o gene <math>S_H?</math> do Híbrido de Timor que confere resistência à ferrugem do cafeeiro</i> .....	28
5.3. <i>Seleção assistida para o gene <math>Ck-1</math> que confere resistência à antracnose dos frutos do cafeeiro</i> .....	31
6. CONCLUSÕES .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS .....	34

## RESUMO

ALKIMIM, Emilly Ruas. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência múltipla à ferrugem e à antracnose dos frutos do cafeeiro.** Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta. Coorientadores: Antonio Carlos Baião de Oliveira e Antônio Alves Pereira.

Marcadores moleculares intimamente ligados a dois genes maiores ( $S_{H3}$  e  $S_{H?}$ ) que conferem resistência à ferrugem, e marcadores moleculares ligados ao gene *Ck-1* que confere resistência à antracnose dos frutos do cafeeiro também conhecida por *Coffee Berry Disease* (CBD), foram previamente identificados. Estes marcadores apresentam potencial para serem usados em programas de melhoramento visando identificar e monitorar genótipos contendo genes de resistência a esses patógenos (*Hemileia vastatrix* e *Colletotrichum kahawae*). Dessa forma, o objetivo do trabalho foi utilizar a estratégia de seleção assistida por marcadores moleculares associados aos genes  $S_{H3}$  (proveniente de *Coffea liberica*),  $S_{H?}$  (proveniente do Híbrido de Timor-UFV 443-03) e *Ck-1*, no programa de melhoramento do cafeeiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig)/Universidade Federal de Viçosa (UFV). Inicialmente os marcadores moleculares disponíveis na literatura foram validados e então utilizados na seleção assistida de 160 genótipos. Esses cafeeiros fazem parte do germoplasma da UFV/Epamig e foram introduzidos do CIFC por serem potencialmente portadores de resistência à ferrugem. Por meio dos marcadores validados foi possível identificar onze indivíduos resistentes homocigotos para o gene  $S_{H3}$ , UFV311-48 ( $F_2$ ), UFV311-49 ( $F_2$ ), UFV 311-56 ( $F_2$ ), UFV313-133 ( $F_2$ ), UFV329-72 ( $F_2$ ), UFV329-78 ( $F_2$ ), UFV334-65 ( $F_2$ ), UFV335-12 ( $F_2$ ), UFV335-77 ( $F_2$ ), UFV399-45 ( $F_2$ ) e UFV409-08 ( $F_2$ ). O gene  $S_{H3}$  confere resistência a diferentes raças de *H. vastatrix* e a sua incorporação em variedades de interesse tem sido sugerida como importante estratégia para obter resistência à ferrugem. Também foram identificados cafeeiros que além de serem portadores do gene  $S_{H3}$  em homocigose, apresentaram o gene  $S_{H?}$  proveniente do Híbrido de Timor (UFV443-03). Tais genótipos são o UFV311-48 ( $F_2$ ), UFV311-49 ( $F_2$ ), UFV 311-56 ( $F_2$ ), UFV313-133 ( $F_2$ ), UFV334-65 ( $F_2$ ), UFV399-45 ( $F_2$ ) e UFV409-08 ( $F_2$ ). Para o gene *Ck-1* que confere resistência à CBD, foi observado que o genótipo UFV328-60 ( $F_2$ ) foi homocigoto resistente quando analisado com os dois marcadores, apesar de não apresentar bandas ligadas aos genes  $S_{H3}$  e  $S_{H?}$ . Entretanto UFV317-12 ( $F_1$ ) se

mostrou resistente heterozigoto com o marcador CBD-Sat235 (marcador do *Ck-1*) e resistente homozigoto com o marcador CBD-Sat207 (outro marcador do *Ck-1*), e portador do gene  $S_H^?$  que confere resistência à ferrugem. Logo, por meio da Seleção Assistida por Marcadores Moleculares foram identificados cafeeiros portadores de diferentes genes de resistência à ferrugem e à CBD. Esse germoplasma, apesar de ser derivado de *C. liberica*, apresentou além do gene  $S_H^3$  o gene  $S_H^?$ , até então identificado apenas em genótipos derivados de *C. canephora*. Os cafeeiros identificados poderão ser utilizados em cruzamentos para a introdução desses genes em outros materiais genéticos de interesse nos programas de melhoramento. A utilização dos marcadores moleculares validados, nos programas de melhoramento, serão imprescindíveis para monitoramento dos genes nas diferentes gerações e cruzamentos.

## ABSTRACT

ALKIMIM, Emilly Ruas. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Molecular marker assisted selection for multiple resistance to rust and anthracnose in coffee fruits.** Advisor: Eveline Teixeira Caixeta. Co-advisors: Antonio Carlos Baião de Oliveira and Antônio Alves Pereira.

Molecular markers closely linked to two major genes ( $S_{H3}$  and  $S_{H?}$ ) that confer resistance to rust, and molecular markers linked to the gene *Ck-1*, which confers resistance to anthracnose in coffee fruits, also known as Coffee berry disease (CBD), were previously identified. These markers have potential to be used in breeding programs aiming to identify and monitor genotypes containing genes resistant to these pathogens (*Hemileia vastatrix* and *Colletotrichum kahawae*). Thus, the present work aimed to use molecular marker assisted selection associated with genes  $S_{H3}$  (from *Coffea liberica*),  $S_{H?}$  (from the Timor Hybrid UFV443-03 ) and *Ck-1* , in a coffee breeding program of the Agricultural Research Company of Minas Gerais (Epamig)/Universidade Federal de Viçosa (UFV). Initially, the molecular markers available in the literature were validated and then used in marker assisted selection of 160 genotypes. These coffee plants are part of the UFV/Epamig coffee germplasm bank and were introduced by the CIFC because they are potential carriers of rust resistance. The validated markers allowed identifying eleven resistant individuals homozygous for the gene  $S_{H3}$  UFV311- 48 (F2), UFV311-49 (F2), UFV311-56 (F2), UFV313-133 (F2), UFV329-72 (F2) UFV329-78 (F2) UFV334-65 (F2) UFV335-12 (F2) UFV335-77 (F2) UFV399-45 (F2) and UFV409-08 (F2). The gene  $S_{H3}$  confers resistance to different races of *H. vastatrix* and its incorporation in varieties of interest has been suggested as an important strategy for rust resistance. There was also identification of coffee plants that carry the gene  $S_{H3}$  in homozygosity that presented gene  $S_{H?}$  from the Timor Hybrid (UFV443-03). These genotypes are UFV311-48 (F2) UFV311-49 (F2), UFV311-56 (F2) UFV313-133 (F2) UFV334-65 (F2) UFV399-45 (F2) and UFV409-08 (F2). For gene *Ck-1*, which confers resistance to CBD, it was observed that the genotype UFV328-60 (F2) was resistant homozygous when tested with the two markers, although presenting no bands related to the genes  $S_{H3}$  and  $S_{H?}$ . However, UFV317-12 (F1) was resistant heterozygous with marker CBD-Sat235 (marker *Ck-1*) and resistant homozygous with marker CBD-Sat207 (another *Ck-1* marker) and carried the gene  $S_{H?}$ , which confers

resistance to rust. Therefore, Molecular Marker Assisted Selection allowed identifying coffee plants carrying different genes resistant to rust and CBD. This germplasm, although derived from *C. liberica*, presented both the gene S<sub>H</sub>3 and gene S<sub>H</sub>?, hitherto only identified in genotypes derived from *C. canephora*. The coffee plants identified may be used in crosses for the introduction of these genes in other genetic materials of interest in breeding programs. The use of validated molecular markers in breeding programs will be invaluable for monitoring genes in different generations and crosses.

## 1. INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade agrícola de grande importância econômica para o desenvolvimento do Brasil, que desde o final do século XIX ocupa a posição de maior produtor e exportador de café do mundo. Apesar da grande importância dessa cultura, ainda existem muitos desafios a serem superados para que se possa obter elevada produtividade e qualidade com menor custo de produção. Um dos grandes problemas enfrentados pelos cafeicultores é a suscetibilidade do cafeeiro a diferentes doenças. Dentre as doenças de maior importância pode-se citar a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.), uma das doenças que mais causa prejuízos econômicos aos cafeicultores em todo o mundo (MEIRA *et al.*, 2008). Os danos causados pela ferrugem são, principalmente, indiretos, pela indução de desfolha quando a doença atinge altas severidades. A queda precoce das folhas resulta em menor vingamento da florada e dos frutos “chumbinhos”, bem como seca dos ramos plagiotrópicos, comprometendo, em alguns casos, em mais de 50% a produção do cafeeiro nas safras futuras (ZAMBOLIM *et al.*, 1997).

Outra doença que tem trazido grandes preocupações para os cafeicultores é a antracnose dos frutos do cafeeiro, também chamada por *Coffee Berry Disease* (CBD), causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge. Até o momento essa doença encontra-se restrita ao continente Africano e, juntamente com a ferrugem, são consideradas no café arábica as doenças mais devastadoras naquele continente, particularmente em grandes altitudes (MANUEL *et al.*, 2010). Dessa forma, a CBD representa uma grande ameaça para a lavoura cafeeira na América e na Ásia, sendo assim, importante realizar-se estudos preventivos nesses países, onde a CBD ainda não está presente.

Para o controle dessas e de outras doenças do cafeeiro tem-se utilizado cultivares resistentes. Os problemas de mão de obra e as preocupações com as questões ambientais, decorrentes do controle químico resultam na procura por uma resistência durável como a melhor alternativa para contornar este sério problema econômico da cafeicultura. Dessa forma, tem-se buscado a obtenção de cultivares portadores de genes de resistência aos patógenos por meio do melhoramento genético (FAZUOLI *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; SERA *et al.*, 2002; FAZUOLI *et al.*, 2005).

Nesse contexto, já foram identificadas diferentes fontes de resistência para essas duas principais doenças do cafeeiro. Para a ferrugem, foram caracterizados até o momento, pelo menos nove genes dominantes ( $S_{H1}$  a  $S_{H9}$ ) condicionando a resistência ao fungo *H. vastatrix*. Os genes de resistência identificados em *C. canephora* ( $S_{H6}$  a  $S_{H9}$ ) e *C. liberica* ( $S_{H3}$ ) têm proporcionado resistência com durabilidade apreciável em várias regiões cafeeiras onde têm sido testados (BETTENCOURT e CARVALHO, 1968; CARVALHO e MÔNACO, 1971). Para permitir a transferência desses genes, provenientes de plantas de espécies diferentes e com ploidia distinta, para cultivares de *C. arabica*, tem-se utilizado híbridos naturais como o Híbrido de Timor e Seleções Indianas.

O Híbrido de Timor, resultante do cruzamento natural entre *C. arabica* x *C. canephora*, apresenta características como maior produção em relação a outros híbridos, fenótipo semelhante ao café arábica, autocompatibilidade, tetraploidia ( $2n=44$ ) e boa qualidade de bebida. Além disso, esses cafeeiros são portadores de diferentes genes que conferem resistência à ferrugem, à CBD e outras doenças e pragas (RODRIGUES JR. *et al.*, 1975).

Na população do Híbrido de Timor já foram detectados os quatro genes de *C. canephora* ( $S_{H6}$  a  $S_{H9}$ ) e o gene  $S_{H5}$  de *C. arabica* que, de forma isolada ou em associação, conferem resistência a algumas raças fisiológicas de *H. vastatrix* identificadas (BETTENCOURT *et al.*, 1980; BETTENCOURT *et al.*, 1992; BRITO *et al.*, 2010). Esses materiais genéticos constituem-se, portanto, em importantes fontes de resistência, as quais poderão auxiliar na obtenção de cultivares que apresentem resistência durável a esta doença.

As Seleções Indianas são materiais genéticos tetraploides oriundos de cruzamentos naturais entre *C. arabica* x *C. liberica*, retrocruzadas ou não com cultivares arábicas como Kent ou Coorg, e são portadores do gene  $S_{H3}$  que confere resistência a raças de *H. vastatrix* (BETTENCOURT e RODRIGUES JR, 1988; FAZUOLI *et al.*, 2005; RAM, 2006). Dentre as Seleções Indianas obtidas, a S288, S333 e S795 se destacaram e suas descendências foram enviadas para diferentes países, onde são usadas nos programas de melhoramento genético do cafeeiro.

Para a outra doença de grande importância, CBD, também já foram identificadas várias fontes de resistência. De acordo com Agwanda *et al.* (1997), a resistência à CBD é controlada por pelo menos três genes que estão presentes no Híbrido de Timor e Catimor (gene T), Rume Sudan (genes R e k) e K7 (gene k).

Alguns desses genes identificados, tanto para resistência à ferrugem quanto para CBD, foram extensivamente estudados e marcadores moleculares ligados a eles foram identificados, permitindo o uso de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) no melhoramento do cafeeiro. Marcadores de DNA que estejam ligados aos genes de resistência a doenças podem auxiliar e aumentar a eficiência dos programas de melhoramento genético (LASHERMES *et al.*, 2000). Os marcadores permitem avaliar a variabilidade genética existente diretamente no DNA para identificar genes de interesse agrônômico (RIESEBERG *et al.*, 2000). Nesse sentido, a utilização de SAM seria particularmente útil no processo de transferência de alelos de resistência, por anular o efeito do ambiente e permitir a seleção na ausência do patógeno ou da raça do patógeno.

Para a resistência à ferrugem do cafeeiro, foram identificados 21 marcadores de DNA do tipo AFLP ligados ao gene  $S_{H3}$  (PRAKASH *et al.*, 2004) derivado da introgressão de *C. liberica* em *C. arabica*, o qual têm proporcionado resistência com durabilidade apreciável. Quatro desses marcadores AFLP foram transformados em SCAR e juntamente com outros três marcadores SCAR proveniente de extremidade de BAC e três SSR formaram dois pequenos grupos de ligação (5,7 cM e 5,9 cM) contendo o gene de resistência  $S_{H3}$  (MAHÉ *et al.*, 2008). Esses 10 marcadores moleculares, por estarem proximamente ligados ao gene de resistência, podem ser utilizados para identificar o gene  $S_{H3}$  na SAM. Brito *et al.* (2010) e Diola *et al.* (2011) identificaram marcadores ligados ao gene  $S_H?$ , presente em um acesso de Híbrido de Timor (UFV443-03), que confere resistência a outras raças de *H. vastatrix*. Nesses trabalhos foi desenvolvido um mapa genético de alta densidade, com seis marcadores SCAR delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM e flanqueando o gene  $S_H?$  em 0,7 e 0,9 cM.

Marcadores ligados a gene de resistência à CBD também foram identificados por Gichuru *et al.* (2008). A fonte de resistência utilizada neste trabalho foi a cultivar Catimor 88 e a cultivar Catimor 127. Foram encontrados oito marcadores AFLP e dois SSR ligados ao fenótipo resistente, de forma que o gene designado *Ck-1*, que provavelmente é semelhante ao gene T previamente caracterizado, ficou localizado em um segmento de 11 cM. Desse forma, propõe-se nesse trabalho identificar genótipos contendo um ou mais genes que conferem resistência à *H. vastatrix* e *C. kahawae* via SAM, por meio da utilização destes

marcadores moleculares, que podem ser utilizados em programas de melhoramento genético do cafeeiro.

## **2. OBJETIVO**

Utilizar a estratégia de seleção assistida por marcadores moleculares associados aos genes  $S_H3$  (proveniente de *C. liberica*) e  $S_H?$  (do Híbrido de Timor UFV 443-03) que conferem resistência à ferrugem e ao gene *Ck-1* de resistência à CBD, no programa de melhoramento do cafeeiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epmig) / Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### **2.1. Objetivos Específicos**

Validar marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à ferrugem e à CBD;

Identificar cafeeiros portadores de diferentes genes que conferem resistência à ferrugem e à CBD, a fim de serem utilizados nos programas de melhoramento genético do cafeeiro;

Incorporar a técnica de seleção assistida por marcadores moleculares no cafeeiro.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. Importância socioeconômica da cultura do café no Brasil**

O agronegócio do café está entre as atividades de maior importância socioeconômicas quando comparadas às diferentes atividades ligadas ao comércio agrícola internacional, sendo uma grande “commodity” mundial. A agropecuária representa cerca de 5% do PIB nacional. No terceiro trimestre do ano passado, o PIB da agropecuária avançou 3,6%. O crescimento do setor no terceiro trimestre deve-se à produção de milho e café, cuja colheita cresceu cerca de 27,1% e 14,5% no ano.

A cadeia produtiva do café movimentava anualmente mais de 13 bilhões de dólares no mercado internacional (ICO, 2009). Essa atividade tem gerado milhões de empregos nos países tropicais produtores. No contexto da economia brasileira, o café

é um produto agrícola tradicional que gera mais de sete milhões de empregos diretos e indiretos (EMBRAPA CAFÉ, 2004).

As duas principais espécies de café de maior importância no mercado econômico internacional são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, conhecidas por café arábica e café robusta, respectivamente. No contexto da cafeicultura mundial, o Brasil é um país estrategicamente melhor situado por apresentar uma produção em larga escala destas duas espécies mais importantes (FAZUOLI, 2006).

O Brasil é o maior produtor mundial de café, ocupando atualmente uma área plantada com as espécies arábica e robusta de 2.375,79 mil hectares. O resultado mostra um crescimento de 1,99% sobre a área existente na safra 2012 (CONAB, 2013).

A primeira estimativa de produção de café (arábica e robusta) para a safra 2013 indica que o País deverá colher entre 46,98 e 50,16 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado. O resultado representa uma redução entre 7,6% e 1,3%, quando comparada com a produção obtida no ano agrícola anterior. Essa redução se deve ao ano de baixa produção, em razão da bienalidade que normalmente ocorre nessa cultura (CONAB, 2013). A produção do café arábica representa 74,71% (34,99 a 37,47 milhões de sacas) da produção do País, e tem como maior produtor o Estado de Minas Gerais, com 67,93% (24,25 a 25,45 milhões de sacas) de café beneficiado. O café robusta participa da produção nacional com 25,29% de café beneficiado, destacando o estado do Espírito Santo como o maior produtor dessa espécie, com 77,30% (9,24 a 7, 869,81 milhões de sacas).

### **3.2. Antracnose dos frutos do cafeeiro- *Coffee Berry Disease* (CBD)**

Apesar do café arábica ser preferido pelos consumidores devido a sua melhor qualidade de bebida, segundo Nyoro e Sprey (1986) a sua produção é limitada devido a ocorrência de doenças graves, dentre elas a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*) e a CBD causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae*.

A ocorrência de CBD ainda se encontra restrita ao continente da África, onde é um dos principais entraves para a produção sustentável e econômica de café arábica naquela região. Essa doença corresponde a uma antracnose que pode causar perdas graves na safra de café na África sempre que as condições climáticas são

favoráveis ao patógeno (GRIFFITHS *et al.*, 1971; VAN DER GRAAFF, 1978; MASABA e WALLER, 1992).

Seu controle químico tem sido responsável por até 45% do custo anual de produção (NYORO e SPRAY, 1986; AGWANDA e OWUOR, 1989). Dessa forma, o desenvolvimento de cultivares resistentes é a principal estratégia de controle uma vez que o uso dessas cultivares reduzem a utilização de pesticidas e são seguros para os seres humanos e o meio ambiente.

Progenies do híbrido natural interespecífico entre *C. arabica* e *C. canephora*, denominado de Híbrido de Timor, que se originou na Ilha de Timor (BETTENCOURT, 1973), têm sido usado em todo o mundo como fonte de resistência a várias doenças, incluindo CBD, ferrugem e doenças causadas por nematóides.

Com base em estudos de herança, Van der Vossen e Walyaro (1980) propuseram a existência de um loco (denominado de T) para resistência à CBD no cafeeiro Híbrido de Timor. De acordo com Agwanda *et al.* (1997), a resistência à CBD é controlada por pelo menos três genes que estão presentes, no Híbrido de Timor e Catimor (gene T), Rume Sudan (genes R e k) e K7 (gene k). Em trabalho conduzido por Gichuru *et al.* (2008) eles designaram *Ck-1*, como o loco de resistência a *C. kahawae* onde eles sugerem ser esse loco semelhante ao loco T descrito por Van der Vossen e Walyaro (1980), entretanto eles não descartam a possibilidade de existência de um outro loco de resistência à CBD.

### **3.3. Ferrugem do cafeeiro**

Conhecida como a principal doença do cafeeiro, a ferrugem alaranjada, é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e verifica-se sua ocorrência em todas as regiões produtoras de café do mundo (VAN DER VOSSSEN, 2005).

O fungo que é responsável por causar danos e perdas severas na cultura do café, ataca principalmente as folhas e raramente os frutos, podendo causar a queda precoce de folhas e a seca de ramos, ocasionando redução da produção e da vida útil da lavoura (ZAMBOLIM *et al.*, 1997). Os anos de alta produção apresentam os maiores índices da doença, e as perdas podem chegar a 35-50%, dependendo das condições climáticas (SILVA *et al.*, 2006).

Para minimizar os prejuízos causados por esse fungo, o controle químico por meio do uso de fungicidas tem se mostrado eficiente. Entretanto, o elevado custo

da aplicação dos fungicidas e os danos causados ao meio ambiente tem motivado o melhoramento genético para obtenção de cultivares resistentes (WALLER *et al.*, 2007). O uso das cultivares resistentes, portanto, é considerada a melhor alternativa para o controle da doença, devido ao seu baixo custo, à sua eficiência, à facilidade de implantação e aos menores danos causados ao meio ambiente.

O uso de cultivares melhoradas é um dos principais fatores que contribuem para o sucesso da cafeicultura mundial, comprovando assim a importância do melhoramento genético nesse sentido. No entanto, o desenvolvimento de cultivares de cafeeiros com resistência durável representa um desafio para os melhoristas, devido ao surgimento e alternância de raças do patógeno, assim como a ocorrência de raças complexas que ilustram o potencial evolutivo da população de *H. vastatrix* (CABRAL *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2013), característica muito comum à maioria de patógenos biotróficos, especialmente os causadores de ferrugens.

Ainda não se conhecem bem os mecanismos que conduzem à criação de raças de *H. vastatrix*. Como a fase sexual do fungo ainda não foi encontrada considera-se a mutação como o principal mecanismo responsável pela criação de variabilidade no fungo e a pressão de seleção exercida pelos genes de resistência do hospedeiro responsável pelo aumento de mutantes virulentos na população (VÁRZEA e MARQUES, 2005). Um estudo recente de citometria de imagem do conteúdo de DNA revelou a presença de um tipo inédito de reprodução sexual oculta dentro dos esporos assexuais de *H. vastatrix*, denominada de criptossexualidade (CARVALHO *et al.*, 2011). Segundo os autores, esse tipo de reprodução poderia explicar o surgimento frequente e rápido de novas raças fisiológicas de *H. vastatrix*.

#### **3.4. Melhoramento para resistência a *Hemileia vastatrix***

Na busca por estratégias voltadas para o melhoramento do cafeeiro visando à obtenção de resistência à ferrugem é importante ter o conhecimento das raças fisiológicas do patógeno e os genes que condicionam resistência às diferentes raças. Portanto faz-se necessário o conhecimento prévio das raças fisiológicas predominantes na região onde se desenvolvem os programas de melhoramento e onde se pretende introduzir determinado tipo de resistência.

O Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) em Oeiras, Portugal, caracterizou, até o momento, 49 raças de *H. vastatrix* no mundo (GICHURU *et al.*, 2012; VÁRZEA e MARQUES, 2005). No Brasil, foram

identificadas, 16 raças fisiológicas do fungo (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII, XXXVII) (ZAMBOLIM *et al.*, 2005; CABRAL *et al.*, 2009; CAPUCHO *et al.*, 2012), sendo verificado que a raça II ocorre com maior frequência (ZAMBOLIM *et al.*, 2005).

Estudos clássicos de genética mostraram que a resistência à ferrugem do cafeeiro parece ser determinada por pelo menos nove genes que podem ocorrer isoladamente ou em combinação, os quais são denominados de  $S_H1$  a  $S_H9$  (BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988). No entanto, poucas pesquisas moleculares sobre estes genes estão disponíveis.

Esses genes são dominantes e aparentemente independentes (BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988). Em *C. arabica*, foram identificados quatro genes dominantes  $S_H1$ ,  $S_H2$ ,  $S_H4$  e  $S_H5$ , simples ou associados (BETTENCOURT e NORONHA-WAGNER, 1971), enquanto em *C. canephora* estão presentes os genes  $S_H6$ ,  $S_H7$ ,  $S_H8$  e  $S_H9$  (BETTENCOURT *et al.*, 1980). Também o gene  $S_H3$  derivado da introgressão de *C. liberica* em *C. arabica* têm proporcionado resistência com durabilidade apreciável, sendo, portanto importante à identificação de indivíduos portadores desse gene no programa de melhoramento genético. Além desses genes, admite-se haver outros ainda não identificados.

Esses diferentes genes de resistência à ferrugem têm sido manipulados nos diferentes programas de melhoramento no Brasil, o que resultou no lançamento de 71 cultivares com algum tipo de resistência conforme o Registro Nacional do Ministério. No entanto, algumas dessas cultivares já tiveram sua resistência suplantada, justificando o contínuo investimento na obtenção de novas cultivares com resistência durável.

Uma estratégia que pode auxiliar no melhoramento é a identificação de genótipos portadores de diferentes genes de resistência por meio de marcadores moleculares. Esses marcadores moleculares uma vez detectados como ligados aos genes de resistência, podem ser utilizados para seleção precoce de genótipos resistentes, reduzindo o tempo necessário para o desenvolvimento e manipulação de grandes populações, e para estimar parâmetros usados na seleção indireta (CAIXETA *et al.*, 2009), além de servirem de fontes para clonagem de genes de resistência.

Embora a resistência à ferrugem tenha sido amplamente estudada e documentada, a elaboração de estratégias que envolvam o uso de marcadores moleculares é limitada (HERRERA *et al.*, 2009).

### ***3.5. Uso de marcadores moleculares***

O advento das técnicas de marcadores moleculares impulsionou a pesquisa genética, propiciando a detecção de polimorfismos de DNA com comportamento mendeliano, passível de ser utilizado em diferentes áreas da genética e do melhoramento de plantas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O surgimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tornou possível aliar o poder de informação gerada por marcadores moleculares à rapidez do processo de genotipagem (MULLIS e FALOONA, 1987). Estes marcadores, utilizados na caracterização e avaliação de germoplasma e na identificação de genes de importância agrônômica, têm permitido obter avanços consideráveis nos programas de melhoramento genético de diferentes culturas.

O uso potencial dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas é bastante amplo, destacando-se a identificação e discriminação de genótipos; quantificação da variabilidade genética ao nível de sequências de nucleotídeos no DNA e sua correlação com a expressão fenotípica; identificação de origem parental e testes de paternidade; identificação e proteção de cultivares; avaliação de linhagens pela previsão da produtividade de seus híbridos; alocação de linhagens em grupos heteróticos; certificação de pureza genética; monitoramento de cruzamentos; caracterização de germoplasma; estudos de diversidade e distância genética; construção de mapas genéticos; e auxílio na seleção (GUIMARÃES e MOREIRA, 1999).

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. Assim, a utilização de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças facilitariam a piramidação desses genes em cultivares comerciais de interesse agrônômico (ALZATE-MARIN *et al.*, 2001). Dessa forma, as técnicas moleculares oferecem novas oportunidades

para a manipulação dos genes de resistência associados à Seleção Assistida por Marcadores (SAM) (GEFFROY *et al.*, 1998).

Vários marcadores moleculares estão disponíveis atualmente, entre eles os microssatélites (BRUNELLI *et al.*, 2002; CHIN *et al.*, 1996; YU *et al.*, 1994) e os “*Sequence Characterized Amplified Regions*” (SCAR) comumente utilizados em estratégias de seleção no melhoramento e estudos relacionados a identificação, estrutura e função dos genes que codificam para a resistência a patógenos.

Os SSR são distribuídos de maneira aleatória em genomas eucariotos (BRUNELLI *et al.*, 2002; CAIXETA *et al.*, 2006; HEARNE *et al.*, 1992). As sequências 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, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Apresentam como vantagem o fato de serem codominantes, sendo capazes de diferenciar indivíduos heterozigotos de homozigotos; são altamente polimórficos, sendo importante para espécies com base genética estreita; excelente para o uso em seleção assistida e identificação de genótipos (*fingerprinter*) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores do tipo SCAR são altamente específicos e não apresentam os problemas típicos de reprodutibilidade dos marcadores RAPD sendo, portanto mais estável e preciso. Esses marcadores representam locos únicos geneticamente definidos, identificados por amplificação de PCR de DNA genômico, com pares de *primers* específicos de oligonucleotídeos. Marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores SCAR. Neste caso, a banda de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonada, sequenciada e dois *primers* mais longos que o original são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador, só que agora numa temperatura de anelamento mais elevada. Nessa condição, o processo de amplificação é mais estável e reprodutível (PARAN e MICHELMORE, 1993).

### **3.6. Seleção assistida por marcadores moleculares**

Os marcadores de DNA podem ser uma ferramenta importante e bastante útil no processo de transferência de alelos de resistência, podendo ser usados na seleção assistida por marcadores (SAM). A utilização de SAM é particularmente útil no processo de transferência de alelos de resistência, por anular o efeito do ambiente e permitir a seleção na ausência do patógeno ou da raça do patógeno. Além disso, os

marcadores de DNA são livres de efeitos pleiotrópicos, permitindo o monitoramento de qualquer número de marcadores em uma única população. A análise desses marcadores pode ser executada em qualquer estágio do ciclo de vida de uma planta e a partir de quase qualquer tipo de tecido. No melhoramento de plantas, eles podem ser usados em gerações altamente segregantes, permitindo a eliminação dos genótipos indesejáveis nas primeiras gerações de seleção (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A SAM é mais efetiva quanto mais próximo o marcador molecular estiver do loco de interesse, reduzindo assim a possibilidade de ocorrer uma recombinação entre os mesmos (SINGH *et al.*, 2001)

Marcadores moleculares ligados a genes de resistência à ferrugem foram identificados em várias espécies de interesse agrônômico ao longo de estudos realizados nos últimos anos, como por exemplo, na cultura do trigo, onde marcadores ligados ao gene de resistência a *Puccinia recondita* f. Sp. *tritici* tem sido obtidos em *Triticum aestivum* e em espécies selvagens do mesmo gênero (CHELKOWSKI e STEPIEN, 2001). Prabhu *et al.* (1998) identificaram dois marcadores moleculares flanqueando genes de resistência à ferrugem branca, causada por *Albugo candida* no gênero *Brassica*. Em espécies leguminosas, dois marcadores ligados ao gene de resistência determinando resposta de hipersensibilidade ao fungo *Uromyces viciaefabae*, foram obtidos através do uso da metodologia de BSA (*Bulks Segregants Analysis*) (ÁVILA *et al.*, 2003).

Já em espécies do gênero *Coffea*, ressalta-se que poucas informações estão disponíveis a este nível uma vez que se verifica que poucos marcadores ligados a genes de resistência à ferrugem do cafeeiro foram obtidos até o momento. Foram identificados e disponibilizados marcadores ligados aos genes S<sub>H</sub>3 originado de Seleções da Índia (PRAKASH *et al.*, 2004; MAHÉ *et al.*, 2008) e S<sub>H</sub>? proveniente de um acesso de Híbrido de Timor (UFV443-03) (BRITO *et al.*, 2010; DIOLA *et al.*, 2011).

O primeiro trabalho de mapeamento de genes de resistência a *H. vastatrix* em *Coffea* spp. foi realizado com marcadores AFLP (PRAKASH *et al.*, 2004). Esse trabalho foi realizado em uma população F<sub>2</sub> oriunda de *C. liberica*, constituída por um total de 101 plantas portadoras do gene de resistência S<sub>H</sub>3. Os autores mapearam 21 marcas AFLP ligadas a este gene de resistência à ferrugem.

No estudo feito por Mahé *et al.* (2008), o material vegetal analisado consistiu em duas populações segregantes de *C. arabica* envolvendo a cultivar

Matari, suscetível a ferrugem, e a Seleção Indiana S.288, que contém o gene  $S_H3$  introgridido de *C. liberica* (PRAKASH *et al.*, 2004). Uma população  $F_2$  (Matari x S.288) de 101 indivíduos e um retrocruzamento ( $BC_2$ ) da população [(Matari x S.288) x Matari] x Matari de 43 indivíduos. A seleção S.288 é derivada de uma descendência de autofecundação S.26, um híbrido natural entre *C. arabica* e *C. liberica*. Os dois materiais parentais, também foram incluídos na análise.

Mahé *et al.* (2008), converteu com sucesso alguns marcadores AFLP identificados por Prakash *et al.* (2004) para marcadores SCAR. Quatro desses marcadores AFLP foram transformados em SCAR e juntamente com outros três marcadores SCAR proveniente de extremidade de BAC e três SSR formaram dois pequenos grupos de ligação (5,7 cM e 5,9 cM) contendo o gene de resistência (MAHÉ *et al.*, 2008). Esses 10 marcadores moleculares, por estarem proximamente ligados ao gene de resistência, podem ser utilizados em estudos de seleção assistida por marcadores moleculares em café para o gene  $S_H3$  que confere resistência à ferrugem.

De acordo com Mahé *et al.* (2008) os marcadores AFLP por si só são limitantes na aplicação direta em seleção assistida, o que justifica sua transformação em marcadores derivados, cujo o objetivo foi obter um marcador molecular mais estável e preciso. Dessa forma, além da aplicação direta em técnicas moleculares de localização, identificação e estudo do gene de resistência, os marcadores SCAR possuem um potencial ilimitado. Por exemplo, podem ser usados para o monitoramento do gene em programas de melhoramento do cafeeiro ao longo das gerações visando à obtenção de resistência à raça fisiológica específica de ferrugem e aplicação imediata em seleção assistida por marcadores. Pode ainda contribuir efetivamente, aumentando a eficiência e reduzindo o tempo de seleção das novas cultivares.

Em trabalho conduzido por Brito *et al.* (2010), utilizaram-se para o estudo, 160 plantas  $F_2$  oriundas da  $F_1$  H 421-4, cruzamento artificial entre o acesso do Híbrido de Timor UFV427-15 (CIFC 1343-136) genitor resistente, e o Catuaí Amarelo UFV 2143-236 (IAC 30) suscetível. Para obtenção dos retrocruzamentos (RC), a planta  $F_1$  foi retrocruzada com o Catuaí amarelo UFV2143-236 e com o Híbrido de Timor UFV 427-15. A população segregante  $F_2$  foi obtida pela autofecundação controlada da planta  $F_1$ .

Brito *et al.* (2010) identificaram três marcadores AFLP ligados aos genes de resistência do Híbrido de Timor, utilizando-se a técnica BSA (*Bulk Segregant Analysis*), proposta por Michelmore *et al.* (1991). Em continuação a esse trabalho, Diola *et al.* (2011) trabalhando com uma população segregante de 224 plantas da geração F<sub>2</sub> oriundas da autofecundação controlada da planta F<sub>1</sub> UFV421-4, obteve um mapa genético saturado com 25 marcadores AFLP que possibilitou a elaboração de um mapa genético de alta densidade com seis marcadores SCAR delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM e flanqueando o gene de resistência a 0,7 e 0,9 cM.

A utilização da SAM com marcadores ligados ao genes S<sub>H3</sub> e S<sub>H</sub>? permite a piramidação de genes, por meio da introgressão de mais de um gene de resistência à ferrugem em uma cultivar. Essa é uma estratégia que vem sendo considerada como uma forma de desenvolver cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro.

A resistência durável às raças específicas de *H. vastatrix* pode perdurar por apenas algumas décadas (PRAKASH *et al.*, 2004), mas o uso de marcadores, por meio de técnicas de piramidação de genes em genótipos elites, auxilia na diminuição deste efeito. Além disso, pode existir semelhança entre este gene de resistência e outros, facilitando o acúmulo de informações moleculares geradas, contribuindo para acelerar e facilitar a identificação de outros genes de resistência em plantas (ROSEWARNE *et al.*, 2005).

Além de incorporar genes de resistência à ferrugem, por meio da SAM seria possível também introduzir em cultivares de café gene de resistência à CBD. Como essa doença (CBD) felizmente não se encontra presente no Brasil, a seleção de materiais genéticos resistentes nesse caso de ausência do patógeno, só é possível por meio da utilização da seleção assistida por marcador molecular. Essa estratégia permitiria um melhoramento preventivo em países onde a CBD ainda não está presente (América Latina, Ásia), mas as condições climáticas são favoráveis.

Gichuru *et al.* (2008) identificaram e mapearam oito marcadores AFLP e dois microssatélites (CBD-Sat235 e CBD-Sat207) ligados ao fenótipo de resistência à CBD. A fonte de resistência utilizada no trabalho foi o Catimor 88 e Catimor 127. O gene designado *Ck-1*, que provavelmente é semelhante ao gene T previamente descrito por Van der Vossen e Walyaro (1980), ficou localizado em um segmento de 11 cM.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material Genético

Folhas jovens de 160 cafeeiros com potencial para serem portadores de resistência à ferrugem (Tabelas 1 e 2) foram coletadas e o DNA extraído utilizando a metodologia descrita por Diniz *et al.* (2005). Esses cafeeiros foram introduzidos pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com objetivo de disponibilizar fontes de resistência à ferrugem para os Programas de Melhoramento Genético do Cafeeiro. Foram obtidos do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro - CIFC em Oeiras, Portugal e quando chegaram ao Brasil foram avaliados com uma mistura de raças de patógeno coletados nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Os cafeeiros resistentes foram implantados no Campo de Adaptação e Seleção na Área Experimental do Fundão na UFV.

Tabela 1. Acessos de cafeeiro originados de cruzamentos de fontes de resistência à ferrugem contendo o gene  $S_H3$  (Seleções Indianas) com cultivares de porte baixo (Caturra e Catuaí)

Nº de Registro das Plantas	Geração	Nº de Registro das Plantas	Geração	Nº de Registro das Plantas	Geração
UFV 311-27	F <sub>2</sub>	UFV 317- 02	F <sub>1</sub>	UFV 336-05	F <sub>1</sub>
UFV 311-30	F <sub>2</sub>	UFV 317-12	F <sub>1</sub>	UFV 336-06	F <sub>1</sub>
UFV 311-48	F <sub>2</sub>	UFV 317-19	F <sub>1</sub>	UFV 336-08	F <sub>1</sub>
UFV 311-49	F <sub>2</sub>	UFV 317-22	F <sub>1</sub>	UFV 336-10	F <sub>1</sub>
UFV 311-56	F <sub>2</sub>	UFV 317-52	F <sub>1</sub>	UFV 336-29	F <sub>1</sub>
UFV 311-63	F <sub>2</sub>	UFV 317-59	F <sub>1</sub>	UFV 336-34	F <sub>1</sub>
UFV 312-96	F <sub>2</sub>	UFV 317-60	F <sub>1</sub>	UFV 336-35	F <sub>1</sub>
UFV 313-96	F <sub>2</sub>	UFV 317-69	F <sub>1</sub>	UFV 336-37	F <sub>1</sub>
UFV 313-107	F <sub>2</sub>	UFV 334-03	F <sub>2</sub>	UFV 336-39	F <sub>1</sub>
UFV 313-133	F <sub>2</sub>	UFV 334-04	F <sub>2</sub>	UFV 337-01	F <sub>1</sub>
UFV 314-44	F <sub>2</sub>	UFV 334-07	F <sub>2</sub>	UFV 337-16	F <sub>1</sub>
UFV 316-12	F <sub>1</sub>	UFV 334-08	F <sub>2</sub>	UFV 337-18	F <sub>1</sub>
UFV 316-13	F <sub>1</sub>	UFV 334-09	F <sub>2</sub>	UFV 337-19	F <sub>1</sub>
UFV 316-15	F <sub>1</sub>	UFV 334-63	F <sub>2</sub>	UFV 337-20	F <sub>1</sub>
UFV 316-17	F <sub>1</sub>	UFV 334-64	F <sub>2</sub>	UFV 337-29	F <sub>1</sub>
UFV 316-21	F <sub>1</sub>	UFV 334-65	F <sub>2</sub>	UFV 337-30	F <sub>1</sub>
UFV 316-32	F <sub>1</sub>	UFV 334-66	F <sub>2</sub>	UFV 339-01	F <sub>1</sub>
UFV 316-33	F <sub>1</sub>	UFV 334-67	F <sub>2</sub>	UFV 339-02	F <sub>1</sub>
UFV 316-35	F <sub>1</sub>	UFV 334-68	F <sub>2</sub>	UFV 339-07	F <sub>1</sub>
UFV 316-43	F <sub>1</sub>	UFV 334-93	F <sub>2</sub>	UFV 339-10	F <sub>1</sub>
UFV 316-59	F <sub>1</sub>	UFV 334-128	F <sub>2</sub>	UFV 339-25	F <sub>1</sub>
UFV 316-66	F <sub>1</sub>	UFV 334-139	F <sub>2</sub>	UFV 339-34	F <sub>1</sub>
UFV 316-69	F <sub>1</sub>	UFV 336-01	F <sub>1</sub>	UFV 339-65	F <sub>1</sub>
UFV 316-70	F <sub>1</sub>	UFV 336-02	F <sub>1</sub>	UFV 339-100	F <sub>1</sub>
UFV 317-01	F <sub>1</sub>	UFV 336-04	F <sub>1</sub>	--	--

Tabela 2. Acessos de cafeeiros originados de cruzamentos de fontes de resistência à ferrugem contendo o gene  $S_{H3}$  (Seleções Indianas) com cultivares de porte alto (Mundo Novo e outras)

Nº de Registro das Plantas	Geração	Nº de Registro das Plantas	Geração	Nº de Registro das Plantas	Geração
UFV 315-01	F <sub>2</sub>	UFV 335-06	F <sub>2</sub>	UFV 409-04	F <sub>2</sub>
UFV 315-02	F <sub>2</sub>	UFV 335-07	F <sub>2</sub>	UFV 409-05	F <sub>2</sub>
UFV 315-04	F <sub>2</sub>	UFV 335-08	F <sub>2</sub>	UFV 409-06	F <sub>2</sub>
UFV 315-06	F <sub>2</sub>	UFV 335-11	F <sub>2</sub>	UFV 409-08	F <sub>2</sub>
UFV 315-15	F <sub>2</sub>	UFV 335-12	F <sub>2</sub>	UFV 409-12	F <sub>2</sub>
UFV 315-50	F <sub>2</sub>	UFV 335-13	F <sub>2</sub>	UFV 409-13	F <sub>2</sub>
UFV 315-76	F <sub>2</sub>	UFV 335-15	F <sub>2</sub>	UFV 409-14	F <sub>2</sub>
UFV 315-143	F <sub>2</sub>	UFV 335-16	F <sub>2</sub>	UFV 409-16	F <sub>2</sub>
UFV 327-04	F <sub>2</sub>	UFV 335-70	F <sub>2</sub>	UFV 409-17	F <sub>2</sub>
UFV 327-11	F <sub>2</sub>	UFV 335-77	F <sub>2</sub>	UFV 409-18	F <sub>2</sub>
UFV 327-13	F <sub>2</sub>	UFV 335-104	F <sub>2</sub>	UFV 409-20	F <sub>2</sub>
UFV 327-16	F <sub>2</sub>	UFV 335-121	F <sub>2</sub>	UFV 409-29	F <sub>2</sub>
UFV 327-18	F <sub>2</sub>	UFV 335-124	F <sub>2</sub>	UFV 409-30	F <sub>2</sub>
UFV 327-89	F <sub>2</sub>	UFV 335-130	F <sub>2</sub>	UFV 409-34	F <sub>2</sub>
UFV 327-117	F <sub>2</sub>	UFV 341-15	F <sub>2</sub>	UFV 409-36	F <sub>2</sub>
UFV 328-43	F <sub>2</sub>	UFV 399-23	F <sub>2</sub>	UFV 409-41	F <sub>2</sub>
UFV 328-60	F <sub>2</sub>	UFV 399-31	F <sub>2</sub>	UFV 409-42	F <sub>2</sub>
UFV 328-62	F <sub>2</sub>	UFV 399-33	F <sub>2</sub>	UFV 409-43	F <sub>2</sub>
UFV 328-69	F <sub>2</sub>	UFV 399-45	F <sub>2</sub>	UFV 409-47	F <sub>2</sub>
UFV 329-01	F <sub>2</sub>	UFV 402-01	F <sub>2</sub>	UFV 409-48	F <sub>2</sub>
UFV 329-63	F <sub>2</sub>	UFV 402-02	F <sub>2</sub>	UFV 409-49	F <sub>2</sub>
UFV 329-72	F <sub>2</sub>	UFV 402-04	F <sub>2</sub>	UFV 409-51	F <sub>2</sub>
UFV 329-78	F <sub>2</sub>	UFV 402-21	F <sub>2</sub>	UFV 480-06	F <sub>2</sub>
UFV 329-102	F <sub>2</sub>	UFV 402-36	F <sub>2</sub>	UFV 480-11	F <sub>2</sub>
UFV 335-01	F <sub>2</sub>	UFV 402-38	F <sub>2</sub>	UFV 480-12	F <sub>2</sub>
UFV 335-02	F <sub>2</sub>	UFV 402-49	F <sub>2</sub>	UFV 480-14	F <sub>2</sub>
UFV 335-03	F <sub>2</sub>	UFV 404-01	F <sub>2</sub>	UFV 480-15	F <sub>2</sub>
UFV 335-04	F <sub>2</sub>	UFV 409-01	F <sub>2</sub>	UFV 480-26	F <sub>2</sub>
UFV 335-05	F <sub>2</sub>	UFV 409-03	F <sub>2</sub>	--	--

Os materiais genéticos das Tabelas 1 e 2 foram obtidos, no CIFC, por meio de cruzamento entre cultivares de interesse agrônomico de porte baixo e porte alto com cafeeiros da Índia selecionados por serem portadores do gene  $S_{H3}$ . As fontes utilizadas de progênies portadoras do gene  $S_{H3}$  nessa população foram as seleções da Índia S.333, S.795, S.353, S.288 e BA16. As seleções indianas S.288, S.333 e S.353 e da série BA são derivadas de cafeeiros tetraplóides S.26 e S.31 (*C. arabica* x *C. liberica*) retrocruzados ou não com Kent ou Coorg, e possuem os genes  $S_{H2}$ ,  $S_{H3}$  e  $S_{H5}$ . A genealogia da população de estudo está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Genealogia dos 160 genótipos de cafeeiro da população de estudo.

<b>Nº de Registro das Plantas</b>	<b>Geração</b>	<b>Genealogia</b>
UFV 311-27	F <sub>2</sub>	
UFV 311-30	F <sub>2</sub>	
UFV 311-48	F <sub>2</sub>	CIFC H227/1=Caturra Amarelo CIFC 426/2 x S.333
UFV 311-49	F <sub>2</sub>	CIFC 254/14
UFV 311-56	F <sub>2</sub>	
UFV 311-63	F <sub>2</sub>	
UFV 312-96	F <sub>2</sub>	CIFC H275/1=Caturra Vermelho CIFC 19/1 x S.795 CIFC 1344/19
UFV 313-96	F <sub>2</sub>	
UFV 313-107	F <sub>2</sub>	CIFC H275/7=Caturra Vermelho CIFC 19/1 x S.795
UFV 313-133	F <sub>2</sub>	CIFC 1344/19
UFV 314-44	F <sub>2</sub>	CIFC H275/13Caturra Vermelho CIFC 19/1 x S.795 CIFC 1344/19
UFV 316-12	F <sub>1</sub>	
UFV 316-13	F <sub>1</sub>	
UFV 316-15	F <sub>1</sub>	
UFV 316-17	F <sub>1</sub>	
UFV 316-21	F <sub>1</sub>	
UFV 316-32	F <sub>1</sub>	CIFC H512=Caturra Vermelho CIFC 1640/28 x
UFV 316-33	F <sub>1</sub>	CIFC H.239/11 (Villa Lobos CIFC 954/1 x S.333
UFV 316-35	F <sub>1</sub>	CIFC 254/14)
UFV 316-43	F <sub>1</sub>	
UFV 316-59	F <sub>1</sub>	
UFV 316-66	F <sub>1</sub>	
UFV 316-69	F <sub>1</sub>	
UFV 316-70	F <sub>1</sub>	
UFV 317-01	F <sub>1</sub>	
UFV 317-02	F <sub>1</sub>	
UFV 317-12	F <sub>1</sub>	
UFV 317-19	F <sub>1</sub>	CIFC H525=Caturra Vermelho CIFC 1640/28 x
UFV 317-22	F <sub>1</sub>	CIFC H.275/7 (Caturra Vermelho CIFC 19/1 x S.795
UFV 317-52	F <sub>1</sub>	CIFC1344/19)
UFV 317-59	F <sub>1</sub>	
UFV 317-60	F <sub>1</sub>	
UFV 317-69	F <sub>1</sub>	

- = autofecundação não controlada

/ = autofecundação controlada

Tabela 3. Continuação.

<b>Nº de Registro das Plantas</b>	<b>Geração</b>	<b>Genealogia</b>
UFV 334-03	F <sub>2</sub>	
UFV 334-04	F <sub>2</sub>	
UFV 334-07	F <sub>2</sub>	
UFV 334-08	F <sub>2</sub>	
UFV 334-09	F <sub>2</sub>	
UFV 334-63	F <sub>2</sub>	
UFV 334-64	F <sub>2</sub>	CIFC H275/11=Caturra Vermelho CIFC 19/1 x
UFV 334-65	F <sub>2</sub>	S.795 CIFC 1344/19
UFV 334-66	F <sub>2</sub>	
UFV 334-67	F <sub>2</sub>	
UFV 334-68	F <sub>2</sub>	
UFV 334-93	F <sub>2</sub>	
UFV 334-128	F <sub>2</sub>	
UFV 334-139	F <sub>2</sub>	
UFV 336-01	F <sub>1</sub>	
UFV 336-02	F <sub>1</sub>	
UFV 336-04	F <sub>1</sub>	
UFV 336-05	F <sub>1</sub>	
UFV 336-06	F <sub>1</sub>	CIFC H524=Caturra Amarelo CIFC 1637/48 x CIFC
UFV 336-08	F <sub>1</sub>	HW 3/5
UFV 336-10	F <sub>1</sub>	(Blue Mountain CIFC 187/8 x S.353 4/5 CIFC 34/13)
UFV 336-29	F <sub>1</sub>	
UFV 336-34	F <sub>1</sub>	
UFV 336-35	F <sub>1</sub>	
UFV 336-37	F <sub>1</sub>	
UFV 336-39	F <sub>1</sub>	
UFV 337-01	F <sub>1</sub>	
UFV 337-16	F <sub>1</sub>	CIFC H526=Catuai Vermelho CIFC 2481/1 x CIFC
UFV 337-18	F <sub>1</sub>	H.275/3
UFV 337-19	F <sub>1</sub>	(Caturra Vermelho CIFC 19/1 x S.795 CIFC
UFV 337-20	F <sub>1</sub>	1344/19)
UFV 337-29	F <sub>1</sub>	
UFV 337-30	F <sub>1</sub>	
UFV 339-01	F <sub>1</sub>	
UFV 339-02	F <sub>1</sub>	
UFV 339-07	F <sub>1</sub>	CIFC H527=Caturra Amarelo CIFC 1637/48 x CIFC
UFV 339-10	F <sub>1</sub>	H.79/1
UFV 339-25	F <sub>1</sub>	(S.4 Agaro CIFC 110/5 x S.288-23 CIFC 33/1)
UFV 339-34	F <sub>1</sub>	
UFV 339-65	F <sub>1</sub>	
UFV 339-100	F <sub>1</sub>	

- = autofecundação não controlada

/ = autofecundação controlada

Tabela 3. Continuação.

<b>Nº de Registro das Plantas</b>	<b>Geração</b>	<b>Genealogia</b>
UFV 315-01	F <sub>2</sub>	
UFV 315-02	F <sub>2</sub>	
UFV 315-04	F <sub>2</sub>	CIFC H315/2=Mundo Novo CIFC 1535/181 x S.795
UFV 315-06	F <sub>2</sub>	
UFV 315-15	F <sub>2</sub>	CIFC 1344/19
UFV 315-50	F <sub>2</sub>	
UFV 315-76	F <sub>2</sub>	
UFV 315-143	F <sub>2</sub>	
UFV 327-04	F <sub>2</sub>	
UFV 327-11	F <sub>2</sub>	
UFV 327-13	F <sub>2</sub>	CIFC H101/39=S. 333 CIFC 254/14 x Dilla & Alghe
UFV 327-16	F <sub>2</sub>	
UFV 327-18	F <sub>2</sub>	CIFC 128/2
UFV 327-89	F <sub>2</sub>	
UFV 327-117	F <sub>2</sub>	
UFV 328-43	F <sub>2</sub>	CIFC H153/11=Geisha CIFC 87/1 x S.288/23 CIFC
UFV 328-60	F <sub>2</sub>	
UFV 328-62	F <sub>2</sub>	33/1
UFV 328-69	F <sub>2</sub>	
UFV 329-01	F <sub>2</sub>	
UFV 329-63	F <sub>2</sub>	CIFC H173/2=Dilla & Alghe CIFC 128/2 x S. 333
UFV 329-72	F <sub>2</sub>	
UFV 329-78	F <sub>2</sub>	CIFC 254/19
UFV 329-102	F <sub>2</sub>	
UFV 335-01	F <sub>2</sub>	
UFV 335-02	F <sub>2</sub>	
UFV 335-03	F <sub>2</sub>	
UFV 335-04	F <sub>2</sub>	
UFV 335-05	F <sub>2</sub>	
UFV 335-06	F <sub>2</sub>	
UFV 335-07	F <sub>2</sub>	
UFV 335-08	F <sub>2</sub>	
UFV 335-11	F <sub>2</sub>	CIFC H315/3=Mundo Novo CIFC 1535/181 x S.795
UFV 335-12	F <sub>2</sub>	
UFV 335-13	F <sub>2</sub>	CIFC 1344/19
UFV 335-15	F <sub>2</sub>	
UFV 335-16	F <sub>2</sub>	
UFV 335-70	F <sub>2</sub>	
UFV 335-77	F <sub>2</sub>	
UFV 335-104	F <sub>2</sub>	
UFV 335-121	F <sub>2</sub>	
UFV 335-124	F <sub>2</sub>	
UFV 335-130	F <sub>2</sub>	
UFV 341-15	F <sub>2</sub>	CIFC H309/9=S.353 4/5 CIFC 34/13-53xS.4 Agaro CIFC110/5

- = autofecundação não controlada

/ = autofecundação controlada

Tabela 3. Continuação.

<b>Nº de Registro das Plantas</b>	<b>Geração</b>	<b>Genealogia</b>
UFV 399-23	F <sub>2</sub>	CIFC H81(F <sub>1</sub> ) e IIAA 557/2=BE 5 Wush-Wush CIFC 810/5 x S.288/23 CIFC 33/1
UFV 399-31	F <sub>2</sub>	
UFV 399-33	F <sub>2</sub>	
UFV 399-45	F <sub>2</sub>	
UFV 402-01	F <sub>2</sub>	CIFC H214/6=S.333 CIFC 254/14 x S.12 Kaffa CIFC 635/3/6
UFV 402-02	F <sub>2</sub>	
UFV 402-04	F <sub>2</sub>	
UFV 402-21	F <sub>2</sub>	
UFV 402-36	F <sub>2</sub>	
UFV 402-38	F <sub>2</sub>	
UFV 402-49	F <sub>2</sub>	
UFV 404-01	F <sub>2</sub>	CIFC H225/3=BA 16 CIFC 101/4 x S.12 Kaffa CIFC 635/3/3
UFV 409-01	F <sub>2</sub>	CIFC H315/4=Mundo Novo CIFC 1535/181 x S.795 CIFC 1344/19
UFV 409-03	F <sub>2</sub>	
UFV 409-04	F <sub>2</sub>	
UFV 409-05	F <sub>2</sub>	
UFV 409-06	F <sub>2</sub>	
UFV 409-08	F <sub>2</sub>	
UFV 409-12	F <sub>2</sub>	
UFV 409-13	F <sub>2</sub>	
UFV 409-14	F <sub>2</sub>	
UFV 409-16	F <sub>2</sub>	
UFV 409-17	F <sub>2</sub>	
UFV 409-18	F <sub>2</sub>	
UFV 409-20	F <sub>2</sub>	
UFV 409-29	F <sub>2</sub>	
UFV 409-30	F <sub>2</sub>	
UFV 409-34	F <sub>2</sub>	
UFV 409-36	F <sub>2</sub>	
UFV 409-41	F <sub>2</sub>	
UFV 409-42	F <sub>2</sub>	
UFV 409-43	F <sub>2</sub>	
UFV 409-47	F <sub>2</sub>	
UFV 409-48	F <sub>2</sub>	
UFV 409-49	F <sub>2</sub>	
UFV 409-51	F <sub>2</sub>	
UFV 480-06	F <sub>2</sub>	CIFC H101/?=S.333 CIFC 254/14 x Dilla & Alghe CIFC 128/2
UFV 480-11	F <sub>2</sub>	
UFV 480-12	F <sub>2</sub>	
UFV 480-14	F <sub>2</sub>	
UFV 480-15	F <sub>2</sub>	
UFV 480-26	F <sub>2</sub>	

- = autofecundação não controlada

/ = autofecundação controlada

#### **4.2. Validação dos marcadores ligados ao gene $S_{H3}$ que confere resistência à ferrugem do cafeeiro**

Para validação dos marcadores moleculares, foram usados três genótipos sabidamente portadores do gene  $S_{H3}$ , CIFC H147, S.288 e CIFC H153/2. O genótipo CIFC H147 corresponde a um híbrido resultante do cruzamento da seleção indiana S.353 e S4 Agaro; o CIFC H153/2 entre a seleção indiana S.288 e Geisha. Esses cafeeiros foram utilizados por serem clones diferenciadores de raças de *H. vastatrix*, que por terem o gene  $S_{H3}$ , permitem identificar as raças portadoras do gene de virulência v3. Foram coletados também dois cafeeiros suscetíveis à ferrugem e que, portanto, não possuem o gene  $S_{H3}$ , Caturra Vermelho (CIFC 19/1), genitor de alguns dos cafeeiros da população analisada no presente estudo e Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV2148/57). Folhas destes cinco cafeeiros utilizados como controles foram coletadas e seu DNA extraído utilizando a metodologia descrita por Diniz *et al.* (2005).

A amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25 $\mu$ l, contendo 50ng de DNA genômico; tampão 1X da enzima; 2,0mM de  $MgCl_2$ ; 0,1mM de dNTP; 0,4 $\mu$ M de cada *primer* e 0,5 unidade Taq DNA polimerase. As reações foram conduzidas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*) e consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, com temperaturas de anelamento específica para cada *primer*, por 45 segundos e extensão de 72°C por 45 segundos; e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Do total de dez marcadores ligados ao gene  $S_{H3}$  de resistência à ferrugem obtidos em estudos conduzidos por Mahé *et al.* (2008), foram testados cinco, Sp-M8-SH3, Sp-M16-SH3, Sat244, BA-48-21O-f e BA-124-12K-f. Estes marcadores foram selecionados por estarem em acoplamento e localizados mais próximos do gene  $S_{H3}$ .

#### **4.3. Validação dos marcadores SCAR ligados ao gene $S_H$ ? do Híbrido de Timor que confere resistência à ferrugem do cafeeiro**

A validação dos marcadores ligados ao gene  $S_H$ ? presente no Híbrido de Timor, que conferem resistência a outras raças de *H. vastatrix*, foi realizada utilizando os acessos dos Híbridos de Timor UFV427-15 e UFV443-03 e o genótipo UFV H421-4 como portadores do gene de resistência. Como controles suscetíveis, não portadores do gene, foram usados Catuaí Amarelo IAC 30 (UFV2143-236) e

Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV2148-57). Os cafeeiros UFV427-15 e UFV2143-236 correspondem aos genitores e o UFV H421-4 a planta F<sub>1</sub> utilizados por Diola *et al.* (2011) para identificação dos marcadores que estão sendo validados no presente estudo.

Para a condução das reações de amplificação foram utilizados os seis marcadores SCAR, SCAR M18, SCAR M20, SCAR M23, SCAR M1, SCAR M19 e SCAR M24, identificados por Diola *et al.* (2011). As reações de amplificação por PCR foram conduzidas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*), utilizando 100ng de DNA genômico; tampão 1X da enzima; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTP; 0,25pmol de cada *primer*; 0,5 unidade de Taq DNA polimerase e água ultra pura para completar o volume final de 20 µl. A amplificação consistiu em uma fase inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, com temperaturas de anelamento específica para cada *primer*, por 30 segundos e extensão de 72° C por 60 segundos; e extensão final a 72° C por 10 minutos.

#### **4.4. Validação dos marcadores SSR ligados ao gene *Ck-1* que confere resistência à antracnose dos frutos do cafeeiro**

Os marcadores ligados a resistência à CBD foram validados com os acessos dos Híbridos de Timor UFV377-15 e UFV440-10 e a cultivar MGS Catiguá 3, portadores do gene de resistência ao fungo *C. kahawae* e com os genótipos não portadores do gene, Caturra Vermelho (CIFC 19/1) e Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV2148-57). A cultivar MGS Catiguá 3 foi originada a partir do cruzamento artificial entre a cultivar Catuaí Amarelo IAC 86 e o Híbrido de Timor UFV 440-10. Além da resistência à CBD, essa cultivar apresenta resistência à ferrugem e ao nematoide das galhas (*Meloidogyne exigua*) (CARAVALHO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2010).

A amplificação por PCR com os marcadores SSR foi realizada em um volume total de 25µL, contendo: 50ng de DNA genômico, tampão 1X da enzima, 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM de dNTP, 0,4µM de cada *primer* e 0,5 unidade Taq DNA polimerase. As reações foram conduzidas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*) e consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 95° C por 5 minutos; 35 ciclos a 94° C por 45 segundos, com temperaturas de anelamento específica para cada *primer*, por um período de 45

segundos e extensão a 72° C por 45 segundos; e extensão final a 72° C por 10 minutos. Foram testadas e ajustadas as condições de amplificação de dois marcadores SSR que foram identificados e mapeados em trabalho conduzido por Gichuru *et al.* (2008), ligados ao fenótipo de resistência à CBD, onde o marcador CBD-Sat235 está co-segregando com o gene *Ck-1*, ao passo que o marcador CBD-Sat207 está a uma distância estimada de 17,2 cM.

#### ***4.5. Seleção assistida por marcadores moleculares***

O DNA desses cafeeiros foram amplificados com os marcadores validados, conforme reação descrita acima, e a detecção do polimorfismo realizada em gel de poliacrilamida desnaturante 6%, corado com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Brito *et al.* (2010). A observação dos padrões de bandas entre os genótipos foram avaliados comparando-se com o padrão de bandas apresentados pelos genótipos controles resistentes e suscetíveis, descritos nos itens anteriores. As leituras dos géis foram realizadas com base na presença ou ausência da marca (banda) de resistência.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***5.1. Seleção assistida para o gene $S_H3$ que confere resistência à ferrugem do cafeeiro***

Dos cinco marcadores moleculares testados no presente estudo, identificados por Mahé *et al.* (2008), após os ajustes das condições de amplificação, foram validados quatro destes marcadores os quais apresentaram bandas nítidas e o padrão de bandas esperado (Tabela 4).

Tabela 4. Marcadores validados e utilizados na análise, suas sequências e temperaturas de anelamento T(°C) validadas no presente trabalho e a distância entre o gene e o marcador molecular estimada no trabalho conduzido por Mahé *et al.* (2008).

Marcador	Sequência dos marcadores	T (°C)	Distância cM
SP-M16-SH3	R: ATCTAGCTTTGGAACATCGT	49	1,8
	F: TTAAGTGGAAACTTGGCTTG		
BA-124-12KF	R: TGCAGATTGATGGCACGTTA	56	0
	F: TGATTCGCTTGTGTGCGAG		
BA-48-21OR	R: ACTTGGCAGGCGTAATTGAA	52	0,6
	F: ACAGTGAATTCCCCAAGCAC		
Sat244	R: GCATACTAAGGAATTATCTGACTGCT	52	0
	F: GCATGTGCTTTTTGATGTCGT		

Desses marcadores validados, três se comportaram como codominantes SP-M16-SH3, Sat244 e BA-48-21OR e o marcador BA-124-12K apresentou padrão de dominante (Figura 1). No trabalho de Mahé *et al.* (2008), o Sat244 foi relatado como sendo marcador dominante, no entanto, observando a figura apresentada no artigo, observou-se um padrão codominante semelhante ao encontrado no presente estudo.

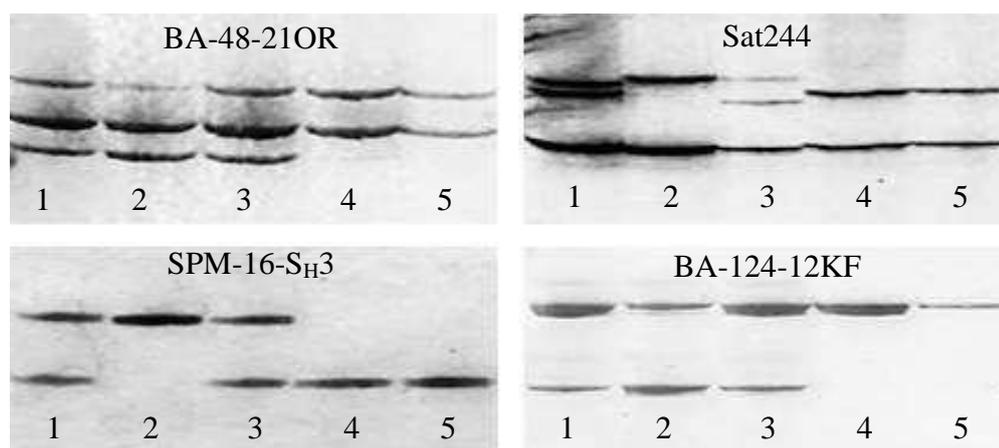


Figura 1. Validação dos marcadores moleculares ligados ao gene  $S_H3$  (BA-48-21OR, Sat244, SPM-16- $S_H3$  e BA-124-12KF) que confere resistência à ferrugem, utilizando três genótipos controles sabidamente portadores do gene de resistência, CIFIC H147 (1), S.288 (2), CIFIC H153/2 (3) e dois sabidamente suscetíveis, Caturra Vermelho CIFIC 19/1 (4) e Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV2148/57) (5).

Os marcadores validados foram utilizados para amplificar 160 cafeeiros da população obtida do CIFC e introduzida no Brasil como fonte de resistência à ferrugem, com potencial de serem portadores do gene  $S_{H3}$ .

Três marcadores (SP-M16-SH3, BA-124-12KF, Sat244) identificaram um total de 108 genótipos contendo a banda ligada ao gene  $S_{H3}$ (67,5%) e, portanto, considerados resistentes e 52 genótipos suscetíveis, sem a banda (32,5%). O marcador BA-48-21OR amplificou 107 genótipos resistentes (66,88%) e 53 suscetíveis (33,12%), diferindo dos demais marcadores apenas para o genótipo UFV 316-13 ( $F_1$ ). Com esse marcador o genótipo UFV 316-13 ( $F_1$ ) não apresentou a banda ligada ao gene de resistência  $S_{H3}$ . Esse genótipo, provavelmente, consiste em um recombinante (Figura 2).

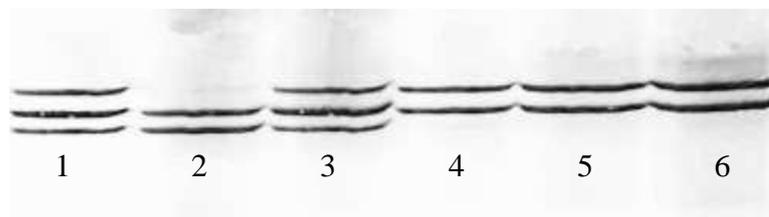


Figura 2. Amplificação dos três genótipos controles portadores do gene  $S_{H3}$ , CIFC H147 (1), S.288 (2), CIFC H153/2 (3) e dos dois genótipos não portadores do gene, Caturra Vermelho CIFC 19/1 (4) e Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV2148-57) (5) e do genótipo UFV316-13 (6), com o marcador BA-48-21OR ligado ao gene  $S_{H3}$  que confere resistência à ferrugem.

Além da análise dos genótipos como portadores ou não de resistência, foi possível distinguir os indivíduos homozigotos dos heterozigotos. Por meio dessa análise, foi possível identificar outros recombinantes. O genótipo UFV316-13 ( $F_1$ ) se mostrou suscetível com o marcador BA-48-21OR, ao passo que com os marcadores SP-M16-SH3 e Sat244 foi heterozigoto e, portanto apresentou a banda para resistência. Os genótipos UFV 327-89 ( $F_2$ ), UFV 334-07 ( $F_2$ ) e UFV335-70 ( $F_2$ ) foram resistentes e heterozigotos para o marcador BA-48-21OR e resistentes homozigotos para os outros dois marcadores codominantes. Foi possível verificar que UFV334-63( $F_2$ ) foi resistente homozigoto com os marcadores M16-SH3 e BA-48-21OR e resistente heterozigoto com o marcador Sat244. O genótipo UFV334-139 ( $F_2$ ) se apresentou resistente e heterozigoto para os marcadores BA-48-21OR e Sat244 e resistente homozigoto para o marcador M16-SH3.

Dessa forma, observou-se que com o marcador M16-SH3 foi obtido um recombinante e com o BA-48-21OR obteve-se quatro recombinantes. Esse resultado encontrado possivelmente se deve ao fato desses marcadores estarem flanqueando o gene  $S_{H3}$ , a uma distância de 1,8cM e 0,6cM, respectivamente (MAHÉ *et al.*, 2008) podendo, portanto, ter ocorrido possíveis recombinações entre o marcador e o gene.

Apesar de no trabalho conduzido por Mahé *et al.* (2008) o marcador Sat244 está completamente ligado ao gene de resistência  $S_{H3}$ , no presente trabalho foi observado um recombinante. Mahé *et al.* (2008) estimaram a distância do marcador e do gene em uma população diferente da usada no presente trabalho, além de ter sido utilizado um número reduzido de indivíduos, o que pode justificar a divergência de resultado encontrado.

Na SAM, usando os marcadores validados, foi possível identificar vários indivíduos portadores do gene  $S_{H3}$ , no entanto, para evitar que tenha ocorrido alguma recombinação e que se tenha mantido o marcador e perdido o gene, deve-se selecionar as plantas que apresentaram todos os marcadores e que esses marcadores estejam flanqueando o gene. Além disso, para maior eficiência na incorporação e condução dos genes de resistência nos programa de melhoramento deve-se selecionar preferencialmente os genótipos resistentes homozigotos. Atendendo esses dois requisitos, nesse trabalho foram selecionados os cafeeiros UFV311-48 ( $F_2$ ), UFV311-49 ( $F_2$ ), UFV 311-56 ( $F_2$ ), UFV313-133 ( $F_2$ ), UFV329-72 ( $F_2$ ), UFV329-78 ( $F_2$ ), UFV334-65 ( $F_2$ ), UFV335-12 ( $F_2$ ), UFV335-77 ( $F_2$ ), UFV399-45 ( $F_2$ ) e UFV409-08 ( $F_2$ ). Tais cafeeiros podem ser recomendados nos programas de melhoramento como genitores para novos cruzamentos (retrocruzamentos) com outros materiais genéticos de interesse agrônômico.

A importância de utilizar marcadores moleculares para identificar genótipos homozigotos resistentes em cafeeiros também foi demonstrado por Prakash *et al.* (2011). Nesse trabalho, foram testados três dos marcadores identificados por Mahé *et al.* (2008), sendo validados os marcadores Sat244 e BA-124-12K-f. O Sat244 também foi capaz de diferenciar os genótipos homozigotos e hetrozigotos. Esses marcadores foram analisados em uma população da cultivar arábica S.795, largamente cultivada na Índia a partir de 1947, que foi lançada como resistente à ferrugem naquela época, mas com o tempo foi apresentando diferentes severidades da doença. No entanto, por ainda se tratar de uma variedade de escolha de produtores de café arábica em áreas tradicionais na Índia, esse trabalho foi

conduzido a fim de identificar segregação do gene  $S_{H3}$  e selecionar genótipos com características desejadas e em homozigose. Assim, os dois marcadores provaram ser bastante confiáveis em confirmar a presença do gene  $S_{H3}$  e também a sua homozigose ou heterozigose (PRAKASH *et al.*, 2011).

Apesar de os genótipos resistentes homozigotos serem os de maiores interesse para os programas de melhoramento, foram identificados no presente trabalho vários cafeeiros resistentes, porém heterozigoto para o gene  $S_{H3}$ . Se esses cafeeiros apresentarem características agronômicas desejadas, podem também ser utilizados no melhoramento. Nesse caso, a informação de que são heterozigotos é importante e deve ser considerada no cruzamento e avanço de gerações. Na tabela 5 estão apresentados os genótipos identificados como resistentes heterozigotos na população em estudo, quando analisados com os três marcadores que se comportaram como codominantes (SP-M16-SH3, Sat244 e BA-48-21OR) e resistente com o marcador que se comportou como dominante (BA-124-12KF).

De acordo com Carvalho e Mônico (1971), o gene de resistência à ferrugem identificado em *C. liberica* ( $S_{H3}$ ) tem proporcionado resistência com durabilidade apreciável em várias regiões cafeeiras sendo, portanto, de grande importância a identificação de indivíduos portadores desse gene nos programas de melhoramento do cafeeiro. Nesse contexto, os quatro marcadores ligados ao gene  $S_{H3}$  validados nesse trabalho podem ser utilizados para auxiliar de forma eficiente a incorporação desse gene em variedades de interesse nos vários programas de melhoramento do cafeeiro.

Tabela 5. Genótipos identificados, com os marcadores moleculares SP-M16-SH3, Sat244, BA-48-21OR e BA-124-12KF, como resistentes heterozigotos para o gene  $S_H3$  de resistência à ferrugem.

<b>Cafeeiros resistentes heterozigotos</b>			
UFV311-30(F <sub>2</sub> )	UFV 317-69(F <sub>1</sub> )	UFV 335-121(F <sub>2</sub> )	UFV 399-23(F <sub>1</sub> )
UFV 311-63(F <sub>2</sub> )	UFV 327-04(F <sub>2</sub> )	UFV 335-130(F <sub>2</sub> )	UFV 399-31(F <sub>1</sub> )
UFV 312-96(F <sub>2</sub> )	UFV 327-13(F <sub>2</sub> )	UFV 336-01(F <sub>1</sub> )	UFV 402-01(F <sub>2</sub> )
UFV 313-96(F <sub>2</sub> )	UFV 327-16(F <sub>2</sub> )	UFV 336-02(F <sub>1</sub> )	UFV 402-02(F <sub>2</sub> )
UFV 313-107(F <sub>2</sub> )	UFV 328-43(F <sub>2</sub> )	UFV 336-04(F <sub>1</sub> )	UFV 402-21(F <sub>2</sub> )
UFV 314-44(F <sub>2</sub> )	UFV 328-62(F <sub>2</sub> )	UFV 336-05(F <sub>1</sub> )	UFV 402-36(F <sub>2</sub> )
UFV 315-02(F <sub>2</sub> )	UFV 329-01(F <sub>2</sub> )	UFV 336-08(F <sub>1</sub> )	UFV 402-38(F <sub>2</sub> )
UFV 315-50(F <sub>2</sub> )	UFV 329-63(F <sub>2</sub> )	UFV 336-10(F <sub>1</sub> )	UFV 402-49(F <sub>2</sub> )
UFV 315-76(F <sub>2</sub> )	UFV 329-102(F <sub>2</sub> )	UFV 336-34(F <sub>1</sub> )	UFV 409-03(F <sub>2</sub> )
UFV 316-12(F <sub>1</sub> )	UFV 334-03(F <sub>2</sub> )	UFV 336-39(F <sub>1</sub> )	UFV 409-04(F <sub>2</sub> )
UFV 316-15(F <sub>1</sub> )	UFV 334-08(F <sub>2</sub> )	UFV 337-01(F <sub>1</sub> )	UFV 409-05(F <sub>2</sub> )
UFV 316-21(F <sub>1</sub> )	UFV 334-09(F <sub>2</sub> )	UFV 337-16(F <sub>1</sub> )	UFV 409-06(F <sub>2</sub> )
UFV 316-32(F <sub>1</sub> )	UFV 334-64(F <sub>2</sub> )	UFV 337-18(F <sub>1</sub> )	UFV 409-12(F <sub>2</sub> )
UFV 316-33(F <sub>1</sub> )	UFV 334-66(F <sub>2</sub> )	UFV 337-19(F <sub>1</sub> )	UFV 409-30(F <sub>2</sub> )
UFV 316-35(F <sub>1</sub> )	UFV 334-67(F <sub>2</sub> )	UFV 337-20(F <sub>1</sub> )	UFV 409-34(F <sub>2</sub> )
UFV 316-43(F <sub>1</sub> )	UFV 334-93(F <sub>2</sub> )	UFV 337-29(F <sub>1</sub> )	UFV 409-36(F <sub>2</sub> )
UFV 316-59(F <sub>1</sub> )	UFV 335-03(F <sub>2</sub> )	UFV 337-30(F <sub>1</sub> )	UFV 409-42(F <sub>2</sub> )
UFV 316-69(F <sub>1</sub> )	UFV 335-04(F <sub>2</sub> )	UFV 339-01(F <sub>1</sub> )	UFV 409-48(F <sub>2</sub> )
UFV 316-70(F <sub>1</sub> )	UFV 335-06(F <sub>2</sub> )	UFV 339-02(F <sub>1</sub> )	UFV 480-06(F <sub>2</sub> )
UFV 317-01(F <sub>1</sub> )	UFV 335-07(F <sub>2</sub> )	UFV 339-07(F <sub>1</sub> )	UFV 480-11(F <sub>2</sub> )
UFV 317-02(F <sub>1</sub> )	UFV 335-08(F <sub>2</sub> )	UFV 339-10(F <sub>1</sub> )	UFV 480-14(F <sub>2</sub> )
UFV 317-19(F <sub>1</sub> )	UFV 335-13(F <sub>2</sub> )	UFV 339-25(F <sub>1</sub> )	UFV 480-15(F <sub>2</sub> )
UFV 317-59(F <sub>1</sub> )	UFV 335-104(F <sub>2</sub> )	UFV 339-100(F <sub>1</sub> )	-

De acordo com Lopez-Vizcon e Ortega (2012), os marcadores moleculares estritamente ligados a genes de resistência, se forem utilizados na etapa adequada do processo de melhoramento permitirá uma seleção precoce de indivíduos resistentes de forma acessível. Além disso, comparando os custos de marcadores moleculares e de inoculações artificiais, os marcadores são mais rápidos, mais baratos e mais confiáveis para a triagem de indivíduos portadores de resistência.

Logo, verifica-se a importância da identificação e validação de marcadores ligados a genes de resistência, permitindo uma maior rapidez no processo de obtenção de cultivares superiores e resistentes em programas de melhoramento, por meio da incorporação de genes específicos de resistência aos patógenos em cultivares mais produtivas, adaptadas e recomendadas para as diferentes regiões do país.

Com o presente trabalho, foram disponibilizadas fontes de resistência à ferrugem, informação de homozigose e heterozigose do gene  $S_{H3}$  de resistência presente nas fontes de resistência e marcadores moleculares que poderão ser utilizados para monitoramento do gene nos programas de melhoramento. Além disso, os resultados indicaram que apesar de os 160 genótipos utilizados terem sido introduzidos no Brasil como fontes de resistência à ferrugem e portadores do gene  $S_{H3}$ , 52 deles não possuem esse gene, pois não apresentaram a marca (banda), quando analisados com os quatro marcadores ligados a esse gene. No entanto, ao serem introduzidos no Brasil, foram inoculados com uma mistura de patótipos de *H. vastatrix*, se mostrando resistentes. Portanto, esses cafeeiros podem ser portadores de outros genes de resistência à ferrugem. Dessa forma, esses cafeeiros foram analisados quanto a presença de outro gene de resistência, o  $S_H?$ .

## ***5.2. Seleção assistida para o gene $S_H?$ do Híbrido de Timor que confere resistência à ferrugem do cafeeiro***

A identificação de genótipos que apresentem além do gene  $S_{H3}$ , outros genes para resistência a ferrugem como o gene  $S_H?$  proveniente do Híbrido de Timor, é importante para conferir resistência a um maior número de raças do agente causal da ferrugem, resultando em maior durabilidade da resistência. Além disso, identificando genótipos com um maior número de genes, já se tem uma pirâmide de genes incorporada. Segundo Borém e Caixeta (2006), piramidação pode ser definida como o acúmulo ou introgressão de vários genes em uma cultivar. Entretanto, essa tarefa de acumular genes em um mesmo genótipo é difícil de ser realizada pelos métodos tradicionais de melhoramento, e uma ferramenta eficiente e que pode auxiliar é o uso de marcadores moleculares, a qual permite inferir de forma rápida e eficiente a presença de genes de resistência no genótipo do hospedeiro.

Portanto, nesse trabalho foram analisados marcadores SCAR ligados ao gene  $S_H?$  presente no Híbrido de Timor, obtidos no trabalho de Diola *et al.* (2011). Após os testes, foram validados para SAM os marcadores SCARM18, SCARM20 e

SCARM23 (Tabela 6), os quais apresentaram padrão de bandas nítidas.

Tabela 6. Marcadores SCAR validados utilizados na análise, suas sequências e temperaturas de anelamento T(°C) validadas no presente trabalho e distância entre o gene e o marcador molecular estimada no trabalho conduzido por Diola *et al.* (2011).

Marcador	Sequência dos marcadores	T(°C)	Distância cM
SCAR M18	R: ATCTTCAATCGGACACAGTG	60	4,46
	F: CATCGCCAGGTTTCGTCAC		
SCAR M20	R: CTCTTTCCTATGACGCTCG	60	1,79
	F: GAATACGCGCTACACTATG		
SCAR M23	R: CTACTIONGACTTACACCAGG	60	2,68
	F: CAACACTGGTTCGGAGA		

Para validação dos marcadores utilizou-se cinco genótipos controles, sendo três sabidamente portadores do gene de resistência e dois sabidamente suscetíveis. Dois destes, o UFV427-15 portador do gene de resistência e o Catuaí Amarelo IAC 30 (UFV2143-236), suscetível, correspondem aos genitores utilizados no trabalho conduzido por Diola *et al.* (2011) e o H421-4 também resistente, corresponde a planta F<sub>1</sub> e os outros controles são o Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV2148-57) que é suscetível e o Híbrido de Timor UFV443-03 portador dos genes de resistência (Figura 3). As leituras foram feitas a partir dos genótipos controles portadores do gene de resistência ou não portadores e não foi possível observar nesse caso, se os indivíduos são homozigotos ou heterozigotos uma vez que, todos esses três marcadores se comportaram como dominantes.

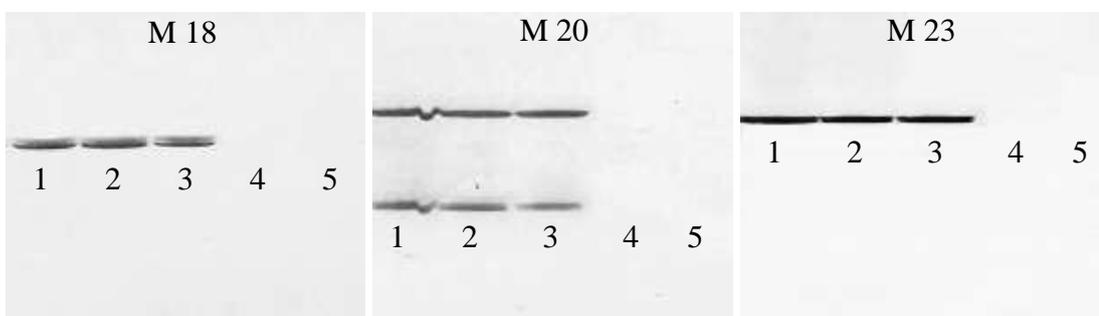


Figura 3. Validação dos marcadores moleculares (M18, M20 e M23) ligados ao gene S<sub>H</sub>? do Híbrido de Timor que confere resistência à ferrugem, utilizando três genótipos controles sabidamente portadores do gene de resistência, UFV427-15 (1), UFV443-03 (2), UFV421-4 (3) e dois sabidamente suscetíveis Catuaí Amarelo IAC 30 (UFV2143-236) (4) e Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV2148-57) (5).

Na amplificação e posterior análise dos 160 cafeeiros da população de estudo, para o marcador M23, obteve-se um total de 132 genótipos com a presença da banda ligada ao gene de resistência  $S_H?$  e 28 genótipos sem a banda, suscetíveis. O marcador M20 identificou 129 genótipos com a banda de resistência e 31 com ausência da banda e o marcador M18 identificou 138 genótipos resistentes e 22 suscetíveis. Quando analisado em conjunto os três marcadores, foram obtidos 128 genótipos (80%) portadores do gene de resistência  $S_H?$  do Híbrido de Timor. No Híbrido de Timor, resultante do cruzamento natural entre *C. arabica* x *C. canephora*, já foram detectados os quatro genes de *C. canephora* ( $S_{H6}$  a  $S_{H9}$ ) e o gene  $S_{H5}$  de *C. arabica* (BRITO *et al.*, 2010), portanto esse gene  $S_H?$  identificado nos cafeeiros da população de estudo deve ser um desses cinco genes ( $S_{H5}$  a  $S_{H9}$ ).

Os 160 genótipos da população de estudo são derivados do cruzamento entre Seleções Indianas, originadas da hibridação específica entre *C. arabica* x *C. liberica*, e cafeeiro de *C. arabica*, não tendo nenhum cruzamento com materiais genéticos da espécie *C. canephora*. Assim, apesar de os genes  $S_{H6}$ , 7, 8 e 9 terem sido apenas relatados em cafeeiros da espécie *C. canephora*, o número expressivo de genótipos portadores do gene de resistência  $S_H?$  na população estudada, sugere que esses genes, ou pelo menos um deles, também podem ser encontrados em *C. liberica*.

Os genótipos UFV328-69 ( $F_2$ ), UFV334-03 ( $F_2$ ), UFV334-09 ( $F_2$ ), UFV334-63 ( $F_2$ ) e UFV335-13 ( $F_2$ ) foram suscetíveis com os marcadores M20 e M23, já com o marcador M18 estes apresentaram a banda para resistência do gene  $S_H?$ . Observou-se também que os genótipos UFV329-63 ( $F_2$ ), UFV335-03 ( $F_2$ ), UFV402-49 ( $F_2$ ) e UFV409-04 ( $F_2$ ) se apresentaram como portadores do gene para os marcadores M18 e M23 e ausência do gene para o marcador M20. O genótipo UFV334-04 ( $F_2$ ) é portador de resistência para os marcadores M18 e M20 e suscetível para o M23.

Portanto, obteve-se cinco recombinantes com o marcador M18, possivelmente por estar ligado ao gene de resistência a uma distância de 4,46cM (DIOLA *et al.*, 2011), sendo o mais distante comparado aos marcadores M23 e M20. Com o marcador M20 foram identificados quatro recombinantes, sendo que este marcador está a 1,79cM (DIOLA *et al.*, 2011) de distância do gene. Um recombinante foi observado com o marcador M23, mesmo estando a uma distância de 2,68cM do gene (DIOLA *et al.*, 2011), distância essa maior do que a distância do

marcador M20. Provavelmente isso ocorreu devido à diferença na população avaliada e no tamanho da população.

Foram identificados genótipos que além de serem portadores do gene  $S_H3$ , em homozigose, quando analisado em relação aos quatro marcadores ligados a esse gene, também apresentaram o gene  $S_H?$  quando analisado os três marcadores ligados ao gene  $S_H?$ . Tais genótipos são o UFV311-48 ( $F_2$ ), UFV311-49 ( $F_2$ ), UFV 311-56 ( $F_2$ ), UFV313-133 ( $F_2$ ), UFV334-65 ( $F_2$ ), UFV399-45 ( $F_2$ ) e UFV409-08 ( $F_2$ ).

Lashermes *et al.* (2000) destacaram a importância da disponibilidade de marcadores moleculares ligados ao gene  $S_H?$  que conferem a resistência à ferrugem sendo, portanto, extremamente úteis na seleção de genótipos portadores de genes de resistência ao fungo *H. vastatrix*.

### ***5.3. Seleção assistida para o gene Ck-1 que confere resistência à antracnose dos frutos do cafeeiro***

Além da análise da presença de genes envolvidos na resistência do cafeeiro à ferrugem, nesse trabalho também foi avaliada a possibilidade desse germoplasma apresentar o gene *Ck-1* que confere resistência à CBD.

A CBD vem ocasionando grandes perdas econômicas na cultura do café arábica no continente africano, onde esta doença encontra-se restrita (MASABA e WALLER, 1992). Entretanto, é importante trabalhar na busca de cultivares que sejam portadoras de genes de resistência a essa doença, mesmo em países como o Brasil onde ela ainda não ocorre, a fim de evitar possíveis danos futuros como aconteceu com a ferrugem quando foi constatada no Brasil em Janeiro de 1970. Assim, verifica-se a importância do uso de marcadores na seleção assistida com o objetivo de se obter genótipos resistentes, pois no Brasil onde o patógeno não se encontra presente, só é possível selecionar materiais resistentes por meio do uso de marcadores moleculares.

Nesse estudo foram validados os dois marcadores moleculares SSR (Tabela 7), obtidos a partir de estudos conduzidos por Gichuru *et al.*(2008). Sendo que para validação foram utilizados três genótipos sabidamente portadores de genes de resistência à CBD e dois suscetíveis (Figura 4).

Tabela 7. Marcadores SSR utilizados na análise, suas sequências e temperaturas de anelamento T(°C) validadas no presente trabalho.

Marcador	Sequência dos marcadores	T(°C)
CBD-Sat235	R: GCAAATCATGAAAATAGTTGGTG	50
	F: TCGTTCTGTCATTAATCGTCAA	
CBD-Sat207	R: CAATCTCTTTCCGATGCTCT	50
	F: GAAGCCGTTTCAAGCC	

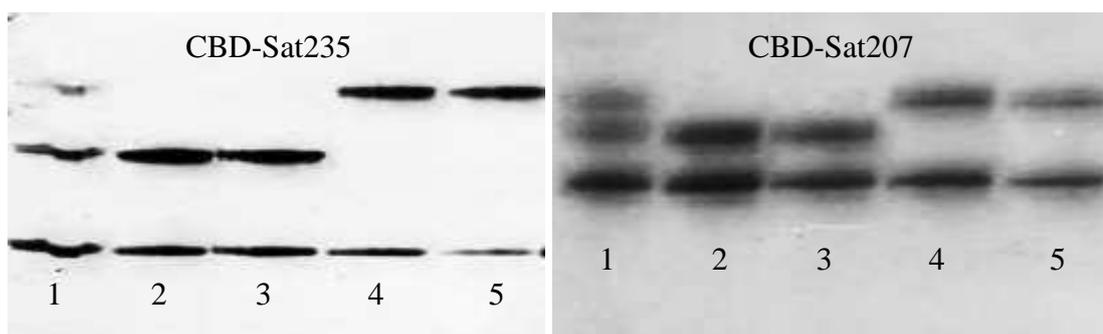


Figura 4. Validação dos marcadores moleculares (CBD-Sat235 e CBD-Sat207) ligados ao gene *Ck-1* que confere resistência à CBD, utilizando três genótipos controles sabidamente portadores do gene de resistência, UFV377-15 (1), UFV440-10 (2), MGS Catiguá 3 (3), e dois sabidamente suscetíveis, Caturra Vermelho CIFC 19/1 (4) e Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV2148-57) (5).

O marcador CBD-Sat235, quando amplificado e analisado, identificou como genótipos portadores do gene de resistência à CBD os indivíduos UFV317-12 (F<sub>1</sub>), UFV328-60 (F<sub>2</sub>) e UFV33-68 (F<sub>2</sub>). Ao passo que o marcador CBD-Sat207 identificou como portadores do gene de resistência apenas os genótipos UFV317-12 (F<sub>1</sub>) e UFV328-60 (F<sub>2</sub>). Isso pode ser devido ao fato do marcador CBD-Sat235 estar co-segregando com o gene *Ck-1* e o marcador CBD-Sat207 estar a uma distância estimada de 17,2cM do gene de resistência à CBD. Dessa forma, pode ter ocorrido uma recombinação com o marcador CBD-Sat207 e o gene. Assim, o mais indicado para os programas de melhoramento do cafeeiro seria utilizar os genótipos que apresentam a banda de resistência quando analisados os dois marcadores moleculares, visto que quando se utiliza mais de um marcador na seleção tende a aumentar a eficiência da mesma.

O genótipo UFV317-12 (F<sub>1</sub>) se mostrou heterozigoto para resistência com o marcador CBD-Sat235 e homozigoto resistente para o marcador CBD-Sat207.

O genótipo UFV334-68 (F<sub>2</sub>) também foi heterozigoto com o marcador CBD-Sat235 e suscetível com o marcador CBD-Sat207. Entretanto o genótipo UFV328-60 (F<sub>2</sub>) foi homozigoto resistente com os dois marcadores ligados ao gene de resistência à CBD, e por isso ele é o mais recomendado para utilização em programas de melhoramento do cafeeiro, no entanto ele não apresentou as bandas de resistência ligadas aos genes S<sub>H</sub>3 e S<sub>H</sub>? do Híbrido de Timor. O genótipo UFV317-12 (F<sub>1</sub>), mesmo se mostrando resistente heterozigoto com o marcador CBD-Sat235 e resistente homozigoto com o marcador CBD-Sat207, pode ser indicado para os programas de melhoramento do cafeeiro por ser portador do gene S<sub>H</sub>? proveniente do Híbrido de Timor que confere resistência a diferentes raças de *H. vastatrix* e do gene *Ck-1* que confere resistência a *C. kahawae*.

## 6. CONCLUSÕES

Por meio da Seleção Assistida por Marcadores Moleculares, foram identificados cafeeiros portadores de diferentes genes de resistência à ferrugem e à CBD.

Foram identificados cafeeiros portadores do gene S<sub>H</sub>? em material genético derivado de *C. liberica*.

Os cafeeiros identificados poderão ser utilizados em cruzamentos (retrocruzamentos) para a introdução desses genes em outros materiais genéticos de interesse nos programas de melhoramento genético do cafeeiro.

A incorporação da técnica de seleção assistida no cafeeiro é um fato inédito no mundo.

A utilização dos marcadores moleculares validados, nos programas de melhoramento, serão imprescindíveis para monitoramento dos genes de interesse nos diferentes cruzamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

AGWANDA, C.O. *et al.* (1997). Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in Coffee arabica. **Euphytica**, v. 97, p. 241-248.

AGWANDA, C.O.; OWUOR, J.B.O. (1989). Towards a more sustainable and economical production of Arabica coffee (*Coffea Arabica* L.) in Kenya through exploitation of improved cultivars: a review. **Kenya Coffee** 54: 735–743.

ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. (2001). Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 125-133.

ÁVILA, C.M.; SILLERO, J.C.; RUBIALES, D.; MORENO M.T.; TORRES, A.M. (2003). Identification of RAPD markers linked to the Uvf-1 gene conferring hypersensitive resistance against rust (*Uromyces viciae-fabae*) in *Vicia faba* L. **Theor Appl Genet** 2:353-358.

BETTENCOURT, A. (1973). **Considerações gerais sobre o ‘Híbrido de Timor’**. Campinas, Brazil: Instituto Agronomico de Campinas, Circular No. 31.

BETTENCOURT, A.J.; CARVALHO, A. (1968). Melhoramento visando à resistência do cafeeiro à ferrugem. **Bragantia**, v.27, n.4, p.35-68.

BETTENCOURT, A.J.; NORONHA-WAGNER, M. (1971). Genetic factors conditioning resistance of *coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. **Agronomia Lusitana**, v. 31, p. 285-292.

BETTENCOURT, A.J.; NORONHA-WAGNER, M.; LOPES, J. (1980). Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (“Híbrido de Timor”) à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. **Broteria Genética**, v.1, n. 76, p. 53-8.

BETTENCOURT, A.J.; LOPES, J.; PALMA, S. (1992). Fatores 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. **Brotéria Genética**, Lisboa, XIII(LXXX), 185-194.

BETTENCOURT, A.J.; RODRIGUES Jr., C.J. (1988). Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. In: Clarke RJ, Macrae R (Eds) Coffee. Agronomy, vol 4. **Elsevier Applied Science**, London, pp 199–234

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (2006). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 374p.

BRITO, G.G. de; CAIXETA, E.T.; GALLINA, A.P.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M.E. (2010). Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, v.173, p.255-264.

BRUNELLI, K.R.; SILVA, H.P.; CAMARGO, L.E.A. (2002). Mapeamento de genes de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em Milho. **Fitopatologia Brasileira** 27:134-140.

CABRAL, P.G.C.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; LELIS, T. de P.; CAPUCHO, A.S.; CAIXETA, E.T. (2009). Identification of a new race of *Hemileia Vastatrix* in Brazil. **Australasian plant disease notes**, v. 4, p. 129-130.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. (2009). Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: DFT/UFV. p.11-93.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. (2006). Tipos de marcadores moleculares. pp.9-79 In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. (Eds.) **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.

CAPUCHO, A.S.; ZAMBOLIM, E.M.; FREITAS, R.L.; HADDAD, F.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, L. (2012). Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes** 7:1-3.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L.C. (1971). Melhoramento do cafeeiro visando à resistência à ferrugem alaranjada. **Ciência e Cultura**, v.23, n.2, p.141-146.

CARVALHO, C.H.S. DE; FAZUOLI, L.C.; CARVALHO, G.R.; GUERREIRO-FILHO, O.; PEREIRA, A.A.; ALMEIDA, S.R. de.; *et al.* Cultivares de café arábica de porte baixo. In: Carvalho, C. H. S. de. (Ed.). **Cultivares de café: Origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, p. 157-224, 2008.

CHELKOWSKI J.; STEPIEN L. (2001). Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. **J Appl Genet**. 2:117-26.

CHIN, E.C.L.; SENIOR, M.L.; SMITH, J.S.C. (1996). Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome** 39:866-873.

CONAB (2013). **Acompanhamento da safra brasileira** \_ Safra 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 04 abril 2013.

DINIZ, L.E.C.; SAKIYAMA, N.S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; LOUREIRO, M.E.; PEREIRA, A.A.; ZAMBOLIM, L. (2005). Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progênies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.387-393.

DIOLA *et al.* (2011). High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. **Tree Genetics & Genomes**.

EMBRAPA CAFÉ (2004). **Histórico**. Disponível em: <<http://www22.sede.embrapa.br/cafe/unidade/historico.htm> >. Acesso em: 10 abril 2013.

FAZUOLI L.C.; MEDINA FILHO H.P.; GONÇALVES W.; GUERREIRO FILHO O.; SILVAROLLA M.B. (2002). **Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arabica obtidas no Instituto Agrônômico em Campinas**. In: Zambolim, L. (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, pp63-215.

FAZUOLI L.C.; OLIVEIRA A.C.B.; TOMA-BRAGUINI M.; SILVAROLLA M.B. (2005). Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust at the IAC. In: Zambolim, L. (ed) **Durable resistance to coffee leaf rust**. UFV, Viçosa, pp137-185.

FAZUOLI, L.C. (2006). Experiências em pré-melhoramento de café. In: **Curso internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasília: Empresa de Pesquisa Agropecuária. p. 75-87. ISSN 0102-0110. (Documento 185).

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

GEFFROY, V.; CREUSOT, F.; FALQUET, J.; SÉVIGNAC, M.; ADAM-BLONDON, A.F.; BANNEROT, H.; GEPTS, P.; DRON, M. (1998). 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.

GICHURU E.K.; AGWANDA C.O.; COMBES M.C.; MUTITU E.W.; NGUGI E.C.K.; BERTRAND B., LASHERMES P. (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease *Colletotrichum kahawae* in *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology** 57: 1117-1124.

GICHURU, E.K.; ITHIRU, J.M.; SILVA, M.C.; PEREIRA, A.P.; VÁRZEA, V.M.P. (2012). Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. **Tropical Plant Pathology** 37:424-427.

GRIFFITHS E.; GIBBS J.N; WALLER J.M. (1971). Control of coffee berry disease. **Annals of Applied Biology** 67, 45–74.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. (1999). Genética Molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 1 ed. Viçosa: UFV, p.715-740.

HEARNE, C.N.; GHOSH, S.; TODD, J.A. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends in Genetics** 8:288-294.

HERRERA, J.C.; ALVARADO, G.; CORTINA, H.; COMBES M.C.; ROMERO, G.; LASHERMES, P. (2009). Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. **Euphytica**, in press.

ICO (2009) **Exports by exporting countries to all destinations**. Disponível em: <[http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp](http://www.ico.org/trade_statistics.asp)>. Acesso em: 10 abril. 2013.

LASHERMES P.; COMBES M.C.; TOPART P.; GRAZIOSI G.; BERTRAND B.; ANTHONY F. (2000). Molecular breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). In: Pandey A (Eds) Coffee Biotechnology. **Academic Press**.

LOPEZ-VIZCON, C.; ORTEGA, F. (2012). Application of Molecular Marker-Assisted Selection (MAS) for Disease Resistance in a Practical Potato Breeding Programme. **Potato Research**.

MAHÉ, L.; COMBES, M.C.; VÁRZEA, V.M.P.; GUILHAUMON, C.; LASHERMES, P. (2008). Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arábica* L.). **Mol Breeding**. 21:105–113.

MAIA, T.A.; ZAMBOLIM, E.M.; CAIXETA, E.T.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZAMBOLIM, L. (2013). The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. **Australasian Plant Pathology**. Disponível em: <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs13313-013-0213-3.pdf>>. Acesso em: 08 julho 2013.

MANUEL L.; TALHINHAS P.; VÁRZEA V.; NEVES-MARTINS N. (2010). Characterization of *Colletotrichum kahawae* Isolates Causing Coffee Berry Disease in Angola. **Journal of Phytopathology** 158:310-313.

MASABA D.M.; WALLER J.M. (1992). Coffee Berry Disease: the current status. In: Bailey JA, JEGER MJ, eds. *Colletotrichum; Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK: CABI, 237–49.

MEIRA, C.A.A.; RODRIGUES L.H.A.; MORAES S.A. (2008). Análise da epidemia da ferrugem do cafeeiro com árvore de decisão. **Trop. Plant. Pathol.** vol.33 n. 2.

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

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 55, n. 2, p. 335-350. 1987.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHO, G.A.; OCHA, R.C.; PAULA, Jr, T.J.; BARROS de, E.G.; MOREIRA, M.A. (2000). RAPD and SCAR markers linked to gene conferring resistance to Angular Leaf Spot in Common Bean. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 148, p.117-121.

NYORO J.K.; SPREY L.H. (1986). Introducing Ruiru 11 to estates and smallholders. **Kenya Coffee** 51, 7–28.

OLIVEIRA, C.B.O.; CAIXETA, E.T.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S. (2007). **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Documentos IAC, 81. Campinas: Instituto Agrônômico. 17p.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:985-993.

PEREIRA, A.A.; CARVALHO, G. R.; MOURA, W. M.; BOTELHO, E. C.; REZENDE, J. C.; OLIVEIRA, A. C. B. DE; SILVA, F. L. (2010). Cultivares: Origem e suas Características. In: Reis, P. R.; Cunha, R. L. (Eds.). **Café arábica do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG, p. 167-221.

PEREIRA, A.A.; MOURA W.M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S.; CHAVES, G.M. (2002). Melhoramento genético do cafeeiro no Estado de Minas Gerais:

cultivares lançados e em fase de obtenção. In: Zambolim, L (ed) **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. UFV, Viçosa, pp253-295.

PRABHU, V.; SOMERS D.J.; RAKOW G.Y.; GUGEL R.K. (1998). Molecular markers linked to white rust resistance in mustard *Brassica juncea*. **Theor Appl Genet** 97:865-870.

PRAKASH, N.S. *et al.* (2011). Marker assisted selection and breeding for leaf rust resistance in coffee (*Coffea arabica* L.) – some recent leads. **Indian J. Genet.**, v.71, Special Issue: 1-6.

PRAKASH, N.S.; MARQUES, D.V.; VARZEA, V.M.P.; SILVA, M.C.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. 2004. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. **Theoretical and Applied Genetics** 109:1311-1317.

RAM, A.S. (2006). Popular Indian coffee selections. **Journal Indian Coffee**. Vol. 70 No. 10 pp. 12-18.

RIESEBERG L.H.; BAIRD S.J.E.; GARDNER K.A. (2000). Hybridization, introgression and linkage evolution. **Plant Molecular Biology** 42, 205–24.

RODRIGUES JÚNIOR, C.J.; BETTENCOURT, A.J.; RIJO, L. (1975). Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.13, p.49-70.

ROSEWARNE, G.V.; SINGH, R.P.; HUERTA-ESPINO, J.; WILLIAM, H.M.; BOUCHET, S.; CLOUTIER, S.; MCFADDEN, H.E.; LAGUDAH, E.S. (2005). Leaf tip necrosis, molecular markers and  $\beta$ 1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes Lr46/Yr29. **Theoretical and Applied Genetics**.vol.112 , p. 500-508.

SERA T.; ALTEIA M.Z.; PETEK M.R. (2002). Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR). In: Zambolim L (eds) **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. UFV, Viçosa, pp217-251.

SILVA, M. C.; VARZEA, V.; GUIMARAES, L. G.; AZINHEIRA, H. G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A. S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.18, p. 119-147.

SINGH, S.; SIDHU, J.S.; HUANG, N.; VIKAL, Y.; LI, Z.; BRAR, D.S.; DHALIWAL, H.S.; KHUSH, G.S. (2001). Pyramiding three bacterial blight

resistance genes (xa5, xa13 and xa21) using marker assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 6/7, p. 1011-1015.

VAN DER GRAAFF N.A. (1978). Selection for resistance to coffee berry disease in arabica coffee in Ethiopia. Evaluation of selection methods. **Netherlands Journal of Plant Pathology** 84, 205–15.

VAN DER VOSSSEN H.A.M.; WALYARO D.J. (1980). Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. Inheritance of the resistance. **Euphytica** 29, 777–91.

VAN DER VOSSSEN, H.A.M. (2005). State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: ZAMBOLIM, L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V.M.P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa: UFV. p.1-30.

VÁRZEA, V.M.P.; MARQUES, D.V. (2005). Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. (Eds.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, MG: DFT/UFV. p.53-74.

WALLER, J.M.; BIGGER, M.; HILLOCKS, R.J. (2007). Coffee pests, diseases and their management. Oxfordshire: **CAB International**. 400p.

YU, Y.G.; SAGHAI MARROF, M.A.; BUSS, G.R.; MAUGHAN, P.J.; TOLIN, S.A. (1994). RFLP and microsatellite mapping of a gene for *Soybean mosaic virus* resistance. **Phytopathology** 84:60-64.

ZAMBOLIM, L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VALE, F.X.R.; PEREIRA, A.A.; SAKIYAMA, N.S.; CAIXETA, E.T. (2005). Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects. In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E. M., VÁRZEA, V. M. P. (Orgs.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. 1. ed. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema Gráfica e Editora Ltda. v. 1, p. 75-98.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. (1997). Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas – Grandes culturas**, v.1, p. 83-140.