

**GIOVANI GREIGH DE BRITO**

**MAPEAMENTO GENÉTICO DE MARCADORES AFLP LIGADOS AO  
GENE DE RESISTÊNCIA DO CAFEIEIRO À *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia Vegetal, pa-  
ra obtenção do título de *Doctor  
Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007**

**GIOVANI GREIGH DE BRITO**

**MAPEAMENTO GENÉTICO DE MARCADORES AFLP LIGADOS AO  
GENE DE RESISTÊNCIA DO CAFEIRO À *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia Vegetal, pa-  
ra obtenção do título de *Doctor  
Scientiae*.**

**APROVADA: 13 de fevereiro de 2007.**

---

**Pesq. Eveline Teixeira Caixeta  
(Co-Orientadora)**

---

**Pesq. Eunize Maciel Zambolim**

---

**Pesq. Luiz Filipe Protasio Pereira**

---

**Pesq. Antônio Alves Pereira**

---

**Prof. Marcelo Ehlers Loureiro  
(Orientador)**

Dedico este trabalho a Andréia, minha esposa,  
ao meu filho Augusto que está pra nascer  
e aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a várias pessoas que, de forma ou outra, compartilharam e enriqueceram a realização deste trabalho, e também a todos que dividiram o conhecimento para o meu crescimento profissional.

À minha esposa, Andréia pelo apoio e por compartilhar minhas idéias e objetivos. Aos meus pais, Maura e Antônio pelo alicerce e maiores exemplos de coragem; Ao Orientador Professor Doutor Marcelo Ehlers Loureiro pela orientação, conselhos, amizade e em especial pela confiança depositada no meu trabalho, sempre me encorajando. À Doutora Eveline Teixeira Caixeta, pesquisadora da Embrapa-Café pelo aconselhamento, pela amizade, auxílio e sugestões valiosas dadas durante a realização deste estudo, sempre disposta a ajudar para que o trabalho pudesse prosseguir. Ao Professor Doutor Laércio Zambolim e à Doutora Eunize Maciel Zambolim por disponibilizarem seus laboratórios para a realização dos experimentos, pelas suas disponibilidades em ajudar sempre e pela amizade que demonstraram durante este trajeto. Aos professores Doutores Ney Sussumu Sakiyama, Fábio Murilo DaMata e Andréia Myiazaka de Almeida pelo aconselhamento e sugestões mostrando-se sempre disponíveis a ajudar. Ao Doutor Luiz Filipe Protasio Pereira pesquisador da Embrapa-Café pela sua contribuição para com o projeto. Ao Doutor Antônio Alves Pereira pesquisador da EPAMIG pela contribuição dada ao melhoramento do cafeeiro, em anos de dedicação. À bolsista do consórcio Embrapa-Café Ana Paula Gallina que contribuiu participando ativamente dos experimentos. Ao professor Doutor Cosme Damião Cruz pelo auxílio com a análise estatística. Aos funcionários Mercês e Carlos Raimundo pelas suas amizades e prestezas. Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e do Biocafé que também contribuíram, compartilharam idéias e trocaram experiências. À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal que acolheu minhas idéias e me concedeu tal oportunidade Ao CNPq pela concessão da bolsa durante meu período de doutoramento.

## **BIOGRAFIA**

Giovani Greigh de Brito, filho de Antônio de Brito Filho e Maura Ferreira de Brito, nasceu em Nova Resende, Minas Gerais, no dia 26 de janeiro de 1974.

Em 1992 ingressou no curso Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho, MG, concluindo-o em dezembro de 1994. Entre 1995 e 1997 atuou como extensionista agropecuário pela Cooperativa Regional dos Cafeicultores em Guaxupé – COOXUPE, MG.

Em 1998 ingressou no curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, concluindo-o em dezembro de 2001. Foi bolsista de iniciação científica desde o primeiro período da graduação.

Em 2002 ingressou no Curso de Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, concluindo-o em janeiro de 2004.

Em Março de 2004, ingressou no curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, defendendo tese em fevereiro de 2007.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	03
2.1. RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS.....	03
2.1.1. INTERAÇÕES PLANTA-PATÓGENO.....	05
2.1.2. GENES <i>R</i> DE PLANTAS CONFEREM RESISTÊNCIA A DOENÇAS.....	06
2.2. MARCADORES MOLECULARES.....	09
2.2.1. AFLP ( <i>AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM</i> ).....	10
2.2.2. MARCADORES MOLECULARES LIGADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1. MATERIAL GENÉTICO E CRUZAMENTOS.....	13
3.2. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM.....	14
3.3. IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES AFLP.....	15
3.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA.....	15
3.3.2. REAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	16
3.3.3. IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES LIGADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA.....	18
3.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
<b>4. RESULTADOS</b> .....	19
4.1. HERANÇA DA RESISTÊNCIA À RAÇA II DE <i>HEMILEIA VASTATRIX</i> NO HÍBRIDO DE TIMOR.....	19
4.2. IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES AFLP LIGADOS À RESISTÊNCIA DO CAFEIEIRO À FERRUGEM.....	20
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	27
5.1. HERANÇA DA RESISTÊNCIA À RAÇA II DE <i>HEMILEIA VASTATRIX</i> NO HÍBRIDO DE TIMOR.....	27
5.2. IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES AFLP LIGADOS À RESISTÊNCIA DO CAFEIEIRO À FERRUGEM.....	28
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	31
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32
<b>8. ANEXOS</b> .....	40
8.1. ANEXO I .....	40

## RESUMO

BRITO, Giovani Greigh de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Orientadores: Eveline Teixeira Caixeta, Laércio Zambolim, Ney Sussumu Sakyama e Andréa Myiazaka de Almeida.

A ferrugem alaranjada causada por *Hemileia vastatrix* Berk et Br é tida como a mais importante doença do cafeeiro. Este trabalho objetivou estudar a herança gênica e a identificação de marcadores moleculares ligados ao gene que confere resistência à raça II de *H. vastatrix*. Para este estudo foram utilizados a população F<sub>2</sub> (160 indivíduos), o retrocruzamento resistente (RCr; 20 indivíduos) e o suscetível (RCs, 135 indivíduos), derivados do cruzamento entre o Híbrido de Timor UFV 427-15 (CIFC 1343-136), genitor resistente e o suscetível Catuaí Amarelo UFV-2143-236 (IAC 30). Na população do Híbrido de Timor já foram detectados cinco genes (S<sub>H</sub>5 a S<sub>H</sub>9) que, de forma isolada ou em associação, conferem resistência às raças fisiológicas de *H. vastatrix* até o momento identificadas. Constituem-se, portanto, em importantes fontes de resistência, as quais poderão auxiliar na obtenção de cultivares que apresentem resistência durável a esta doença. A análise de segregação das populações, em estudo, indicou que um único gene dominante, presente no acesso do Híbrido de Timor UFV427-15, é responsável pela resistência à raça II do fungo *H. vastatrix*. Foram utilizadas as metodologias de BSA (*Bulked Segregant Analysis*) e AFLP, e analisadas 852 combinações de *primers*, que permitiram identificar três marcadores ligados ao gene de resistência. O mapeamento genético na população F<sub>2</sub> demonstrou que estes marcadores flanqueiam esse gene. De um lado, o marcador E.CTC/M.TTT405 posiciona-se a 8,69 cM do gene, (LOD= 18,91), enquanto o marcador E.CGT/M.TGT300 dista-se 28,00 cM (LOD= 4,02). Do outro lado do gene, o marcador E.CCT/M.TTC230 situa-se a 20,50 cM do gene de resistência (LOD= 6,15). Estes são os primeiros marcadores ligados ao gene de resis-

tência à ferrugem presente no Híbrido de Timor identificados e poderão ser úteis na seleção em programas de melhoramento para a resistência à ferrugem.



## ABSTRACT

BRITO, Giovani Greigh de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2007. **Genetic mapping of AFLP markers linked to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. resistance gene.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Advisers: Eveline Teixeira Caixeta, Laércio Zambolim, Ney Sussumu Sakayama and Andréa Myiazaka de Almeida.

Coffee leaf rust caused by the fungus *Hemileia vastatrix* is the most important disease of *Coffea arabica*. The objective of this study was to characterize the inheritance of coffee resistance gene to race II of this pathogen, and to identify and map molecular markers linked to this trait. Different segregation populations were used to achieve these objectives, as F<sub>2</sub> (160 individuals), BCr (20), and BCs (135), originated from cross the Timor Hybrid UFV 427-15 (CIFC 1343-136), resistant and Catuai Amarelo UFV 2143-236 (IAC 30), susceptible. In the Timor Hybrids populations were detected five gene (S<sub>H</sub>5 at S<sub>H</sub>9) that, in isolated way or in association, could confer resistance to the physiologic races of *H. vastatrix* to the moment identified. The segregation analysis have shown that resistance to coffee rust race II in Timor Hybrid (UFV 427-15, resistant) is conferred by a single dominant gene. The amplification of 852 primers combinations using bulked segregant analysis and AFLP methodologies, has allowed the identification of three molecular markers linked to the resistance gene. Genetic mapping of these three markers in the F<sub>2</sub> population has shown that they are distributed in both sides of the resistance gene. In one side of the resistance gene, it was found the marker E.CTC/M.TTT405 at 8,69 cM, (LOD =18,91) and E.CGT/M.TGT300 at 28,00 cM (LOD= 4,02), whereas in other side, the marker E.CCT/M.TTC230 was at 20,50 cM (LOD= 6,15). These markers are the first rust resistance markers identified in Timor Hybrid and can be useful for molecular assisted breeding for rust resistance programs in Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO

A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., é considerada a doença mais importante em *Coffea arabica*. Inicialmente, confinada na África e Ásia, esta doença chegou ao Brasil em 1970. Atualmente encontra-se presente em todos os países produtores de café, exceto no Havaí e na Austrália.

A relevância da obtenção de resistência durável a este patógeno, reside no fato de que os danos econômicos causados pela redução da produção em nível mundial variam de um a dois bilhões de dólares anuais, devido a maioria dos cafeeiros arábica cultivados atualmente apresentarem-se suscetíveis ao fungo causador desta doença (Van der Vossen, 2001). No Brasil, estimam-se que as perdas ocasionadas podem atingir até 30%, se medidas eficientes de controle não forem adotadas (Kushalappa & Eskes, 1989; Zambolim *et al.*, 1999). Os principais danos provocados pela doença são evidenciados pela queda prematura de folhas, o que resulta na redução de área foliar e seca de ramos laterais conduzindo, gradualmente, a deformação da planta atacada (Guzzo, 2004). O emprego do controle químico para esta doença mostra-se eficaz pela utilização de fungicidas protetores cúpricos e/ou sistêmicos do grupo dos triazóis (Matiello *et al.*, 2002; Zambolim *et al.*, 2002). Embora eficientes, os efeitos causados ao meio ambiente e aos organismos não alvos poderão conduzir a explosões populacionais de pragas e/ou de outras doenças do cafeeiro. Adicionalmente, a pressão de seleção exercida sobre o patógeno com esta estratégia de controle predispõe ao surgimento de novas raças resistentes aos produtos aplicados (Zambolim *et al.*, 2002). A alternativa mais indicada ao controle químico tem sido a obtenção de cultivares portadores de genes de resistência ao patógeno, a qual é possível ser obtida pelo melhoramento convencional, o qual pode ser auxiliado por técnicas moleculares (Fazuoli *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2002; Sera *et al.*, 2002; Fazuoli *et al.*, 2005).

Vários grupos de pesquisas de diversas regiões têm buscado a obtenção de resistência durável a ferrugem alaranjada do cafeeiro, resultando em sucesso inicial seguido de desapontamentos devido ao surgimento de novas raças virulentas do patógeno capazes de infectar a

planta inicialmente resistente (Van der Vossen, 2001). Fungos biotróficos incluindo *H. vastatrix*, normalmente, possuem grande variabilidade quanto a sua patogenicidade. Atualmente, cerca de 45 raças fisiológicas desta espécie já foram identificadas (Várzea et al., 2002). No Brasil 13 raças já foram confirmadas e dentre estas, a raça II contendo o gene de virulência v5 predomina em cultivos comerciais, haja vista que as principais cultivares comerciais plantadas nas diversas regiões produtoras, em nível mundial, possuem o fator S<sub>H</sub>5 de resistência à ferrugem (Fazuoli et al., 2005). Portanto, o emprego de materiais oriundos do Híbrido de Timor (híbrido proveniente do cruzamento natural entre *Coffea arabica* e *Coffea canephora*) que contém os fatores de resistência S<sub>H</sub>5, S<sub>H</sub>6, S<sub>H</sub>7, S<sub>H</sub>8 e S<sub>H</sub>9 (Wagner & Bettencourt, 1965, Vishveshwara, 1974; Bettencourt & Rodrigues, 1988) se constitui em fonte interessante para o emprego em programas de melhoramento para a resistência do cafeeiro à ferrugem.

A resistência do cafeeiro a este patógeno tem sido bastante explorada em *Coffea arabica* e em outras espécies do mesmo gênero. Componentes de resistência ao fungo, tanto de natureza monogênica quanto oligogênica e poligênica, foram identificados.

Dentro do gênero *Coffea*, ao menos nove genes dominantes (S<sub>H</sub>1 a S<sub>H</sub>9) conferem resistência a *H. vastatrix*. Os programas de melhoramento de cafeeiro para a resistência a ferrugem tem focado seus esforços na transferência de acessos coletados em seus centros primários de diversidade (Bettencourt & Rodrigues, 1988). Dentre estes fatores de resistência presentes no gênero *Coffea*, S<sub>H</sub>1, S<sub>H</sub>2, S<sub>H</sub>4 e S<sub>H</sub>5 foram encontrados em *C. arabica*. Outros genes como o S<sub>H</sub>6, S<sub>H</sub>7, S<sub>H</sub>8 e S<sub>H</sub>9 têm sido introgrididos de *C. canephora*, enquanto o S<sub>H</sub>3, provavelmente, originou-se de *C. liberica* (Wagner & Bettencourt, 1965, Vishveshwara 1974; Bettencourt & Rodrigues, 1988).

Tem sido demonstrado que os genes presentes em *C. arabica*, de forma isolada ou em combinação, não têm suprido resistência durável para muitas raças de *H. vastatrix*. Entretanto, O fator S<sub>H</sub>3, presente em *C. liberica* bem como os oriundos de *C. canephora* têm conferido resistência durável sob condições de campos em cultivos comerciais (Srinivasan & Narasimhaswamy, 1975; Sreenivasan et al. 1994). Estas informações

sugerem que o acúmulo combinado destes genes em variedades que apresentam outras características agrônômicas de interesse venha suprir a esperada resistência durável (Kushalappa & Eskes 1989). Todavia, esta é uma tarefa que demanda muito tempo através dos métodos de melhoramento convencional. Desse modo, a identificação de marcadores moleculares estreitamente ligados a genes  $S_H$  e outros fatores condicionantes de resistência para a ferrugem alaranjada do cafeeiro poderiam auxiliar, sobremaneira, a obtenção de cultivares com características duráveis de resistência a este patógeno.

Diante do exposto, considerando as limitações ao uso de marcadores RAPD e indisponibilidade atual de um número significativo de microsátélites para serem empregados, neste estudo, marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) foram analisados em uma população segregante  $F_2$  oriunda do cruzamento artificial entre o Híbrido de Timor UFV 427-15 (CIFC 1343-136) genitor resistente e o genótipo suscetível Catuaí Amarelo UFV 2143-236 (IAC 30).

Em face desta exposição, este trabalho objetivou estudar a herança da resistência do Híbrido de Timor UFV-427-15 e identificar marcadores moleculares ligados ao gene de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro por meio da técnica de AFLP.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Resistência de plantas a doenças**

As plantas, devido a sua imobilidade e exposição ambiental, estão sujeitas ao ataque de vários organismos fitopatogênicos. A proteção contra o ataque de muitos organismos deve-se às barreiras pré-formadas incluindo cutículas e compostos antimicrobianos produzidos pela planta. Sobrepondo a esta linha de defesa basal do hospedeiro estão as respostas de defesa induzíveis (Hammond-Kosack & Jones, 1997). Segundo estes autores, em mamíferos, a maquinaria de defesa envolve um complexo sistema imune baseado em células altamente especializadas distribuídas pelo sistema circulatório. Em contraste, nas células de plantas as respostas de defesa

são autônomas, deste modo cada célula pode perceber e responder ao ataque do. A resistência de plantas pode estar associada a uma rápida morte confinada de células, denominada resposta hipersensitiva (HR) objetivando impedir a progressão da doença (Bonas & Lahaye, 2002). Esta resposta local pode desencadear uma resposta sistêmica permanente, denominada de resposta sistêmica adquirida (SAR), tornando a planta resistente a amplo espectro de espécies patogênicas (Dong, 2001; Métraux, 2001). Esta resposta complexa requer recursos, dentre os quais se incluem extensiva reprogramação genética e re-alocação metabólica (Somssich & Hahlbrock, 1998). Estas defesas estão sob controle genético e são ativadas somente mediante a detecção, pela planta, do invasor prospectivo.

Para obter resistência a uma doença, a planta requer constante vigilância contra patógenos, o que é realizado pela expressão de genes denominados de “Genes *R*” (*R*, resistência), os quais conferem uma resistência específica à uma raça do patógeno. Os genes *R* codificam para moléculas que reconhecem e respondem aos produtos dos genes “*avr*” (*avr*, avirulência), expressos pelo patógeno durante o processo de infecção (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Em muitos casos, um único gene *R* pode conferir resistência para uma ou mais raças de um patógeno particular quando transferido para uma planta da mesma espécie, previamente suscetível. Por esta razão, os genes *R* têm sido explorados em programas de melhoramento de plantas para a resistência a doenças (Mcdowell & Woffenden, 2003).

Os resultados de vários estudos demonstraram, ao longo de anos, que a resistência mediada por genes *R* apresenta vários aspectos atrativos para o controle de doenças. Quando induzida de forma adequada, as respostas podem conduzir ao impedimento do crescimento do patógeno, o que resulta em danos mínimos à planta atacada. No entanto, os genes *R* podem, muitas vezes, serem suplantados pela co-evolução com patógenos presentes no mesmo ambiente (Pink, 2002). Muitos genes reconhecem somente número limitado de raças de patógeno e, portanto, não fornecem amplo espectro de resistência.

Existem três razões importantes para se estudar a resistência de plantas a patógenos. A primeira delas reside no fato de que a compreensão desta interação pode resultar na geração de soluções de ordem prática para o controle de doenças em culturas agrícolas minimizando os efeitos negativos do controle químico. A existência de extensas áreas cultivadas com monoculturas, compreendendo espécies geneticamente uniformes, freqüentemente tem conduzido a alto nível de ocorrência de doenças resultando na redução de rendimento, qualidade e valor do produto final. Em segundo lugar, os estudos podem auxiliar na compreensão de como as células de plantas comportam-se sob situações de estresse. Por último, o estudo desta interação pode propiciar a compreensão de como se processa a comunicação entre os diferentes reinos e que tipos de mensagens eles trocam (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

### **2.1.1 Interações planta-patógeno**

Os organismos fitopatogênicos utilizam-se, basicamente, de uma das três estratégias conhecidas para o ataque aos seus hospedeiros, que são a necrotrofia, a biotrofia e a hemi-biotrofia. Os organismos necrotróficos matam as células do seu hospedeiro e subseqüentemente metabolizam seu conteúdo (Walton, 1996). As espécies dos gêneros *Pythium* e *Botrytis* são exemplos de fungos necrotróficos. Outros necrotróficos produzem toxinas que são efetivas e específicas a certas espécies de plantas. Desta forma, para esta classe de patógeno, a resistência de plantas pode se processar pela alteração da célula alvo ou pela detoxificação do composto.

Patógenos das classes hemibiotróficas e biotróficas como, por exemplo, o fungo da espécie *Hemileia vastatrix*, invadem células vivas e subvertem o metabolismo para seu crescimento e reprodução (Agrios, 1988). A freqüente formação de manchas esverdeadas sobre as folhas atacadas envolvendo os sítios de infecção do fungo, atesta a importância da manutenção das células vivas através desta íntima associação planta-patógeno (Agrios, 1988). Devido a natureza altamente especializada da associação patógeno biotrófico/hemibiotrófico e a planta, é provável que pequenas diferenças entre estes organismos possam afetar esta interação.

Com essas classes de patógeno, a interação planta/patógeno incompatível freqüentemente resulta na ativação de resposta de defesa da planta, incluindo a morte confinada de células, característica típica da resposta hipersensitiva (HR) (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

Na década de 1940, foram realizados experimentos utilizando, como planta modelo da interação planta-patógeno, o linho (*Linum usitatissimum*) e o fungo causador de ferrugem (*Melampsora lini*), onde se estudou não somente a herança da resistência da planta, mas também a da virulência do patógeno (Flor, 1971). Estes estudos propiciaram a elaboração do modelo clássico denominado “Teoria Gene-a-gene”, que propõe que para a resistência ocorrer deve haver complementaridade entre pares de genes dominantes, um do hospedeiro e outro do respectivo patógeno. Revelaram ainda que a perda ou alteração do gene *R* da planta ou do *Avr* do patógeno conduz a compatibilidade, ou seja, ao desenvolvimento da doença.

A descoberta de que as plantas possuem centros de origem, locais onde está presente grande diversidade genética, e que as plantas têm co-evoluído com patógenos, impulsionou os geneticistas de plantas a identificar germoplasmas resistentes em espécies selvagens, de importância agrícola, e introduzir características desejáveis presentes nestas espécies em benefício da agricultura (Leppik, 1970). Os resultados gerados nestes trabalhos beneficiaram a fitopatologia devido ao desenvolvimento de vários sistemas modelo “gene-a-gene”, a partir dos quais foram isolados alguns dos primeiros genes *R* e *Avr*. Outros genes têm sido isolados de *Arabidopsis thaliana*, espécie vegetal utilizada como modelo para estudo da interação planta-patógeno em anos recentes.

### **2.1.2 Genes *R* de plantas conferem resistência a doenças**

Atualmente, foram clonados, aproximadamente, 37 genes *R* (Van der Vossen et al. 2005). Interessantemente, os genes *R* de diversas espécies vegetais com especificidade para ampla variedade de vírus, bactérias e fungos fitopatogênicos codificam proteínas estruturalmente similares. Esta similaridade sugere alto grau de conservação das vias que as plantas usam

para responder ao ataque destes organismos (Bent, 1996). O sequenciamento genômico de várias espécies de plantas aliado a busca de mutantes em larga escala tem permitido aumentar, sobremaneira, a quantidade de informações geradas relativas ao isolamento e identificação das funções dos produtos gênicos, regulação das vias de biossíntese e de transdução de sinal. Os genes *R* codificam pelo menos cinco tipos diferentes de proteínas (proteínas *R*) (Dangl & Jones, 2001), que podem ser classificadas de acordo com as suas características estruturais. A grande maioria dos genes *R* codifica proteínas citoplasmáticas contendo um domínio de repetições ricas em leucina (LLR – *leucine-rich-repeat*), um sítio de ligação ao nucleotídeo (NBS - *nucleotide-binding site*) e um domínio na extremidade N-terminal (CC – *coiled coil* ou TIR – *Toll-interleukin-1-receptor like*).

O primeiro gene *R* clonado em plantas foi o *Pto* do tomateiro, que corresponde a uma proteína serina/treonina quinase e confere resistência a raças de *Pseudomonas syringae* que carregam o gene de avirulência *avrPto* (Martin et al. 1993). Outros genes, como o *Cf9*, também do tomateiro, que confere resistência a *Cladosporium fulvum*, codificam proteínas transmembranas, cuja região N-terminal extracelular é composta de ricas repetições de leucinas (LRR – *Leucine Rich Repeats*) (Jones et al. 1994), mas não possuem uma região intracelular com função conhecida, que poderia constituir um componente sinalizador (Ellis & Jones, 1998). Uma terceira classe, representada pelo gene *Xa21* (resistência a *Xanthomonas oryzae*) do arroz, inclui proteínas com um formato clássico de receptor-quinase, contendo uma região LRR extracelular, uma região transmembrana e um domínio serina/treonina quinase citosólico (Ellis & Jones, 1998). Entretanto, a maioria dos genes de resistência codifica proteínas com um domínio N-terminal variável, seguido por uma região de ligação de nucleotídeo (NBS) tripartida e uma região LRR (Baker et al. 1997; Dangl & Jones, 2001). Com base em seu domínio N-terminal, essas proteínas podem ser subdivididas em dois grupos. No primeiro grupo estão as TIR-NBS-LRR, que exibem uma seqüência similar à da proteína *Toll* de drosófila e a do receptor interleucina-1 de mamíferos. No outro grupo as não TIR-



NBS-LRR, que não exibem essa seqüência (Cannon et al. 2002) e/ou contêm um domínio zíper de leucina (LZ – *Leucine Zipper*) ou *coiled coil* (CC) potenciais nas suas regiões N-terminais. Domínios CCs são estruturas formadas por duas a cinco hélices, que possuem um empacotamento distinto de cadeias laterais de aminoácidos na interface hélice-hélice (Lupas, 1996). A estrutura CC exhibe uma organização de repetições de sete resíduos de aminoácidos com as cadeias laterais hidrofóbicas de dois deles formando uma interface para interações entre as extremidades (*coils*) (Young, 2000). A subclasse TIR-NBS-LRR inclui o gene *N* do tabaco (que confere resistência ao Vírus do Mosaico do Tabaco), os genes *L6* e *M* do linho (resistência à ferrugem), os genes *RPP5*, *RPP1* (resistência ao fungo *Peronospora parasitica*) e *RPS4* (resistência a *Pseudomonas syringae*) de *Arabidopsis* (Ellis & Jones, 1998). A classe LZ-NBS-LRR inclui os genes *RPM1*, *RPS2* e *RPS5* de *Arabidopsis* e o gene *Prf* do tomateiro, que conferem resistência a *P. syringae*, o gene *RPP8* de *Arabidopsis* (resistência a *Peronospora parasitica*), *Mi* do tomateiro (resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita*) e o *Rx1* da batata (resistência ao Vírus X da Batata) (Ellis & Jones, 1998). Os genes *I2* do tomateiro, *Rp1-D* do milho, *RGC2* da alface e o *Bs2* da pimenta não contêm a região TIR nem a LZ (Tai et al. 1999). Além das regiões mencionadas anteriormente, os produtos de alguns genes *R* possuem ainda um domínio conservado de função desconhecida chamado GLPLAL, localizado entre as regiões NBS e LRR (Dinesh-Kumar et al. 2000).

Para o cafeeiro, poucas são as informações disponíveis, em nível molecular, acerca da sua resistência ao fungo da espécie *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem alaranjada. A resistência natural de cafeeiros a esta doença tem sido extensivamente explorada em *Coffea arabica* e espécies selvagens, sendo empregadas em programa de melhoramento para o desenvolvimento de material resistente. Componentes tanto monogênico quanto oligogênico e poligênico de resistência ao fungo têm sido identificados. Ao menos nove genes dominantes maiores (*S<sub>H</sub>1* a *S<sub>H</sub>9*) determinam resistência completa a *H. Vastatrix* (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988). Embora, muito se tenha realizado através dos programas de

melhoramento convencional do cafeeiro, poucos são os marcadores moleculares disponíveis ligados a genes de resistência a ferrugem, que podem ser empregados no melhoramento assistido para resistência a este patógeno.

## **2.2 Marcadores moleculares**

Com o advento das técnicas de marcadores moleculares tornou-se possível avaliar a variabilidade genética existente no DNA para identificar genes de interesse agrônomico. Os tipos de marcadores atualmente disponíveis diferem-se quanto a forma para identificar esta variabilidade. Os principais tipos de marcadores podem ser classificados em dois grupos: os que se baseiam na hibridização do DNA com sondas e aqueles cujo princípio fundamenta-se na amplificação de fragmentos do DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) e minissatélites, entretanto, aqueles revelados através da amplificação incluem RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), SSR (*Single Sequence repeats*), SNPs (*Single Nucleotide polymorphisms*), dentre outros.

Os marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Se um loco molecular apresenta segregação mendeliana este poderá ser considerado um marcador. Devido a isto, os marcadores de DNA podem ser utilizados no estudo de genética de populações, mapeamento, como DNA *fingerprinting* ou para complementar estudos de sistemática, entre outros possíveis usos. Todavia, a opção pela adoção de uma destas técnicas deverá levar em conta alguns aspectos, tais como o objetivo do estudo, as características apresentadas pelo material genético, a disponibilidade de estrutura física, de recurso financeiro e de tempo, os quais serão determinantes para escolha do tipo de marcador a ser empregado.

### **2.2.1 AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)**

A técnica de AFLP (Vos et al. 1995) combina a sua aplicabilidade universal com seu alto poder de discriminação e reprodutibilidade. Atualmente são inúmeros os trabalhos empregando esta ferramenta para as mais diversas finalidades e organismos. Esta técnica baseia-se na digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, ligação de adaptadores de seqüência conhecida nas extremidades coesivas dos fragmentos gerados, numa etapa inicial. As duas enzimas de restrição utilizadas na digestão possuem sítios de restrição distintos, uma de corte raro (sítio de restrição com 6 pb) e outra de corte freqüente (sítio de restrição possui 4 pb), processo que resulta em três tipos de fragmentos: com ambas extremidades digeridas pela enzima de corte freqüente, com ambas as extremidades digeridas com enzima de corte raro e com uma das extremidades cortadas com cada enzima.

Uma vez que a seqüência dos adaptadores e do sítio de restrição são conhecidas, pode-se construir *primers* específicos a essas seqüências para serem usados na amplificação seletiva dos fragmentos resultantes do processo de digestão. Na primeira etapa, a de amplificação pré-seletiva, os *primers* desenhados são complementares aos adaptadores seguidos de um nucleotídeo seletivo adicional na extremidade 3' terminal. Esta primeira etapa de PCR determina que somente os fragmentos que possuem o nucleotídeo seletivo flanqueando o sitio de restrição sejam amplificados, ou seja, se faz uma primeira seleção de fragmentos nesta primeira etapa do processo. O próximo passo é o da amplificação seletiva, onde serão usados, além da seqüência complementar ao adaptador, mais 3 nucleotídeos seletivos nos terminais 3' dos adaptadores. Assim, apenas os fragmentos que possuam nucleotídeos complementares aos utilizados nos terminais 3' dos adaptadores, serão amplificados. A amplificação seletiva visa diminuir o número de fragmentos gerados pela digestão, possibilitando melhor resolução na separação dos fragmentos amplificados, e reduzindo a taxa de produção de artefatos. Embora o uso de 1 nucleotídeo seletivo na pré-amplificação e de 3 na amplificação tenha levado a resultados

satisfatórios em um grande número de espécies, isto deve ser adequado a cada genoma (Vos et al. 1995).

Na separação e identificação dos produtos da amplificação, o método mais adequado consiste na eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, o qual proporciona melhor nível de resolução. O número de fragmentos visualizado neste gel pode variar de algumas dezenas até mais de uma centena. Na revelação do gel pode ser empregada a marcação radioativa dos *primers*, geralmente naqueles dirigidos aos adaptadores das enzimas de corte raro. Todavia, este procedimento requer acomodações apropriadas, licença da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), além de treinamento em proteção radiológica, equipamentos de segurança específicos, recipientes para armazenamento do material radioativo, entre outros. Em vista disso, torna-se mais atrativa a coloração por nitrato de prata, bastando seguir as normas gerais de segurança do laboratório e as recomendações dos fornecedores. Diversos procedimentos para a coloração com nitrato de prata estão disponíveis e se bem adequados levam a resultados semelhantes aos conseguidos pelo emprego da radioatividade (Chalhoub et al. 1997).

Estudos demonstram que, comparado ao RAPD e RFLP, o AFLP possui maior reprodutibilidade, robustez e poder discriminatório. Pequena quantidade de DNA é digerida e a detecção dos fragmentos não depende de hibridização e digestão parcial que levam a baixa reprodutibilidade do RFLP (Vanechoutte, 1996). Adicionalmente, o emprego de condições mais estridentes de temperaturas de anelamento e utilização de *primers* de maior tamanho rende ao AFLP maior reprodutibilidade e robustez, se comparado ao RAPD (Bleas et al. 1998). Uma outra característica atribuída ao AFLP refere-se ao grande número de marcas que podem ser geradas, tendo em vista a possibilidade de combinação entre as diversas enzimas de restrição disponíveis e ao grande número de combinação de *primers* potencialmente possíveis. Tem sido evidenciada como limitações da técnica, a demanda de tempo na execução de todas as etapas do processo e o seu custo quando comparado a outros métodos.

### 2.2.2 Marcadores moleculares ligados a gene de resistência à diferentes agentes causais de ferrugens

Marcadores moleculares têm auxiliado, sobremaneira, em programas de melhoramento de plantas. Estima-se que mais de 100 genes para a resistência a ferrugem tenham sido identificados através desta estratégia.

Marcadores moleculares ligados a genes de resistência a ferrugem foram identificados em várias espécies de interesse agrônômico. No trigo, 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 & Stepień, 2001). No gênero *Brassica*, dois marcadores moleculares flanqueando genes de resistência à ferrugem branca, causada por *Albugo candida* foram identificados (Prabhu et al. 1998). Em espécies leguminosas, dois marcadores ligados ao gene de resistência determinando resposta de hipersensibilidade ao fungo *Uromyces viciae-fabae*, foram obtidos através do uso da metodologia de BSA (*bulks segregants analysis*) (Avila et al. 2003). Em *Populus deltoides*, conseguiram-se flanquear o gene de resistência a *Melampsora medusae* pela obtenção de dois marcadores ligados ao gene de resistência (Tabor et al. 2000).

Em espécies do gênero *Coffea*, ressalta-se que poucas informações estão disponíveis a este nível. Poucos marcadores ligados a genes de resistência a ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada por *H. Vastatrix* foram obtidos até o momento. Estudos objetivando identificar marcadores associados ao fator S<sub>H</sub>3 de resistência à ferrugem foram efetuados (Prakash et al. 2004). Neste estudo, através da análise em uma população F<sub>2</sub> composta por 101 indivíduos derivada do cruzamento entre Matari, um acesso de *C. arabica* e a linhagem 288 introgridida de *C. Liberica*, foram identificados 21 marcadores ligados estreitamente ao fator S<sub>H</sub>3 de resistência a este patógeno. Ressalta-se que os marcadores encontrados neste estudo estão ligados a um gene oriundo de *C. liberica*. No gênero *Coffea*, ao menos nove genes de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro foram confirmados (S<sub>H</sub>1 a S<sub>H</sub>9) (Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Bettencourt et al. 1980).

As informações apresentadas acima procuram apenas ressaltar alguns exemplos do uso de marcadores moleculares como estratégia de identificação de genes de interesse agrônômico. Evidencia-se que o uso das técnicas de marcadores tem sido largamente empregado seja para fins de melhoramento assistido ou com vistas à clonagem de genes de interesse, para uma extensa lista de espécie de importância agrícola. Portanto, em espécies do gênero *Coffea*, onde as informações disponíveis são muito escassas em nível molecular, a obtenção de marcadores ligados a principal doença desta cultura auxiliará tanto os programas de melhoramento assistido, quanto o norteamento de projetos, para que futuramente genes de resistência a *H. vastatrix* possam ser clonados.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Material genético e cruzamentos**

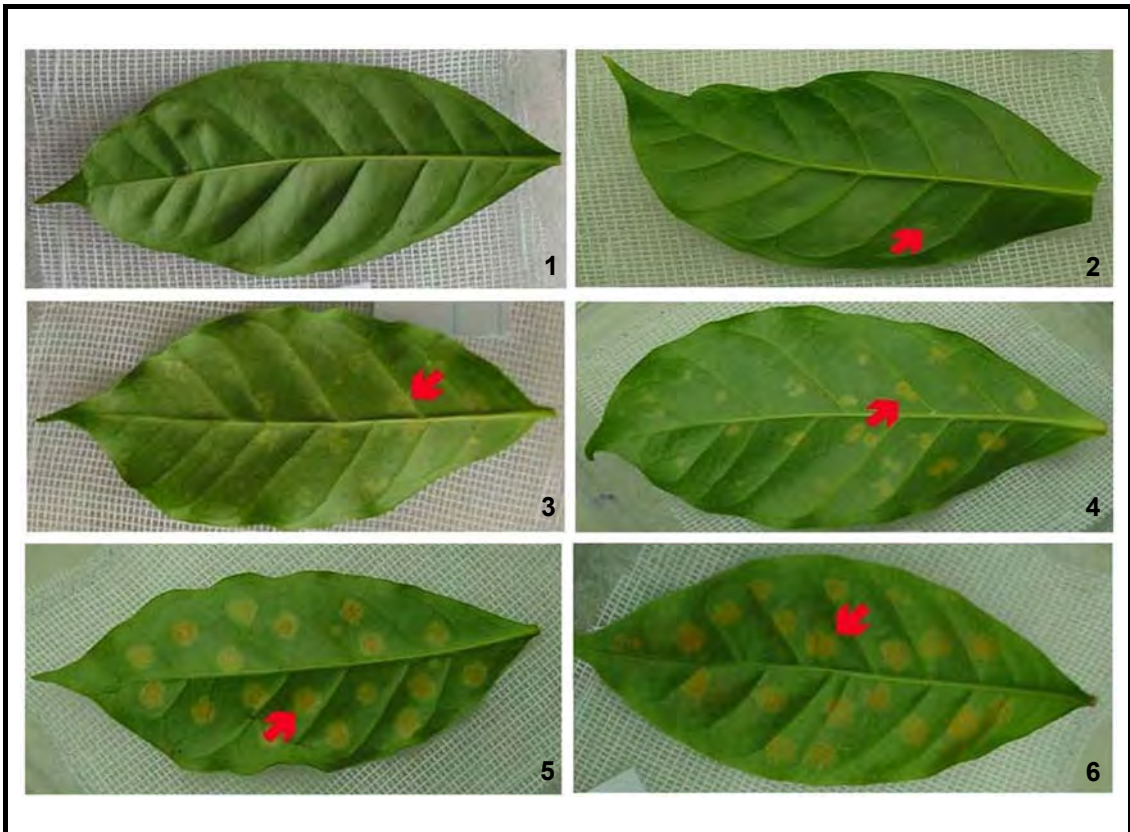
Para o estudo, 160 plantas  $F_2$  oriundas da  $F_1$  H 421-4, cruzamento artificial entre o acesso do Híbrido de Timor UFV 427-15 (CIFC 1343-136) genitor resistente, e o Catuaí Amarelo UFV 2143-236 (IAC 30) suscetível foram utilizadas. Para obtenção dos retrocruzamentos (RC), a planta  $F_1$  foi retrocruzada com o Catuaí amarelo UFV 2143-236 (RCs) e com o Híbrido de Timor UFV 427-15 (RCr). A população segregante  $F_2$  foi obtida pela autofecundação controlada da planta  $F_1$ , etapa efetuada junto ao banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Brasil). O acesso suscetível de *C. arabica*, catuaí amarelo UFV 2143-236, é infectado quando inoculado com a raça II de *H. vastatrix* (Pereira, 1995).

#### **3.2 Avaliação da resistência à ferrugem**

A avaliação da população para a resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro foi efetuada no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (Biocafé) do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa, sob condições controladas. A caracterização da resistência à infecção foi realizada usando uredósporos da

raça II de *H. vastatrix*, material caracterizado por Bettencourt & Rodrigues, (1988).

Os genitores (resistente e suscetível), a planta F<sub>1</sub>, as resultantes dos retrocruzamentos e as plantas da geração F<sub>2</sub> foram inoculados com uredósporos da raça II (viabilidade de 50%), na concentração de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Este procedimento foi realizado em três repetições. Com o auxílio de uma pipeta automática foram aplicadas 20 gotas de 5,0 µl cada na superfície abaxial, espaçadas de forma eqüidistantes, em uma folha jovem e completamente expandida. As folhas foram acondicionadas em um recipiente acrílico (gerbox) desinfetado e com o fundo revestido por espuma de 1,0 cm de espessura, saturada em água destilada e coberta com tela de nylon. Após a inoculação, os gerbox foram submetidos ao escuro por 48 horas a 22±2°C e, em seguida, transferidos para ambiente com fotoperíodo de 12 horas e 22°C, mantendo a umidade saturada no interior do mesmo. Procedeu-se a avaliação da infecção fúngica aos 49 dias após a inoculação. A determinação de plantas resistentes e suscetíveis foi efetuada com base na reação de folhas inoculadas à doença (Figura 1). Foram consideradas resistentes, com notas 1, 2 e 3, aquelas que se apresentaram isentas de esporos e, suscetíveis, com notas 4, 5 e 6, aquelas com esporos visíveis, segundo metodologia descrita por Tamayo et al., (1995).



**Figura 1.** Sintomas da ferrugem alaranjada do cafeeiro (*H. vastatrix* Berk. & Br) em folhas de populações derivadas do Híbrido de Timor UFV-427-15 inoculadas com a raça II. Nota 1: Ausência de sintomas da doença. 2: Lesões cloróticas pequenas, características de resposta hipersensitiva. 3: Lesões cloróticas grandes e ausência de uredósporos. 4: Lesões cloróticas grandes com baixa esporulação, ocupando menos de 25% da área da lesão com uredósporos. 5: Lesões cloróticas grandes com esporulação ocupando de 25% a 50% da área da lesão com uredósporos. 6: Lesões cloróticas grandes com esporulação ocupando mais de 50% da área da lesão com uredósporos. As setas indicam o local dos sintomas.

Com o auxílio do aplicativo computacional GENES (Cruz, 2001), pelo teste do Qui-quadrado se obteve a proporção fenotípica a fim de caracterizar a herança da resistência à ferrugem.

### 3.3 Identificação de marcadores AFLP

#### 3.3.1 Extração de DNA

Para obtenção do DNA utilizado na técnica de AFLP, duas folhas de cada planta da população F<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, RCr, RCs, F<sub>1</sub> e dos genitores foram coletadas, etiquetadas e armazenadas a -80°C, sendo utilizada,



posteriormente, para a extração de DNA. Em seguida, o DNA genômico foi extraído com CTAB conforme o método de Murray & Thompson (1980), com modificações. A concentração do DNA foi estimada por meio de espectrofotometria (Smart Spec™ 3000). A sua integridade foi avaliada por meio de gel de agarose (1,0%) e corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) visualizado sob luz ultravioleta e foto-documentado (Eagle-eye II™ Stratagene). Com base na concentração de DNA estimada, procedeu-se a sua diluição para 50 ng/μL a qual foi armazenada a -20° C.

### 3.3.2 Reação e amplificação do DNA

A análise por AFLP foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Vos *et al.* (1995), com adaptações. Neste estudo foram analisadas 852 combinações de *primers*. Inicialmente, procedeu-se a digestão de 350 ng/μL de DNA, utilizando enzimas de restrição, uma de corte raro (*EcoRI*) e outra de corte freqüente (*MseI*). Às extremidades dos fragmentos de DNA digeridos foram ligados adaptadores em uma reação contendo a T4 DNA ligase (Promega). A reação de ligação foi realizada a 20±2° C por 3 horas. Posteriormente, o material foi diluído a 1:10 em TE pH 8,0 e armazenado a -20° C para uso na etapa de amplificação pré-seletiva.

Na amplificação pré-seletiva, os fragmentos de DNA contidos na solução diluída da etapa de ligação foram amplificados usando *primers* complementares aos adaptadores com mais um nucleotídeo seletivo adicional na extremidade 3'. As reações constituíram-se de 1,50 ng/μL de oligo *EcoRI* + N, 1,50 ng/μL oligo *Mse I* + N, 0,25 mM de cada dNTP (Promega), 1X do tampão da *taq*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 μL de reação de ligação diluído a 1:10, 16,375 μL de água ultrapura, 2,5 unidades de *taq* DNA polimerase (Phonetría), perfazendo 25 μL de volume final. O programa de amplificação foi composto por 23 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Ao final, o produto da reação foi diluído a 1:40 em TE pH 8,0 e armazenado a -20° C.

Na amplificação seletiva foram usados *primers* seletivos contendo 3 nucleotídeos adicionados a sua extremidade 3', sendo o primeiro

nucleotídeo correspondente ao utilizado na amplificação pré-seletiva. Os *primers* foram representados por *EcoRI* + NNN e *Mse* + NNN, em que o N simboliza os nucleotídeos adicionais contidos na extremidade do adaptador. As reações constituíram-se de 1,25 ng/μL de *primer EcoR* + NNN, 1,50 ng/μL de *primer Mse* + NNN, 0,25 mM de cada dNTP (Promega), 1X de tampão da *taq*, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 unidades de *taq* DNA polimerase (5 U/μL, Phoneutria), 5,0 μL do produto da amplificação pré-seletiva diluída e 9,90 μL de água ultrapura, perfazendo volume final de 20 μL de reação. O programa de amplificação seletiva constituiu-se de 13 ciclos composto por desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento de 65°C por 30 segundos (-0,7° C a cada ciclo), extensão de 72°C por 60 segundos, seguidos de 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. Ao produto desta reação foi adicionado 8,0 μL de tampão composto por formamida 98%, EDTA pH 8,0 10 mM, xylene cyanol 1 mg/mL e bromophenol blue 1 mg/mL. Em seguida as reações foram desnaturadas em termociclador PTC-200 a 95° C por cinco minutos.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida [acrilamida/bis-acrilamida (19:1) 6,0%, 7,5 M de uréia, TBE 5,0X]. Utilizou-se o sistema eletroforético “Sequi-Gen GT” (BioRad). A solução estoque foi filtrada, a vácuo, em filtro de 0,2 μm, subsequentemente acondicionada em frasco âmbar envolto por papel alumínio e armazenada a 4°C. As placas usadas na montagem do gel foram cuidadosamente limpas, empregando etanol 70%. Na placa maior, onde o gel deve ser aderido, foi aplicado 1,1 mL de uma solução contendo 95% de etanol absoluto + 0,5% de ácido acético e 2,4 μL de *Bind silane* (Promega). Esta solução foi aplicada na superfície da placa e espalhada com auxílio de um lenço de papel. O excesso foi retirado com lenço de papel umedecido com etanol absoluto 70%. A placa menor foi cuidadosamente limpa utilizando o mesmo procedimento anteriormente descrito, entretanto, nesta foi aplicado Sigmacote (Sigma), substância hidrofóbica para evitar que o gel venha a se aderir nesta placa no momento da sua desmontagem. Após dez minutos o excesso foi retirado através de três limpezas com lenços de papel umedecidos com etanol absoluto 70%.

No preparo do gel foram empregados 85 mL da solução estoque de bis-acrilamida 6%, 85  $\mu$ L de TEMED (Sigma) e 425  $\mu$ L de persulfato de amônio 10%, polimerizado por uma hora. Anterior a aplicação das amostras, procedeu-se uma pré-corrída de uma hora e trinta minutos a 100 Watts. Antes e após a pré-corrída a canaleta foi limpa com o auxílio de uma seringa e subsequentemente, as amostras foram aplicadas no gel. Estas foram submetidas a eletroforese a 80 Watts por aproximadamente 3 horas.

Para a coloração do gel, empregou-se o método de coloração com nitrato de prata (Creste et al., 2001), adaptado para café. Após a eletroforese, a placa contendo o gel foi imersa em solução de fixação contendo etanol absoluto 10% e ácido acético 1%, mantido sob agitação lenta por 12 minutos. Subsequentemente, o gel foi lavado com 2 L de água ultrapura sob agitação por 1 minuto. O pré-tratamento foi realizado pela imersão do gel em solução contendo ácido nítrico 1,5% por 3 minutos. Efetuou-se mais uma lavagem utilizando 2 L de água ultrapura por 1 minuto, sob agitação. O gel foi corado com solução de  $\text{AgNO}_3$  (0,3%) por 25 minutos, e em seguida efetuou-se duas lavagens de 35 segundos cada com água ultrapura, sob agitação. Em seguida, o gel foi imerso em 1 L de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3% ) e formaldeído (0,02%), mantido sob agitação até que as primeiras bandas pudessem ser visualizadas. A solução foi descartada e mais 1 L de nova solução adicionada ao processo. O gel foi corado até apresentar o padrão de coloração desejado. Após a imersão do gel em 2 L de solução bloqueadora (ácido acético a 5%) por 5 minutos, sob lenta agitação, finalmente, procedeu-se a sua lavagem em 2 L de água ultrapura por 1 minuto. O gel corado foi mantido na posição vertical em local arejado para posterior análise dos fragmentos de DNA amplificados.

### **3.3.3 Identificação de marcadores ligados ao gene de resistência**

Para a identificação dos marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do Híbrido de Timor UFV 427-15, utilizou-se a técnica BSA (*Bulk Segregant Analysis*), proposta por Michelmore et al. (1991). Segundo os autores, esta metodologia consiste em um rápido procedimento para identificar marcadores em regiões específicas do genoma.

A metodologia envolve a comparação de dois conjuntos de DNAs de indivíduos de uma população segregante. Dentro de cada conjunto ou *bulk*, os indivíduos são idênticos para uma característica ou gene de interesse, mas aleatórias para os demais genes.

Desta forma, em uma primeira análise, dois *bulks* contrastantes para reação à ferrugem foram gerados. Foram usados oito indivíduos resistentes para um *bulk* e oito suscetíveis para o outro. Sob esta condição foram testadas 620 combinações de *primers*. Em uma segunda análise, reduziu-se para cinco o número de indivíduos que compunham cada *bulk*. Nesta etapa foram analisadas 176 combinações de *primers* AFLP.

### **3.3.4 Análise estatística**

O teste de segregação das bandas heteromórficas e da resistência/suscetibilidade apresentado pelas plantas avaliadas foi realizado usando o teste de Qui-quadrado com auxílio do programa Genes (Cruz, 2001)

A determinação da provável ordem dos marcadores e de suas distâncias em relação ao gene de resistência a ferrugem alaranjada do cafeeiro foi obtida utilizando a função de frequência de recombinação, com o auxílio do aplicativo computacional GQMOL (Cruz & Schuster, 2001). Os valores obtidos pela frequência de recombinação foram apresentados em centiMorgan (cM).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Herança da resistência à raça II de *Hemileia vastatrix* no Híbrido de Timor**

Dentre as 160 plantas analisadas na população segregante F<sub>2</sub>, a resistência foi verificada em 124 indivíduos (77%) enquanto 36 indivíduos foram considerados suscetíveis (23%). Estes dados confirmaram o padrão de segregação de 3:1, esperado para um único gene dominante ( $\chi^2=0,5336$ ,  $P=0,4652$ ; Tabela 1). A segregação observada nas populações dos retrocruzamentos resistente (RCr) e suscetível (RCs) confirma a herança monogênica dominante do Híbrido de Timor (Tabela 1).

**Tabela 1.** Segregação da resistência à raça II de *Hemileia vastatrix* no cruzamento entre o genitor resistente Híbrido de Timor UFV 427-15 e o suscetível Catuaí Amarelo UFV 2143-236.

População <sup>1</sup>	No de plantas		Proporção <sup>2</sup> observada	Proporção <sup>2</sup> esperada	$\chi^2$	Probabilidade (%)
	R	S	R:S	R:S		
UFV 427-15	20	0	1:0	1:0	---	---
UFV 2143-236	0	20	0:1	0:1	---	---
F <sub>1</sub>	20	0	1:0	1:0	---	---
F <sub>2</sub>	124	36	3,40:1	3:1	0,5336	46,5208
RCs	63	72	0,87:1	1:1	0,3684	54,3866
RCr	20	0	1:0	1:0	---	---

<sup>1</sup>População oriunda do cruzamento entre o Híbrido de Timor (UFV 427-15) e o Catuaí amarelo (UFV 2143-236).  
<sup>2</sup>proporção observada e proporção esperada para suscetíveis e resistentes.

O genitor resistente Híbrido de Timor UFV 427-15 apresentou-se completamente isento de qualquer sintoma da doença em todas as avaliações e repetições efetuadas, enquanto o genitor suscetível Catuaí Amarelo UFV 2143-236 foi infectado, fato evidenciado pela abundante esporulação (nota 6; Figura 1).

#### 4.2 Identificação de marcadores AFLP ligados à resistência do cafeeiro à ferrugem

Pelo presente estudo verificou-se que a técnica de AFLP constitui-se em ferramenta apropriada à identificação de marcadores moleculares ligados a resistência à ferrugem. Foram utilizadas 852 combinações de *primers* AFLP e, aproximadamente, 52.000 bandas foram analisadas. Detectaram-se, dependendo da combinação de *primers* empregada na reação, entre 18 e 165 fragmentos de DNA amplificados. As combinações utilizadas neste estudo foram agrupadas segundo o conjunto de *primers* empregado na amplificação pré-seletiva e estão apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2.** Número de combinações de *primers* testadas e polimorfismos observados entre o genitor resistente Híbrido de Timor UFV 427-15 e o suscetível Catuaí Amarelo UFV 2143-236 e entre *bulks*.

	<sup>2</sup> E-ANN/M-CNN <sup>1</sup>	<sup>2</sup> E-ANN/M-CNN	<sup>2</sup> E-CNN/M-ANN	<sup>2</sup> E-GNN/M-ANN	<sup>3</sup> E-CNN/M-TNN
Total de combinações	106	64	256	250	176
Combinações polimórficas entre genitores	50	24	78	67	101
Fragmentos polimórficos presentes no UFV 427-15	116	12	51	94	278
Fragmentos polimórficos presentes no UFV 2143-236	33	46	53	80	142
Combinações polimórficas nos genitores e nos <i>bulks</i>	---	22	64	09	09
Fragmentos presentes no <i>bulk</i> resistente	---	08	22	04	16
Fragmentos presentes no <i>bulk</i> suscetível	---	26	58	05	03

<sup>1</sup>"N" refere-se a cada nucleotídeo adicional presente nos *primers*.

<sup>2</sup>Refere-se às combinações de *primers* testadas utilizando *bulks* de oito indivíduos cada.

<sup>3</sup>Refere-se às combinações de *primers* testadas utilizando *bulks* de cinco indivíduos cada

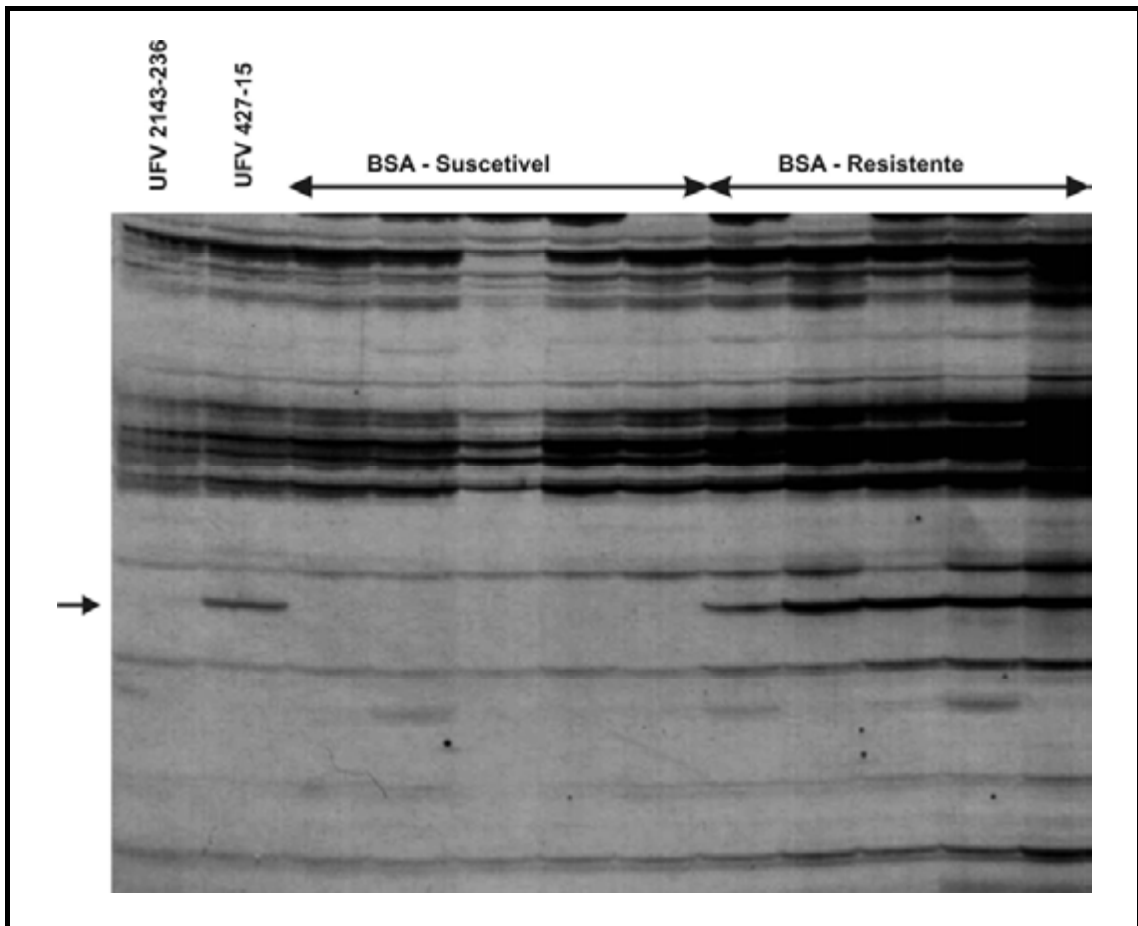
Inicialmente, realizou-se análise do polimorfismo de diferentes combinações de *primers* AFLP apenas entre os genitores. Esperava-se, com tal procedimento, eliminar as combinações monomórficas a serem testadas nos *bulks* segregantes, reduzindo o número de reações, de géis e, conseqüentemente, o tempo e custo da metodologia. No entanto, após análise de 106 combinações, constatou-se uma grande quantidade de polimorfismo entre os genitores. Optou-se, portanto, por efetuar o teste do polimorfismo dos *primers* juntamente com a dos *bulks* segregantes. Das 106 combinações E-ANN/M-CNN testadas, (50) 47% foram polimórficas nos genitores, sendo 116 bandas amplificadas apenas no genitor resistente (presentes no genitor resistente e ausente no suscetível). Na etapa seguinte, estas combinações polimórficas entre os genitores, não apresentaram polimorfismos entre os *bulks*.

Das 64 combinações de *primers* E-ANN/M-CNN analisadas, (24) 37,50% foram polimórficas entre os genitores. Cerca de 66% das bandas polimórficas presentes somente no genitor resistente apresentaram polimorfismo entre os *bulks*. Ou seja, oito bandas apresentaram-se presentes no genitor e no *bulk* resistentes e ausentes no genitor e *bulk* suscetível, constituindo, portanto, em potenciais marcadores ligados em acoplamento ao gene de resistência. Subseqüentemente, 256 combinações de *primers* E-CNN/M-ANN foram analisadas e (78) 30,46% apresentam-se polimórficas entre os genitores. Do total de bandas polimórficas presentes no

genitor resistente, 43,14% foram confirmadas como polimórficas nos *bulks*, amplificando somente no resistente. Das 250 combinações de *primers* E-GNN/M-ANN analisadas, (67) 26,80% foram polimórficas entre os genitores. Aproximadamente, 5,30% das bandas polimórficas amplificadas somente no genitor resistente mantiveram-se polimórficas no *bulk* resistente. Após a análise de 176 combinações de *primers* E-CNN/M-TNN, utilizando *bulks* contrastantes constituídos por cinco indivíduos cada, (101) 57% das combinações foram polimórficas entre os genitores. Destas, somente cerca de 16% das bandas polimórficas presentes apenas no Híbrido de Timor mantiveram-se presentes apenas no *bulk* resistente.

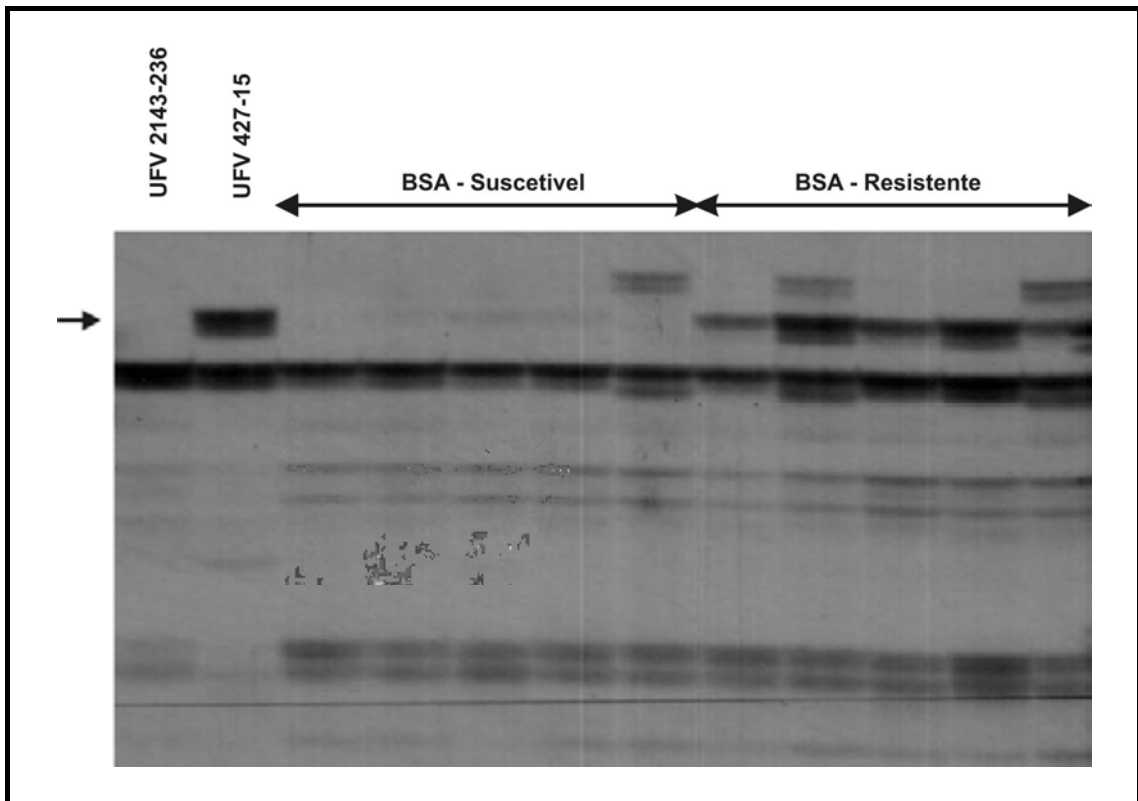
Após a análise de um total de 852 combinações de *primers*, foram detectados, ao todo, 50 fragmentos presentes no genitor e *bulk* resistentes e ausentes no genitor e *bulk* suscetíveis. Destas, três foram confirmadas após a análise separada de cada indivíduo pertencente aos *bulks*, ou seja, verificou-se a presença da banda em todos os indivíduos do *bulk* resistente e a sua ausência em todos os indivíduos do *bulk* suscetível.

O primeiro marcador candidato identificado (E.CTC/M.TTT<sub>405</sub>) corresponde a um fragmento de DNA amplificado de 405 pb (Figura 2). O segundo (E.CCT/M.TTC<sub>230</sub>) amplificou um fragmento a 230 pb (Figura 3) e um terceiro (E.CGT/M.TGT<sub>300</sub>) amplificou um fragmento a 300 pb (Figura 4).

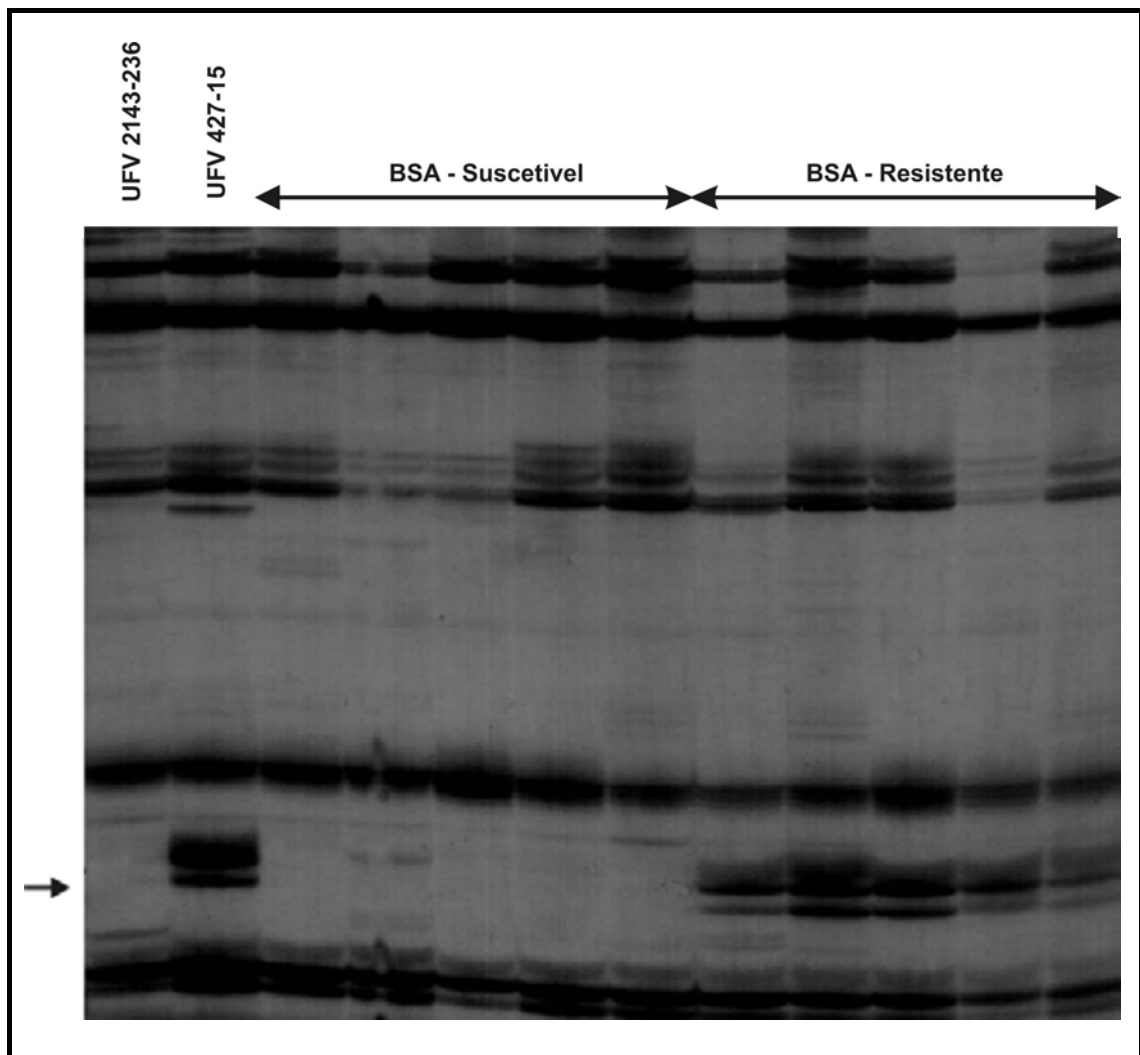


**Figura 2.** Marcador candidato AFLP de 405 pb amplificado com a combinação de *primers* E.CTC/M.TTT. Visualiza-se da esquerda para a direita o genitor suscetível UFV 2143-236 e o resistente UFV 427-15, delimitado pelas flechas na extremidade superior do gel apresentam-se os cinco indivíduos do *bulk* suscetível e os cinco indivíduos do *bulk* resistente. A seta a esquerda indica a posição do marcador E.CTC/M.TTT<sub>405</sub>.





**Figura 3.** Marcador candidato AFLP de 230 pb amplificado com a combinação de *primers* E.CCT/M.TTC. Visualiza-se da esquerda para a direita o genitor suscetível UFV 2143-236 e o resistente UFV 427-15, delimitado pelas flechas na extremidade superior do gel apresentam-se os cinco indivíduos do *bulk* suscetível e os cinco indivíduos do *bulk* resistente. A seta a esquerda indica a posição do marcador E.CCT/M.TTC<sub>230</sub>.



**Figura 4.** Marcador candidato AFLP de 300 pb amplificado com a combinação de *primers* E.CGT/M.TGT. Visualiza-se da esquerda para a direita o genitor suscetível UFV 2143-236 e o resistente UFV 427-15, delimitado pelas flechas na extremidade superior do gel apresentam-se os cinco indivíduos do *bulk* suscetível e os cinco indivíduos do *bulk* resistente. A seta a esquerda indica a posição do marcador E.CGT/M.TGT<sub>300</sub>.

Os três marcadores candidatos foram testados nos 160 indivíduos que compõem a população segregante F<sub>2</sub>, e confirmaram sua ligação ao gene de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro.

A segregação do gene de resistência à ferrugem e dos três marcadores identificados está apresentado na tabela 3.

**Tabela 3.** Análise da segregação do gene de resistência do Híbrido de Timor UFV 427-15 e dos três marcadores identificados na população F<sub>2</sub> oriunda do cruzamento entre o Híbrido de Timor UFV 427-15 e Catuaí Amarelo UFV 2143-236.

Loco testado*	Proporção esperada	Proporção observada	$\chi^2$	Probabilidade (%)	Distância (cM) <sup>3</sup>
R	3:1 <sup>1</sup>	124:36	0,5336	46,5208	---
E.CTC/M.TTT <sub>405</sub>	3:1	124:36	0,30	58,3882	---
E.CCT/M.TTC <sub>230</sub>	3:1	133:27	5,6333	1,7622	---
E.CGT/M.TGT <sub>300</sub>	3:1	118:42	0,1333	71,5000	---
R/E.CTC/M.TTT <sub>405</sub>	9:3:3:1 <sup>2</sup>	118:6:6:30	85,1111	0,0000	8,69
R/E.CCT/M.TTC <sub>230</sub>	9:3:3:1	118:6:15:21	47,5111	0,0000	20,50
R/E.CGT/M.TGT <sub>300</sub>	9:3:3:1	103:21:15:21	24,1777	0,0022	28,00

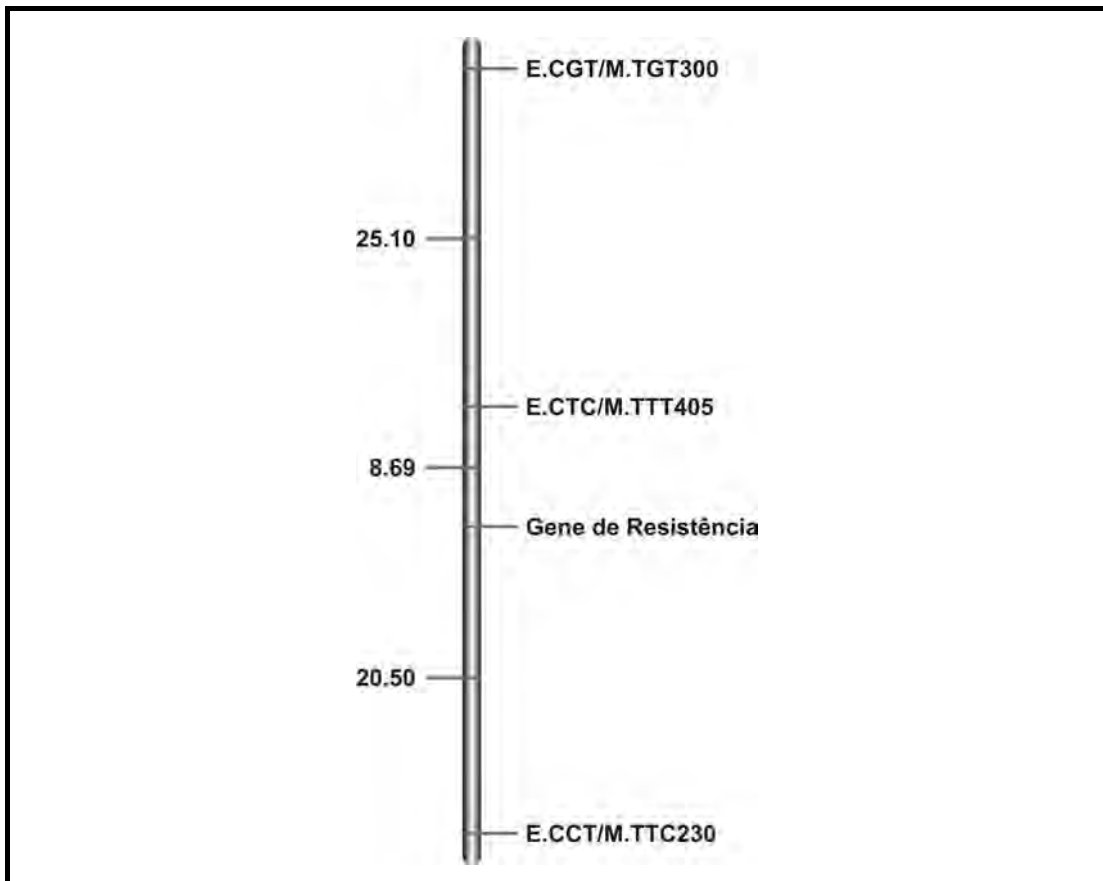
<sup>1</sup>Proporção esperada para a herança monogênica e dominante presente na população F<sub>2</sub> (3 resistente, R<sub>-</sub>, ou presença da banda: 1 suscetível, ou ausência da banda).

<sup>2</sup>Proporção esperada para a segregação de dois locos independentes na progênie F<sub>2</sub> (R<sub>-</sub>/+; R<sub>-</sub>/-; rr/+; rr/-)

<sup>3</sup>Distância genética em centimorgans.

Observou-se na tabela 3, co-segregação entre o loco de resistência em análise e os marcadores testados. Por meio da análise de recombinação demonstrou-se que o marcador E.CTC/M.TTT<sub>405</sub> posiciona-se a 8,69 cM de distância do gene de resistência, com valores calculados de *lod score* de 18,91. O marcador E.CCT/M.TTC<sub>230</sub> situa-se a 20,50 cM do gene, com *lod score* igual a 6,15. Um terceiro marcador E.CGT/M.TGT<sub>300</sub> situa-se a 28,00 cM do gene de resistência, com *lod score* calculado de 4,02.

O mapa contendo o gene de resistência e os marcadores AFLP está representado na figura 5. Observa-se que o gene de resistência à ferrugem está sendo flanqueado por dois marcadores. Estes marcadores encontram-se ligados, em fase de acoplamento, ao gene de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro.



**Figura 5.** Mapa de ligação contendo as posições dos marcadores AFLP identificados e as suas distâncias (cM) entre si e entre o gene de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Herança da resistência à raça II de *Hemileia vastatrix* no Híbrido de Timor

O estudo de herança efetuado junto às populações segregantes ( $F_2$ , RCs e RCr), derivadas do cruzamento entre o Híbrido de Timor UFV 427-15 genitor resistente e o catuaí amarelo UFV 2143-236 genitor suscetível, confirmou a herança monogênica dominante do acesso de Híbrido de Timor em estudo. Demonstrou-se que o Híbrido de Timor UFV-427-15 constitui-se em fonte importante de resistência para a raça II de *H. vastatrix*, em concordância com outros estudos já efetuados (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988; Pereira, 1995; Caixeta et al., 2003a). Todavia, este resultado não exclui a possibilidade de que o locus em estudo corresponda a um agrupamento complexo de diversos genes de resistência arranjados em

*tandem*, como reportado em plantas por diversos autores (Richly et al., 2002; Town et al., 2006), os quais segregariam como um único loco.

O espectro de resistência conferido pelos genes presentes no Híbrido de Timor pode ser total ou parcialmente anulado pela combinação dos genes de virulência (v5, v6, v7, v8 e v9) presentes em diferentes raças do fungo (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988). No presente estudo, a resistência apresentada pelo Híbrido de Timor UFV-427-15 deve ser conferida por um alelo distinto do S<sub>H</sub>5, tendo em vista que a raça II usada neste estudo possui, em sua constituição genotípica, somente o alelo v5 para a virulência (Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971). Considerando a adequação ao modelo gene-a-gene (Flor, 1971) da interação *Coffea-Hemileia* (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988), o fator de resistência presente na população em estudo deve diferir-se também do S<sub>H</sub>6, fato constatado pela resistência do Híbrido de Timor UFV-427-15 à inoculação com uredósporos da raça XXV (Pereira, 1995), que possui, além dos alelos v2 e v5, também o alelo v6 para a virulência (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988). Ao se excluir a possibilidade da presença de outro gene de resistência ainda desconhecido, a resistência observada na população em estudo deve estar, provavelmente, relacionada a um dos genes S<sub>H</sub>7, S<sub>H</sub>8 ou S<sub>H</sub>9, isoladamente, ou em combinação caso estejam estreitamente ligados no locus de resistência identificado neste trabalho.

A presença de apenas um gene dominante determinando a resistência do cafeeiro a *H. vastatrix*, com padrão de herança simples facilitará, certamente, sua transferência para cultivares portadoras de atributos agronômicos interessantes, em programas de melhoramento do cafeeiro para a resistência a esta doença.

## **5.2 Identificação de marcadores AFLP ligados à resistência do cafeeiro à ferrugem**

A metodologia BSA foi eficiente na identificação de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência à ferrugem do cafeeiro. Na maioria dos trabalhos que usam esta metodologia, os *bulks* segregantes são constituídos por oito indivíduos cada (Ferreira et al, 2000 Caixeta et al, 2003; Lukens et al., 2006). Segundo Michelmore et al (1991), o uso de *bulks* com poucos

indivíduos propicia o surgimento de falsos positivos. Todavia, neste estudo, a redução para cinco indivíduos que compõe cada *bulk* foi mais eficiente em identificar marcadores ligados e não aumentou o número de falsos positivos (resultados não apresentados). Desta forma, todos os três marcadores candidatos identificados utilizando um *bulk* com tamanho de cinco indivíduos, confirmaram-se como marcadores ligados à resistência, concordando com resultados obtidos por outros autores (Muylle, 2003; Muylle et al., 2005). A probabilidade de obtenção de um falso positivo em uma população  $F_2$  utilizando marcadores dominantes, quando *bulks* foram compostos por cinco indivíduos, é de  $1,8 \times 10^{-6}$ , portanto, praticamente inexistente (Muylle, 2003).

No presente trabalho, a técnica de AFLP demonstrou-se eficiente na geração de marcadores ligados ao gene de resistência do cafeeiro. Outros autores (Lashermes et al, 2000; Prakash et al., 2004) também utilizaram com sucesso esta técnica para identificar marcadores moleculares ligados a genes de resistência. No presente estudo, analisando os genitores contrastantes para a resistência a *H. vastatrix*, o acesso do Híbrido de Timor UFV 427-15 (resistente) e outro de *C. arabica* Catuaí Amarelo UFV 2143-236 (suscetível), foram detectadas taxas de aproximadamente 1,10 fragmentos AFLP polimórficos por combinação de *primers* empregada. Estes valores são inferiores aos encontrados por Lashermes et al. (2000), que ao comparar acessos de *C. arabica* com genótipos derivados do Híbrido de Timor constataram uma taxa de, aproximadamente, 2,50 fragmentos AFLP polimórficos amplificados por combinação de *primers*. Esta variação pode estar relacionada a menor variabilidade genética dos genitores usados no presente estudo.

Foram identificados três marcadores ligados, em fase de acoplamento, ao gene de resistência à ferrugem presente no acesso do Híbrido de Timor UFV 427-15. Dentre estes, dois marcadores flanqueiam o gene de resistência. O primeiro marcador (E.CTC/M.TTT<sub>405</sub>) posiciona-se a 8,69 cM de distância, enquanto que o segundo (E.CCT/M.TTC<sub>230</sub>) situa-se a 20,50 cM do gene de resistência.

A obtenção de marcadores flanqueando genes de interesse constitui-se em informação útil ao melhoramento assistido, tendo em vista que tem

sido comprovada uma maior eficiência de seleção pelo emprego de marcadores flanqueando, se comparada ao seu emprego de forma isolada (Corrêa et al., 2001). No presente trabalho, uma análise comparativa demonstrou eficiência 3% maior ao se utilizar marcadores flanqueando o gene de resistência, seguindo metodologia descrita por Corrêa et al. (2001). Esta maior eficiência de seleção observada deve-se a menor probabilidade de ocorrência de indivíduos selecionados ou descartados erroneamente (Griffiths et al., 1998).

Poucos marcadores moleculares ligados a genes de resistência a ferrugem foram obtidos até o momento. Os marcadores obtidos por Prakash et al. (2004) estão ligados a um gene oriundo de *C. liberica* ( $S_{H3}$ ). Entretanto, *C. liberica* possui somente um gene de resistência, a qual já foi suplantada pela ocorrência, no Brasil, da raça XVI em cafeeiros cultivados no estado de Minas Gerais (Cardoso et al. 1988). A ocorrência da raça XVI no Brasil compromete a resistência no campo de todas as combinações entre os fatores de resistência ao patógeno de  $S_{H1}$  a  $S_{H5}$ , tendo em vista que esta raça possui, em sua constituição genotípica, os genes de virulência v1, v2, v3, v4 e v5. Todavia, vários genes existem, potencialmente, no Híbrido de Timor. Considerando a alta variabilidade genética do patógeno, é muito importante obter marcadores para o maior número possível de genes de resistência, de forma a permitir que a piramidação destes genes, em programas de melhoramento para esta característica, resulte em resistência durável ao patógeno. Assim sendo, o uso de Híbridos de Timor para o isolamento dos diferentes genes presentes em sua população para obtenção de uma resistência durável seria mais recomendada. Os resultados conseguidos no presente trabalho constituem-se no primeiro registro da obtenção de marcadores flanqueando um gene de resistência à ferrugem do cafeeiro proveniente do Híbrido de Timor.

Um número expressivamente menor de marcadores foram encontrados neste trabalho (três), quando comparado aos 21 marcadores AFLP identificados ligados ao gene  $S_{H3}$  por Prakash et al. (2004), embora tenha se utilizado um número muito maior de combinações de *primers* (852), em relação àquele trabalho (80 combinações). Esta diferença na identificação de marcadores ligados a resistência à ferrugem no Híbrido de

Timor pode estar relacionada a menor variabilidade genética entre genitores usados em nosso trabalho. O genitor resistente Híbrido de Timor UFV 427-15, um híbrido oriundo do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora*, submeteu-se a sucessivos eventos de retrocruzamentos com *C. arabica*, o que o torna, em termos de diversidade genética, muito semelhante ao genitor suscetível Catuaí Amarelo UFV 2143-236. Por outro lado, a população F<sub>2</sub> usada por Prakash et al (2004) origina-se do cruzamento entre Matari, um acesso de arabica e a linhagem 288, introgridida de liberica sendo, portanto, geneticamente mais distantes entre si, quando comparados com os genitores utilizados neste trabalho. Este fato associado a certa pressão natural de seleção da população segregante de retrocruzamentos naturais do Híbrido de Timor para a resistência à ferrugem, pode ter reduzido o tamanho dos fragmentos cromossômicos contendo o genótipo de *C. canephora* introgridido, tornando menor a ligação dos polimorfismos detectados ao gene de resistência.

## 6. CONCLUSÕES

As modificações efetuadas na metodologia de extração de DNA, na técnica de AFLP, no método de coloração do gel e as alterações no número de indivíduos constituintes dos *bulks* mostraram-se adequadas à obtenção de marcadores ligados ao gene de resistência à ferrugem do cafeeiro. O uso de cinco indivíduos por *bulk* foi mais eficiente em identificar marcadores ligados, sem, no entanto, aumentar o número de falsos positivos.

Os resultados aqui apresentados são os primeiros quanto à obtenção de marcadores moleculares flanqueando o gene de resistência à ferrugem presente no Híbrido de Timor. Estas informações constituem-se em um instrumento útil para o melhoramento assistido por marcadores, não apenas pelo fato de serem as únicas marcas disponíveis, mas também pelo fato de flanquear o gene, aumentando a eficiência de seleção de forma a acelerar este processo. Estes marcadores poderão ser convertidos em SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*). A disponibilidade de marcadores SCAR para genes que conferem resistência à ferrugem



facilitará o seu uso para auxiliar os programas de melhoramento do cafeeiro na obtenção de cultivares resistentes a este patógeno.

A reduzida ligação dos polimorfismos detectados com a resistência sugere que os retrocruzamentos do Híbrido de Timor com *C. arabica* tenha diminuído o tamanho dos fragmentos cromossômicos contendo o genótipo de *C. canephora* introgridido. Desse modo, a grande similaridade genética do Híbrido de Timor com as variedades de *C. arabica* dificultará a identificação de novos marcadores moleculares ligados a genes de resistência. Entretanto, o esforço justifica-se pelo maior potencial do Híbrido de Timor em gerar uma resistência mais durável.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios GN (1988) Plant Pathology, 3rd Ed. San Diego: Academic Press, 803p

Ávila CM, Sillero JC, Rubiales D, Moreno MT, Torres AM (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

Baker B, Zambryski P, Staskawicz SP, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. Science. 276:726-733

Bent AW (1996) Plant disease resistance genes: function meets structure. The Plant Cell 8:1757-1771

Bettencourt AJ, Noronha-Wagner M Lopes M (1980) Fator genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Brot Genet 1:76:53-58

Bettencourt AJ, Rodrigues CJ (1988) Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: Clarke RJ, Macrae R (Eds) Coffee: agronomy. London: Elsevier Applied Science 3:199-234

Bettencourt AJ & Noronha-Wagner M (1971) Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. Agron Lusit. 31:285-292

Blears MJ, De Grandis SA, Lee H, Trevors JT (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. J. Indust. Microbiol. Biotechnol. 21:99-114

Bonas U & Lahaye T (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: Refined models of specific recognition. Current Opinion Microbiology 5:44-50

Caixeta ET, Rufino RJN, Oliveira ACB, Sakiyama NS, Zambolim EM, Zambolim L. (2003a) Caracterização da resistência genética do híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, (eds): Porto Seguro. Anais. Brasília, DF : Embrapa Café. 447p, p. 226

Caixeta ET, Borém A, Azevedo SF, Niestche S, Barros EG, Moreira MA (2003b) Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. Euphytica 134:3:297-303

Cannon SB, Zhu H, Baumgarten AM, Spangler R, May G, Cook DR (2002) Diversity, distribution and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. Journal Molecular Evolution, New York-U.S.A. 54:548-562

Cardoso RML, Zambolim L, Chaves GM (1988) Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* coletada do germoplasma de *Coffea arabica* no Estado de Minas Gerais. Fitopatol Bras 13:4:343-346

Chalhoub BA, Thibault S, Laucou V, Rameau C, Hofte H, Cousin R (1997). Silver staining and recovery of AFLP<sup>TM</sup> amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. BioTechniques 22:216-220.

Chelkowski J, Stepien L (2001) Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. *J Appl Genet.* 2:117-26

Corrêa RX, Good-God PIV, Oliveira MLP, Nietzsche S, Moreira M, Barros EG (2001) Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. *Fitopatol Bras.* 26:1:27-32

Creste S, Tulmann-Neto, A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biol Repor* 4:299-306

Cruz CD (2001) Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística: versão Windows Viçosa: editora UFV 648p

Cruz CD & Schuster I (2001) GQMOL: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa

Dangle JL & Jones DG (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411:826-833

Dinesh-Kumar SP, Tham W, Baker BJ (2000) Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *PNAS*, 26:14789–14794

Dong X (2001) Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 4:309-314

Ellis JE, Jones D (1998) Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Current Opinion Plant Biology*, London, 1:288-293

Fazuoli LC, Medina Filho HP, Gonçalves W, Guerreiro Filho O, Silvarolla MB (2002) Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arabica obtidas no Instituto Agrônomo em Campinas. In: Zambolim, L. (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, pp63-215

Fazuoli LC, Oliveira ACB, Toma-Braguini M, Silvarolla MB (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

Ferreira CF, Borém A, Carvalho GA, Nietsche S, Paula TJ, Barros EG, Moreira MA (2000) Inheritance of angular leaf spot resistance in *Common Bean* and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. *Crop Sci.* 40:1130-1133

Flor HH (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Ann Rev Phytop* 9:275-296

Griffths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1998) Introdução à genética. Trad. Paulo Armando Motta. (6ª ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 856p

Guzzo SD (2004) Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tese de doutorado, Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura 236p

Hammond-Kosack KEE; Jones, DG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell, Tucson-USA*, 8:1773-1991

Hammond-Kosack KEE & Jones DG (1997) Plant disease resistance genes. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48:575-607

Hammond-Kosack KEE & Jones DG (2000) Responses to plant pathogens. In: Buchanan B et al. (ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists 1102-1156

Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KEE, Balint-Kurti PJ, Jones JDG (1994) Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science, Washington.* 266:789-793

Kushalappa AC, Eskes AB (1989) Advances in coffee rust research. *Annu Rev Phytopathol* 27:503–531

Lashermes P, Andrzejewski S, Bertrand B, Combes MC, Dussert S, Graziosi G, Trouslot P (2000) Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea Arabica* L). *Theor Appl Genet* 100:139-146

Leppik EE (1970) Gene centers of plants as sources of disease resistance. *Ann Rev of Phytopathol, Palo Alto-USA*, 8:323-344

Lukens LN, Pires JC, Leon E, Vogelzang R, Oslach L, Osborn T 2006 Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiol.* 140: 336-348.

Lupas A (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, 21:375-382

Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Gahal MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262:1432-1436

Matiello JB, Santinato R, Garcia AWR, Almeida SR, Fernandez DR (2002) *Cultura de café no Brasil. Novo Manual de Recomendações*. In: Matiello, J.B. (ed.) Rio de Janeiro MAPA/PROCAFE 387p

Mcdowell JM and Woffenden BJ (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotechnology*. 21:178-183

Metraux JP (2001) Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology* 107:13-18

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (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. *Proc Natl Acad Sci* 88:9828-9832

Murray MG & Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 8: 4321-4325

Muylle H (2003) Genetic analysis of crown rust resistance in ryegrasses (*Lolium* spp.) using molecular markers: Thesis of Doctor in Applied Biological Sciences, Universiteit Gent 207p

Muylle H, Baert J, Bockstaele EV, Pertijs J, Rolda-Ruiz I (2005) Four QTLs determine crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *lolii*) resistance in a perennial ryegrass (*Lolium perenne*) population. *Heredity* 95:348-357

Pereira AA (1995) Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk, et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. Tese de doutorado, Viçosa, Programa Pós-graduação em Fitopatologia, 77p

Pereira AA, Moura WM, Zambolim L, Sakiyama NS, Chaves GM (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

Pink DAC (2002) Strategies using genes for non-durable resistance. *Euphytica* Peterboroug-England 1:227-236

Prabhu V, Somers DJ, Rakow GY, Gugel RK (1998) Molecular markers linked to white rust resistance in mustard *Brassica juncea*. *Theor Appl Genet* 97:865-870

Prakash NS, Marques DV, Varzea VMP, Silva MC, Combes MC, Lashermes P (2004) Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. *Theor Appl Genet* 109:1311-1317

Richly E, Kurth J, Leister D (2002) Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol. Biol. Evol.* 19:76-84

Sera T, Alteia MZ, Petek MR (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

Somssich IE, Hahlbrock K (1998) Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3:86-90

Sreenivasan MS, Ram AS, Prakash NS (1994) Search for new sources of resistance to coffee rust. In: Central Coffee Research Institute Project report on “Pathology and improvement of coffee for the main diseases”, a collaborative project of CRRC, Portugal and CCRI, India. CRRC/CCRI, Portugal/India, p24

Srinivasan KH, Narasimhaswamy RL (1975) A review of coffee breeding work done at the Government coffee experiment station, Balehonnur. *Indian Coffee* 34:311-321

Tabor GM, Kubisia KTL, Klopfenstein NB, Hall RB McNabb HS (2000) Bulk Segregant Analysis Identifies Molecular Markers Linked to *Melampsora medusae*. Resistance in *Populus deltoides*. *Genet Resist* 90:1039-1042

Tai TH, Dahlbeck D, Clark ET, Gajiwala P, Pasion R, Whalen MC, Stall RE, Staskawicz BJ (1999) Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *PNAS*. California, Berkeley, U.S.A. 24:14153-14158

Tamayo PJ, Vale FXR, Zambolim L, Chaves GM, Pereira AA (1995) Catimor resistance to coffee leaf rust and virulence of physiological races of *Hemileia vastatrix*. *Fitopatol Bras* 20:572-576

Town CD, Cheunga F, Maiti R, Crabtree J, Haas BJ, Wortman JR, Hine EE, Althoff R, Arbogast TS, Tallon LJ, Vigouroux M, Trickb M, Bancroftb I (2006) Comparative Genomics of Brassica oleracea and *Arabidopsis thaliana* Reveal Gene Loss, Fragmentation, and Dispersal after Polyploidy. *The Plant Cell*, 18:1348-1359

Van der Vossen HAM (2001) Coffee breeding practices. In: Clarke RJ, Vitzthum OG (eds) *Coffee recent Developments*. Agronomy, vol 1. Blackwell, London, pp184-201

Van der Vossen HAM (2005) State-of-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust UFV, Viçosa, pp1-29

Vaneechoutte M, (1996) DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. Mol Biotechnol. 6:115-142

Várzea VMP, Rodrigues Jr CJ, Silva MCML, Gouveia M, Marques DV, Guerra-Guimarães L and Ribeiro A (2002) Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: Zambolim L (ed.) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa, Departamento de Fitopatologia, UFV, Viçosa, pp297-320

Vishveshwara S (1974) Periodicity of hemileia in arabica selection – S 795. Indian Coffee: 38:49-51

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting Nucleic Acids Res. 23:4407-4414

Wagner M and Bettencourt AJ (1965) Inheritance of reactin to *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. In: *Coffea arabica* L. Progress report, Coffee Rusts research Center, Oeiras, Portugal, pp1960-65

Walton JD (1996) Host-selective toxins: agents of compatibility. Plant Cell, Tucson-USA, 8:1723-1733

Young ND (2000) The genetic architecture of resistance. Curr. Opin. Plant Biol. 3:285-290

Zambolim L, Vale FXR, Costa H, Chaves GM (2002) Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: Zambolim L (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, pp369-450

Zambolim L, Vale FXR, Pereira AA, Chaves GM (1999) Manejo integrado das doenças do cafeeiro In: Zambolim L (eds) Produção de café com qualidade. UFV, Viçosa, pp134-215



## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo I

**Tabela 1** Combinações de *primers* AFLP testadas e número correspondente de polimorfismos identificados entre genitores resistente (Híbrido de Timor, UFV 427-15) e suscetível (Catuaí, UFV 2143-236) à raça II de *H. vastatrix*. As ampliações foram efetuadas com *primers* EcoRI e MseI com A e C como nucleotídeo 3', respectivamente e dois nucleotídeos seletivos adicionais.

Combinação de <i>primers</i> EcoRI/ MseI	Nº de bandas polimórficas		Combinação de <i>primers</i> EcoRI/ MseI	Nº de bandas polimórficas*		Combinação de <i>primers</i> EcoRI/ MseI	Nº de bandas polimórficas	
	Catuaí**	H. Timor		Catuaí	H. Timor		Catuaí	H. Timor
E-AAC/M-CAA	0	2	E-ACT/M-CTG	0	1	E-ATA/M-CAG	0	0
E-AAC/M-CAC	0	3	E-ACT/M-CAC	0	6	E-ATA/M-CAT	0	0
E-AAC/M-CAG	1	0	E-ACA/M-CAG	0	0	E-ATA/M-CTA	0	1
E-AAC/M-CAT	2	2	E-ACA/M-CAT	0	0	E-ATA/M-CTC	0	1
E-AAC/M-CTA	0	2	E-ACA/M-CTA	1	0	E-ATA/M-CTG	0	6
E-AAC/M-CTG	1	0	E-ACA/M-CTC	0	0	E-ATA/M-CAC	1	0
E-AAC/M-CTT	0	0	E-ACA/M-CTG	0	1	E-ATA/M-CAA	0	1
E-AAG/M-CAA	0	11	E-ACA/M-CAC	0	1	E-ATT/M-CAG	0	2
E-AAG/M-CAC	0	0	E-ACA/M-CAA	0	9	E-ATT/M-CAT	0	1
E-AAG/M-CTC	2	0	E-ACC/M-CAA	0	0	E-ATC/M-CTG	0	1
E-AAG/M-CTG	0	0	E-ACT/M-CTG	0	1	E-ATT/M-CAA	0	0
E-AAG/M-CTG	0	1	E-ACC/M-CTA	0	2	E-ATC/M-CAC	0	0
E-AAG/M-CTT	0	0	E-ACT/M-CAC	0	0	E-ATC/M-CAG	0	6
E-AAG/M-CTT	0	0	E-ACC/M-CTC	0	0	E-ATC/M-CAA	0	0
E-ACC/M-CAG	2	1	E-ACT/M-CAG	0	2	E-ATT/M-CTA	0	0
E-ACG/M-CAT	0	0	E-ACT/M-CAT	0	0	E-ATT/M-CTC	0	0
E-ACG/M-CTA	0	1	E-ACT/M-CTA	0	0	E-ATT/M-CTG	0	0
E-ACG/M-CTC	0	0	E-ACT/M-CTC	1	4	E-ATT/M-CAC	0	0
E-AGC/M-CAA	0	5	E-AAG/M-CAG	2	1	E-ATG/M-CTA	0	0
E-AGC/M-CAA	0	0	E-AAT/M-CTA	1	3	E-ACT/M-CTA	0	0
E-AGC/M-CAA	0	0	E-AAT/M-CAG	0	0	E-ACT/M-CTC	2	5
E-AGC/M-CAC	0	0	E-AAT/M-CAT	0	0	E-ACT/M-CAT	0	1
E-AGC/M-CAG	0	0	E-ACG/M-CAG	0	0	E-AAT/M-CTA	0	0
E-AGC/M-CAT	0	0	E-ACG/M-CTG	0	0	E-AAT/M-CTC	0	0
E-AGC/M-CTA	3	0	E-ACG/M-CAC	0	0	E-AAT/M-CAC	0	0
E-AGC/M-CTC	0	2	E-ACG/M-CAA	0	0	E-AAT/M-CAA	0	0
E-AGG/M-CAC	0	0	E-AAG/M-CTT	0	0	E-AGT/M-CTA	0	0
E-AGG/M-CAG	3	0	E-ACT/M-CAA	0	0	E-ATC/M-CAT	0	0
E-AGG/M-CAT	3	0	E-ACC/M-CTG	0	0	E-ATC/M-CTA	0	0
E-AGG/M-CAT	0	3	E-AAG/M-CTA	1	3	E-ATG/M-CTG	0	2
E-AGG/M-CTA	0	0	E-ACC/M-CAC	0	0	E-ATC/M-CTC	0	4
E-AGG/M-CTA	0	7	E-AAG/M-CTA	1	3	E-ATG/M-CAC	0	0
E-AGG/M-CTC	0	0	E-AAG/M-CTC	0	2	E-AGT/M-CAG	0	0
E-AGG/M-CTG	0	2	E-AAG/M-CTG	0	0	E-AGT/M-CAT	1	3
E-AGG/M-CTT	0	0	E-AAG/M-CAT	3	0	---	---	---
E-ACT/M-CAG	2	1	E-ATG/M-CTC	0	0	---	---	---

\* O número "1" refere-se a presença do fragmento de DNA amplificado e o "0" à sua ausência. \*\*Catuaí (genitor suscetível, UFV-2143-236), H. Timor (UFV 427-15, genitor resistente), EcoRI ANN/ MseI CNN\*\*\* às diversas combinações de *primers* utilizadas.

**Tabela 2.** Resultados da análise utilizando genitores e *bulks* pela combinação de *primers* AFLP (EcoRI ANN/MseI CNN), seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados e polimorfismos identificados.

Combinações de <i>primers</i> EcoRI ANN/ MseI CNN***	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-AAC/M-CAC	>2072	1	0	-	-
	600	1	0	-	-
	530	1	0	-	-
	500	1	0	-	-
E-AAC/M-CTC	2072	1	0	-	-
E-AAC/M-CTG	2072	0	1	-	-
	<100	1	0	-	-
E-AAC/M-CTA	>2072	1	0	1	0
	280	1	0	1	0
E-AAG/M-CTA	>2072	1	0	-	-
	2072	1	0	-	-
E-AAG/M-CTG	1700	1	0	1	0
	1500	1	0	1	0
	150	1	0	1	0
E-ACT/M-CTG	420	1	0	1	0
	200	1	0	1	0
	180	1	0	1	0
E-ACC/M-CAT	180	1	0	1	0
E-ACC/M-CTA	190	1	0	-	-
E-ACC/M-CTC	190	1	0	-	-
E-ACG/M-CAA	500	1	0	-	-
E-ACG/M-CAG	1300	1	0	-	-
	300	0	1	-	-
E-ACG/M-CTC	1500	1	0	1	0
	1480	1	0	1	0
E-ACG/M-CTG	1400	0	1	0	1
	550	1	0	1	0
E-AGC/M-CTG	180	1	0	1	0
E-AGG/M-CAA	210	1	0	-	-
E-AGG/M-CAG	580	1	0	1	0
E-AGG/M-CTG	<2072	0	1	0	1
	150	1	0	1	0
E-AAC/M-CTA	280	1	0	-	-
E-AAG/M-CTG	150	1	0	1	0
E-ACT/M-CTG	400	1	0	1	0
	210	1	0	1	0
	180	1	0	-	-
E-ACC/M-CTA	180	1	0	1	0
E-ACG/M-CTC	1500	0	1	0	1
	375	0	1	-	-
	150	1	0	-	-
E-ACG/M-CTG	1500	0	1	0	1
	500	1	0	1	0
	400	1	0	1	0
	380	0	1	0	1
E-AGC/M-CTC	380	1	0	-	-
E-ACG/M-CTC	1500	0	1	0	1
	375	0	1	-	-
	150	1	0	-	-
E-ACG/M-CTG	1500	0	1	0	1
	130	1	0	1	0
E-AGG/M-CTG	1500	0	1	0	1
	330	1	0	-	-
	220	1	0	-	-
	225	1	0	1	0
	180	1	0	1	0

O número "1" refere-se a presença do fragmento de DNA amplificado e o "0" à sua ausência. O "-" a ausência de polimorfismo. \*\*Catuai Amarelo (genitor suscetível, Cat UFV-2143-236), Híbrido de Timor (HT UFV 427-15, genitor resistente), *bulk'S* e *bulk'R* referem aos conjuntos de indivíduos suscetíveis e resistentes, respectivamente. EcoRI ANN/ MseI CNN\*\*\* às diversas combinações de *primers* utilizadas. BSAs compostos por oito indivíduos cada, contrastantes para a característica em estudo.

**Tabela 3.** Resultados da análise utilizando genitores e *bulks* pela combinação de *primers* AFLP (EcoRI CNN/MseI ANN), seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados e polimorfismos identificados.

Combinações de <i>primers</i> EcoRI CNN / MseI ANN***	Tamanho de fragmentos amplificados (pb)	Polimorfismos* identificados entre::			
		Catuaí**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CAA/M-ATC	1000 pb	1	0	1	1
E-CAA / M-ACC	900 pb	0	1	-	-
E-CAT/M-AAA	1500	1	0	-	-
	1510	1	0	-	-
E-CAT/M-ATT	1800	0	1	-	-
	1800	1	0	-	-
E-CAT/M-ATC	1800	1	0	1	0
E-CAT/M-ACC	1950	1	0	1	0
E-CAT/M-ACG	80	1	0	1	1
E-CAT/M-AGT	60	1	0	1	0
E-CAC/M-ATT	300	1	0	-	-
	700	1	0	-	-
E-CAC/M-ATG	250	0	1	-	-
E-CAC/M-ACG	1500	1	0	-	-
E-CAG/M-AAT	300	1	0	1	0
E-CAG/M-AAC	450	1	0	1	0
	400	1	0	-	-
	100	1	0	-	-
E-CAG/M-AAG	350	1	0	-	-
E-CAG/M-ATA	200	1	0	-	-
E-CAG/M-ATC	350	0	1	-	-
	100	0	1	-	-
E-CAG/M-ACT	400	0	1	-	-
E-CAG/M-ACC	360	1	0	-	-
E-CAG/M-AGC	500	1	0	-	-
E-CAG/M-AGG	600	1	0	1	0
	480	1	0	1	0
	380	0	1	-	-
E-CTA/M-AAC	350	0	1	-	-
	300	1	0	-	-
E-CTA/M-ATA	100	1	0	-	-
E-CTA/M-ATG	300	1	0	1	0
E-CTA/M-ACT	250	1	0	1	0
	150	1	0	1	0
E-CTA/M-ACC	150	1	0	-	-
E-CTA/M-ACG	400	0	1	-	-
E-CTA/M-AGC	200	1	0	-	-
E-CTT/M-AAA	500	1	0	1	0
	480	1	0	1	0
E-CTT/M-AAC	800	1	0	-	-
E-CTT/M-ATT	280	1	0	1	0
E-CTT/M-ATC	140	1	0	1	0
E-CTT/M-ACC	270	1	0	1	0
E-CTT/M-ACG	500	0	1	0	1
E-CTT/M-AGA	300	1	0	1	0
E-CTT/M-AGT	400	1	0	1	0
E-CTC/M-AAT	220	0	1	0	1
	110	1	0	-	-
E-CTC/M-AAG	1000	1	0	-	-
	500	1	0	1	0
	180	1	0	1	0
E-CTC/M-ATA	600	0	1	0	1
	160	0	1	-	-
E-CTC/M-ATT	600	1	0	-	-
	300	0	1	-	-
E-CTC/M-ATC	300	1	0	1	0
E-CTC/M-ATG	400	0	1	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2.

**Tabela 3.** Continuação

Combinções de <i>primers</i> EcoRI CNN / MseI ANN***	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuaí**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CTC/M-AGA	450	1	0	1	0
	180	0	1	0	1
	178	0	1	0	1
E-CTC/M-AGC	500	1	0	1	0
	200	1	0	-	-
	110	1	0	-	-
E-CTC/M-AGG	1000	1	0	1	0
	210	1	0	1	0
	208	0	1	-	-
	140	0	1	-	-
E-CTG/M-AAA	1200	1	0	-	-
E-CTG/M-AAT	1200	0	1	-	-
	400	1	0	1	0
	180	1	0	1	0
	130	1	0	-	-
E-CTG/M-AAC	150	0	1	0	1
E-CTG/M-AAG	1000	0	1	-	-
	280	0	1	0	1
E-CTG/M-ATA	1300	0	1	-	-
	180	1	0	1	0
E-CTG/M-ATT	1500	0	1	0	1
	280	0	1	0	1
	120	0	1	-	-
E-CTG/M-ATC	1300	0	1	0	1
E-CTG/M-ACG	300	0	1	0	1
	280	1	0	-	-
E-CTG/M-AGA	300	1	0	1	0
	180	1	0	1	0
E-CTG/M-AGT	200	1	0	-	-
	180	1	0	-	-
	170	0	1	-	-
E-CTG/M-AGC	500	1	0	1	0
	400	1	0	-	-
	230	1	0	1	0
E-CCA/M-AAC	150	1	0	1	0
E-CCA/M-ATG	400	1	0	1	0
	395	1	0	1	0
	220	1	0	1	0
	110	1	0	1	0
E-CCA/M-ACC	2000	0	1	0	1
E-CCA/M-ACG	500	0	1	0	1
	400	1	0	1	0
	395	1	0	1	0
E-CCA/M-AGC	300	1	0	-	-
E-CCT/M-ATA	800	1	0	-	-
	500	1	0	1	0
	200	1	0	-	-
	180	1	0	-	-
E-CCT/M-ATC	250	0	1	-	-
	200	1	0	1	0
E-CCT/M-ATG	500	1	0	1	0
E-CCT/M-ACG	330	1	0	1	0
	120	1	0	-	-
E-CCT/M-AGA	700	1	0	1	0
E-CCT/M-AGT	280	1	0	-	-
	150	1	0	1	0
E-CCC/M-AAA	1500	1	0	1	0

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2.

**Tabela 3.** Continuação

Combinções de primers EcoRI CNN / MseI ANN <sup>***</sup>	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuaí <sup>***</sup>	HT	bulk'S	bulk'R
E-CCC/M-AAG	300	1	0	1	0
E-CCC/M-ATG	230 pb	1	0	-	-
E-CCC/M-ACA	190	1	0	1	0
E-CCC/M-ACT	700	1	0	1	0
	300	0	1	-	-
E-CCC/M-ACC	400	1	0	-	-
	398	1	0	-	-
E-CCC/M-AGA	1500	0	1	-	-
	150	1	0	-	-
	148	1	0	-	-
E-CCC/M-AGC	700	1	0	-	-
	698	0	1	-	-
	150	1	0	1	0
E-CCG/M-ATC	150	1	0	-	-
	148	1	0	-	-
E-CCG/M-ATG	700	1	0	-	-
	698	1	0	-	-
E-CCG/M-ACC	170	1	0	-	-
	150	1	0	-	-
E-CCG/M-AGC	1800	0	1	-	-
	1750	0	1	0	1
E-CGA/M-AAA	400	0	1	-	-
	200	0	1	0	1
E-CGA/M-AAT	330	1	0	1	0
	310	1	0	1	0
E-CGA/M-AAC	600	0	1	-	-
E-CGA/M-AAG	280	1	0	1	0
E-CGA/M-ACA	300	0	1	-	-
	299	0	1	-	-
	200	0	1	-	-
E-CGA/M-ACC	150	1	0	-	-
	149	1	0	-	-
	50	0	1	0	1
E-CGA/M-ACG	600	1	0	1	0
E-CGA/M-AGC	430	-	-	1	0
	390	1	0	-	-
	388	1	0	-	-
E-CGA/M-AGG	600	1	0	-	-
E-CGT/M-AAA	230	1	0	-	-
	160	1	0	-	-
E-CGT/M-ATT	1500	0	1	-	-
	400	0	1	-	-
	330	0	1	-	-
	328	0	1	-	-
	280	0	1	-	-
	250	0	1	-	-
	240	0	1	-	-
	180	0	1	-	-
	178	0	1	-	-
	150	1	0	-	-
E-CGT/M-ATC	400	1	0	1	0
	300	-	-	1	0
	280	0	1	-	-
	180	1	0	-	-
	178	0	1	0	1
	170	1	0	-	-
E-CGT/M-ATG	300	1	0	-	-
E-CGT/M-ACT	300	0	1	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2.

**Tabela 3** Continuação

Combinções de <i>primers</i> EcoRI CNN / MseI ANN***	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CGT/M-ACC	140	0	1	-	-
E-CGT/M-ACG	500	0	1	-	-
	300	0	1	-	-
	290	0	1	-	-
	205	-	-	0	1
	200	0	1	-	-
	170	0	1	0	1
	150	0	1	-	-
E-CGT/M-AGT	200	1	0	-	-
	170	1	0	-	-
E-CGT/M-AGG	150	-	-	0	1
E-CGC/M-AAT	230	1	0	1	0
E-CGC/M-AAC	120	1	0	-	-
E-CGC/M-AAG	190	1	0	1	0
	180	1	0	-	-
E-CGC/M-ATA	310	0	1	0	1
	300	1	0	-	-
	280	0	1	-	-
	180	1	0	-	-
E-CGC/M-ATC	300	1	0	1	0
	280	1	0	-	-
E-CGC/M-ACG	400	1	0	1	0
E-CGC/M-AGA	300	1	0	-	-
E-CGC/M-AGT	310	0	1	-	-
E-CGC/M-AGC	600	1	0	-	-
E-CGC/M-AGG	600	1	0	-	-
E-CGG/M-AAA	300	1	0	1	0
E-CGG/M-AAT	150	1	0	-	-
E-CGG/M-ATA	400	1	0	-	-
	150	1	0	1	0
E-CGG/M-ATC	500	0	1	0	1
E-CGG/M-ATG	500	0	1	-	-
	400	1	0	-	-
	350	-	-	1	0
E-CGG/M-ACC	500	0	1	0	1
	400	0	1	0	1
E-CGG/M-ACG	600	0	1	-	-
	300	0	1	-	-
	250	1	0	-	-
E-CGG/M-AGA	400	0	1	-	-
	350	1	0	1	0
E-CGG/M-AGC	250	0	1	-	-
	180	1	0	1	0

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2.

**Tabela 4.** Resultados da análise utilizando genitores e *bulks* pela combinação de *primers* AFLP (EcoRI GNN/MseI ANN), seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados e polimorfismos identificados.

Combinações de <i>primers</i> EcoRI GNN / MseI ANN***	Tamanho de fragmentos amplificados (pb)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuaí**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-GTG/M-ACG	360bp	0	1	-	1
E-GAG/M-AAG	100bp	1	0	1	0
E-GGT/M-ATT	1500bp	1	0	1	0
E-GTC/M-ACT	180bp	0	1	0	1
E-GCC/M-ATG	400bp	0	1	-	-
	230bp	0	1	-	-
	210bp	0	1	-	-
	208bp	1	0	-	-
E-GCC/M-ACT	210bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
	270bp	1	0	-	-
E-GCC/M-ACC	500bp	1	0	-	-
E-GCC/M-ACG	500bp	0	1	-	-
	498bp	1	0	-	-
	450bp	0	1	-	-
	430bp	1	0	-	-
E-GCC/M-AGA	400bp	0	1	-	-
	330bp	1	0	-	-
	300bp	0	1	-	-
	250bp	0	1	-	-
	210bp	0	1	-	-
E-GCC/M-AGT	500bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
E-GCC/M-AGC	450bp	1	0	-	-
	420bp	0	1	-	-
	205bp	0	1	-	-
E-GAA/M-ATA	480bp	0	1	-	-
	170bp	0	1	0	1
E-GAA/M-ATT	250bp	0	1	-	-
E-GAA/M-ATC	60bp	1	0	-	-
E-GAA/M-ATG	195bp	1	0	-	-
E-GAA/M-ACA	610bp	0	1	-	-
	230bp	0	1	-	-
E-GAA/M-ACT	290bp	1	0	-	-
E-GAA/M-ACC	195bp	1	0	-	-
E-GAA/M-ACG	580bp	1	0	-	-
	490bp	0	1	-	-
	360bp	0	1	-	-
	340bp	1	0	-	-
	240bp	0	1	-	-
E-GAA/M-AGA	480bp	1	0	-	-
	400bp	1	0	-	-
E-GAA/M-AGT	400bp	1	0	-	-
	160bp	0	1	-	-
E-GAA/M-AGC	330bp	1	0	-	-
	320bp	1	0	-	-
	310bp	1	0	-	-
	290bp	1	0	-	-
E-GAA/M-AGG	460bp	0	1	-	-
	140	0	1	-	-
E-GCT/M-AAA	700bp	0	1	-	-
	405bp	0	1	-	-
	390bp	1	0	-	-
	270bp	1	0	-	-
	170bp	1	0	-	-
E-GCT/M-AAC	410bp	0	1	-	-
	340bp	0	1	-	-
	330bp	1	0	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2.

**Tabela 4.** Continuação

Combinções de <i>primers</i> EcoRI GNN / MseI ANN <sup>***</sup>	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-GCT/M-ATG	470bp	0	1	-	-
	450bp	0	1	-	-
	420bp	1	0	-	-
	410bp	0	1	-	-
	380bp	0	1	-	-
	250bp	0	1	-	-
E-GCT/M-ACA	230bp	0	1	-	-
E-GCT/M-ACT	390bp	0	1	-	-
	300bp	0	1	-	-
E-GCT/M-ACC	210bp	0	1	-	-
	205bp	0	1	-	-
	190bp	0	1	-	-
	150bp	0	1	-	-
	145bp	0	1	-	-
	130bp	1	0	-	-
E-GCT/M-ACG	480bp	1	0	-	-
	295bp	1	0	1	0
	280bp	1	0	-	-
	260bp	1	0	-	-
	250bp	1	0	-	-
	130bp	1	0	-	-
E-GCT/M-AGA	180bp	1	0	-	-
	170bp	0	1	-	-
E-GCT/M-AGC	250bp	1	0	-	-
	240bp	0	1	-	-
	235bp	0	1	-	-
	220bp	0	1	-	-
E-GCT/M-AGG	500bp	1	0	-	-
	140bp	1	0	-	-
E-GGC/M-ATC	230bp	0	1	-	-
E-GGC/M-ATG	400bp	0	1	-	-
E-GGC/M-ACA	290bp	0	1	-	-
E-GGC/M-ACC	210bp	1	0	-	-
E-GGC/M-ACG	390bp	1	0	-	-
	320bp	1	0	-	-
	250bp	1	0	-	-
	180bp	1	0	-	-
	170bp	1	0	-	-
	160bp	1	0	-	-
E-GGC/M-AGA	410bp	1	0	-	-
	400bp	0	1	-	-
	398bp	1	0	-	-
E-GGC/M-AGT	400bp	1	0	-	-
	390bp	1	0	-	-
	230bp	1	0	-	-
E-GGC/M-AGG	400bp	1	0	-	-
	270bp	0	1	-	-
	260bp	0	1	0	1
E-GGG/M-AAC	230bp	0	1	-	-
E-GGG/M-AAG	460bp	0	1	-	-
	380bp	1	0	-	-
	250bp	0	1	-	-
E-GGG/M-ATA	410bp	0	1	-	-
	170bp	0	1	-	-
E-GGG/M-ATT	250bp	0	1	-	-
	170bp	0	1	-	-
E-GGG/M-ATC	410bp	1	0	-	-
	195bp	1	0	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2.



**Tabela 4. Continuação**

Combinções de <i>primers</i> EcoRI GNN / MseI ANN <sup>***</sup>	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-GGG/M-ACC	300bp	0	1	-	-
	205bp	0	1	-	-
	180bp	1	0	-	-
E-GGG/M-AGT	280bp	1	0	-	-
E-GGG/M-AGC	150bp	1	0	-	-
E-GGG/M-AGG	300bp	1	0	-	-
E-GAC/M-AAC	130bp	0	1	-	-
	125bp	0	1	-	-
E-GAC/M-ATA	400bp	0	1	-	-
	160bp	0	1	-	-
E-GAC/M-ATT	210bp	0	1	-	-
E-GAC/M-ATC	500bp	1	0	1	0
	495bp	0	1	-	-
	485bp	0	1	-	-
	240bp	1	0	-	-
	210bp	1	0	-	-
	100bp	0	1	-	-
E-GAC/M-ATG	490bp	0	1	-	-
E-GAC/M-ACA	210bp	0	1	-	-
E-GAC/M-ACT	490bp	1	0	-	-
E-GCG/M-ATC	410bp	0	1	-	-
	350bp	1	0	-	-
	320bp	1	0	-	-
	270bp	1	0	-	-
	195bp	0	1	-	-
E-GCG/M-ATG	410bp	0	1	-	-
	290bp	0	1	-	-
	285bp	1	0	-	-
	280bp	0	1	-	-
	240bp	1	0	-	-
	190bp	0	1	-	-
	160bp	1	0	-	-
E-GCG/M-ACT	350bp	0	1	-	-
	310bp	1	0	-	-
	300bp	0	1	-	-
	296bp	1	0	-	-
	285bp	0	1	-	-
	280bp	1	0	-	-
	256bp	0	1	-	-
	220bp	0	1	-	-
	170bp	1	0	-	-
E-GCG/M-ACC	280bp	1	0	-	-
	270bp	0	1	-	-
	220bp	0	1	-	-
E-GCG/M-ACG	320bp	0	1	-	-
	310bp	1	0	-	-
	305bp	0	1	-	-
	290bp	1	0	-	-
	270bp	0	1	-	-
	240bp	1	0	-	-
	220bp	1	0	-	-
	200bp	1	0	-	-
	190bp	0	1	-	-
E-GCG/M-AGA	300bp	0	1	-	-
E-GCG/M-AGT	180bp	1	0	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2.

**Tabela 4. Continuação**

Combinações de <i>primers</i> EcoRI GNN / MseI ANN <sup>***</sup>	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-GCG/M-AGC	400bp	0	1	-	-
	310bp	0	1	-	-
	290bp	0	1	-	-
	285bp	1	0	-	-
	280bp	0	1	-	-
	275bp	0	1	-	-
	270bp	1	0	1	0
	230bp	0	1	-	-
	225bp	1	0	-	-
	180bp	0	1	-	-
	E-GTT/M-AAT	240bp	1	0	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2.

**Tabela 5.** Resultados da análise utilizando genitores e *bulks* pela combinação de *primers* AFLP (EcoRI CNN/MseI TNN), seus respectivos tamanhos de fragmentos amplificados e polimorfismos identificados.

Combinações de <i>primers</i> EcoRI CNN/ MseI TNN***	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CCA/M-TAC	150bp	0	1	-	-
E-CCA/M-TTA	200bp	0	1	-	-
	180bp	0	1	-	-
E-CCA/M-TTC	200bp	0	1	0	1
	190bp	0	1	0	1
E-CCA/M-TTG	400bp	1	0	-	-
E-CCA/M-TCG	200bp	0	1	-	-
E-CCA/M-TGC	600bp	0	1	0	1
E-CCA/M-TGG	500bp	0	1	-	-
E-CAA/M-TAA	395bp	0	1	-	-
	210bp	0	1	-	-
E-CAA/M-TAC	400bp	0	1	0	1
E-CAA/M-TCG	210bp	0	1	0	1
E-CAA/M-TGA	700bp	0	1	-	-
	600bp	0	1	-	-
	180bp	0	1	-	-
E-CAA/M-TGC	300bp	0	1	-	-
E-CAA/M-TGG	480bp	0	1	-	-
	420bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
	300bp	0	1	-	-
E-CAT/M-TAA	310bp	0	1	-	-
E-CAT/M-TAT	220bp	0	1	-	-
	210bp	0	1	-	-
E-CAT/M-TCA	500bp	1	0	-	-
E-CAT/M-TCT	700bp	0	1	-	-
	500bp	0	1	-	-
E-CAT/M-TCG	420bp	0	1	0	1
E-CAC/M-TTA	220bp	1	0	1	0
	180bp	1	0	1	0
E-CAC/M-TTT	210bp	1	0	-	-
E-CAC/M-TTC	350bp	0	1	0	1
E-CAC/M-TCG	700bp	0	1	0	1
	400bp	1	0	1	0
E-CAC/M-TGT	800bp	0	1	-	-
E-CAC/M-TGG	800bp	0	1	-	-
E-CAG/M-TAA	420bp	1	0	-	-
E-CAG/M-TAT	650bp	0	1	-	-
E-CAG/M-TTT	800bp	0	1	-	-
	260bp	0	1	0	1
E-CAG/M-TCG	450bp	0	1	0	1
	445bp	0	1	-	-
	430bp	0	1	-	-
E-CAG/M-TGT	400bp	0	1	-	-
	360bp	1	0	-	-
E-CAG/M-TGC	600bp	0	1	-	-
	500bp	0	1	-	-
	490bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
	290bp	0	1	-	-
	190bp	0	1	-	-
E-CAG/M-TGG	530bp	0	1	-	-
	450bp	1	0	-	-
E-CTA/M-TGT	500bp	0	1	0	1
E-CTA/M-TCG	600bp	0	1	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2. *Bulks* compostos por cinco indivíduos cada, contrastantes para a característica em estudo.

**Tabela 5. Continuação**

Combinções de <i>primers</i> EcoRI CNN/ MseI TNN***	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CTA/M-TGC	700bp	0	1	-	-
	300bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
E-CTA/M-TGG	300bp	0	1	-	-
E-CTT/M-TAA	500bp	0	1	-	-
E-CTT/M-TAT	500bp	0	1	-	-
E-CTT/M-TAC	550bp	0	1	-	-
	500bp	0	1	-	-
	300bp	1	0	-	-
	290bp	0	1	-	-
E-CTT/M-TAG	350bp	0	1	-	-
E-CTT/M-TTC	550bp	0	1	-	-
	510bp	1	0	-	-
	305bp	1	0	-	-
E-CTT/M-TCA	590bp	1	0	-	-
E-CTT/M-TCT	900bp	1	0	-	-
E-CTT/M-TCC	800bp	0	1	-	-
	700bp	1	0	-	-
	480bp	1	0	-	-
	460bp	0	1	-	-
	430bp	0	1	-	-
E-CTT/M-TCG	410bp	1	0	-	-
	400bp	0	1	-	-
	310bp	1	0	-	-
	300bp	0	1	-	-
	250bp	0	1	-	-
	245bp	0	1	-	-
	230bp	1	0	-	-
	170bp	0	1	-	-
E-CTT/M-TGA	800bp	0	1	-	-
	750bp	1	0	-	-
	430bp	0	1	-	-
E-CTT/M-TGT	430bp	1	0	-	-
E-CTT/M-TGC	700bp	0	1	-	-
	530bp	0	1	-	-
	500bp	0	1	-	-
	480bp	0	1	-	-
	410bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
	380bp	0	1	-	-
E-CTT/M-TGG	240bp	0	1	-	-
	170bp	0	1	-	-
	160bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TAA	700bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TAC	190bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TAG	380pb	0	1	-	-
	310bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
	240bp	1	0	-	-
	205bp	1	0	-	-
	200bp	1	0	-	-
E-CTC/M-TTA	480bp	0	1	-	-
	380bp	0	1	-	-
	385bp	1	0	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2. *Bulks* compostos por cinco indivíduos cada, contrastantes para a característica em estudo.

**Tabela 5.** Continuação

Combinções de <i>primers</i> EcoRI CNN/ MseI TNN***	Tamanho de fragmentos Amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CTC/M-TTT	405bp	0	1	0	1
E-CTC/M-TTC	355bp	0	1	-	-
	350bp	0	1	-	-
	170bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TTG	600bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TCA	230bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TCT	305bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
	220bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TCC	150bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TCG	350bp	1	0	-	-
	345bp	1	0	-	-
	340bp	0	1	-	-
	335bp	1	0	-	-
	315bp	0	1	-	-
	300bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
	250bp	1	0	-	-
	210bp	0	1	-	-
	170bp	1	0	-	-
E-CTC/M-TGA	330bp	0	1	-	-
	310bp	0	1	-	-
	240bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TGT	510bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
E-CTC/M-TGC	700bp	0	1	-	-
	650bp	0	1	-	-
	600bp	0	1	-	-
	350bp	0	1	-	-
	250bp	1	0	-	-
	220bp	1	0	-	-
	200bp	1	0	-	-
E-CTG/M-TAA	380bp	1	0	1	0
	310bp	0	1	-	-
	300bp	0	1	-	-
	250bp	0	1	-	-
	200bp	0	1	-	-
E-CTG/M-TAT	370bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
E-CTG/M-TAC	800bp	0	1	-	-
	700bp	0	1	-	-
	600bp	0	1	-	-
	390bp	0	1	-	-
	290bp	1	0	-	-
	210bp	1	0	-	-
	200bp	1	0	-	-
180bp	0	1	-	-	
E-CTG/M-TAG	210bp	0	1	-	-
	205bp	1	0	-	-
	200bp	1	0	-	-
E-CTG/M-TTA	270bp	0	1	-	-
E-CTG/M-TTC	190bp	0	1	0	1
E-CTG/M-TTG	23bp	1	0	-	-
E-CTG/M-TCA	700bp	0	1	-	-
E-CTG/M-TCC	550bp	0	1	-	-
	170bp	0	1	-	-
	160bp	1	0	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2. *Bulks* compostos por cinco indivíduos cada, contrastantes para a característica em estudo.

**Tabela 5.** Continuação

Combinções de <i>primers</i> EcoRI CNN/ MseI TNN***	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CTG/M-TCG	500bp	0	1	-	-
	495bp	0	1	-	-
	450bp	0	1	-	-
	305bp	0	1	-	-
	300bp	1	0	-	-
	290bp	0	1	-	-
	280bp	1	0	-	-
	190bp	1	0	-	-
	150bp	1	0	-	-
E-CTG/M-TGA	900bp	0	1	-	-
	210bp	0	1	-	-
E-CTG/M-TGC	480bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
	350bp	0	1	-	-
	270bp	0	1	-	-
E-CTG/M-TGG	500bp	1	0	-	-
	400bp	1	0	-	-
E-CCT/M-TTC	750bp	0	1	-	-
	250bp	0	1	-	-
	230bp	0	1	0	1
E-CCT/M-TTG	240bp	0	1	-	-
E-CCT/M-TCC	170bp	0	1	-	-
	160bp	0	1	-	-
E-CCT/M-TGG	300bp	0	1	-	-
E-CCC/M-TAT	260bp	0	1	-	-
E-CCC/M-TAC	500bp	1	0	-	-
	320bp	1	0	-	-
	120bp	1	0	-	-
E-CCC/M-TAG	480bp	0	1	-	-
	400bp	1	0	-	-
	305bp	0	1	-	-
	240bp	1	0	-	-
	180bp	1	0	-	-
	150bp	1	0	-	-
E-CCC/M-TTA	180p	0	1	-	-
E-CCC/M-TTC	700bp	0	1	-	-
	450bp	0	1	-	-
E-CCC/M-TTG	510bp	0	1	-	-
E-CCC/M-TCT	300bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
E-CCC/M-TCC	350bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
	200bp	0	1	-	-
E-CCC/M-TCG	700bp	0	1	-	-
	505bp	0	1	-	-
	500bp	1	0	-	-
	495bp	0	1	-	-
	490bp	1	0	-	-
	485bp	0	1	-	-
	250bp	1	0	-	-
	190bp	0	1	-	-
	180bp	1	0	-	-
E-CCC/M-TGT	340bp	0	1	-	-
E-CCC/M-TGC	450bp	0	1	-	-
	210bp	0	1	-	-
	170bp	0	1	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2. *Bulks* compostos por cinco indivíduos cada, contrastantes para a característica em estudo.

**Tabela 5.** Continuação

Combinções de <i>primers</i> EcoRI CNN/ MseI TNN***	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CCG/M-TAA	270bp	0	1	-	-
	200bp	0	1	-	-
	195bp	0	1	-	-
E-CCG/M-TAC	360bp	1	0	-	-
	300bp	1	0	-	-
	220bp	1	0	-	-
E-CCG/M-TAG	650bp	0	1	-	-
	440bp	0	1	-	-
	270bp	1	0	-	-
	250bp	1	0	-	-
	230bp	0	1	-	-
	220bp	0	1	-	-
	215bp	1	0	-	-
	200bp	0	1	-	-
E-CCG/M-TTT	380bp	1	0	-	-
E-CCG/M-TTG	250bp	0	1	-	-
	245bp	1	0	-	-
E-CCG/M-TCA	500bp	0	1	-	-
	270bp	0	1	-	-
	160bp	0	1	-	-
E-CGT/M-TAC	380bp	0	1	-	-
	300bp	0	1	-	-
	270bp	0	1	-	-
	220bp	1	0	-	-
	200bp	1	0	-	-
	180bp	1	0	-	-
	175bp	1	0	-	-
	140bp	0	1	-	-
	120bp	0	1	-	-
	108bp	1	0	-	-
	105bp	1	0	-	-
E-CGT/M-TAG	600bp	0	1	-	-
	590bp	0	1	-	-
	510bp	0	1	-	-
	450bp	0	1	-	-
	310bp	0	1	-	-
	250bp	0	1	-	-
	180bp	0	1	-	-
	130bp	0	1	-	-
E-CGT/M-TTA	1000bp	0	1	-	-
	900bp	1	0	-	-
	890bp	1	0	-	-
	600bp	0	1	-	-
	500bp	1	0	-	-
	290bp	1	0	-	-
	250bp	1	0	-	-
E-CGT/M-TTT	700bp	1	0	-	-
E-CGT/M-TTC	900bp	1	0	-	-
	805bp	1	0	-	-
	800bp	0	1	-	-
	750bp	0	1	-	-
	700bp	0	1	-	-
	605bp	1	0	-	-
	600bp	0	1	-	-
	490bp	0	1	-	-
	460bp	1	0	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2. *Bulks* compostos por cinco indivíduos cada, contrastantes para a característica em estudo.

**Tabela 5.** Continuação

Combinções de <i>primers</i> EcoRI CNN/ MseI TNN***	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CGT/M-TTG	250bp	1	0	-	-
E-CGT/M-TCA	800bp	0	1	-	-
	795bp	0	1	-	-
	700bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
	250bp	0	1	-	-
	210bp	0	1	-	-
E-CGT/M-TCT	800bp	0	1	-	-
	750bp	1	0	-	-
	700bp	1	0	-	-
	605bp	1	0	-	-
	600bp	0	1	-	-
	455bp	1	0	-	-
	450bp	0	1	-	-
	415bp	0	1	-	-
	400bp	1	0	-	-
	280bp	0	1	-	-
	185bp	1	0	-	-
	180bp	0	1	-	-
	170bp	1	0	-	-
115bp	0	1	-	-	
E-CGT/M-TCC	1000bp	0	1	-	-
	500bp	0	1	-	-
	450bp	1	0	-	-
	440bp	0	1	-	-
	400bp	1	0	-	-
	280bp	0	1	-	-
	170bp	0	1	-	-
115bp	0	1	-	-	
E-CGT/M-TCG	350bp	0	1	-	-
	180bp	1	0	-	-
	170bp	0	1	-	-
	100bp	0	1	-	-
E-CCG/M-TCT	490bp	1	0	-	-
	480bp	0	1	0	1
	400bp	0	1	-	-
	290bp	1	0	-	-
	280bp	0	1	-	-
	260bp	0	1	-	-
	210bp	0	1	-	-
	190bp	1	0	-	-
	150bp	0	1	-	-
130bp	0	1	-	-	
E-CCG/M-TCG	700bp	0	1	-	-
	510bp	0	1	-	-
	500bp	0	1	-	-
	395bp	1	0	-	-
	350bp	0	1	-	-
	320bp	0	1	-	-
	290bp	1	0	-	-
	280bp	0	1	-	-
	260bp	0	1	-	-
	140bp	1	0	-	-
E-CCG/M-TGA	500bp	1	0	-	-
E-CCG/M-TGT	310bp	0	1	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2. *Bulks* compostos por cinco indivíduos cada, contrastantes para a característica em estudo.



**Tabela 5. Continuação**

Combinções de <i>primers</i> EcoRI CNN/ MseI TNN***	Tamanho de fragmentos Amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CCG/M-TGC	380bp	0	1	-	-
	350bp	0	1	-	-
E-CCG/M-TGG	310bp	0	1	-	-
	300bp	0	1	-	-
	180bp	0	1	-	-
E-CGA/M-TAA	405bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
	395bp	1	0	-	-
	220bp	0	1	-	-
	180bp	0	1	-	-
E-CGA/M-TAT	280bp	1	0	-	-
	200bp	0	1	-	-
E-CGA/M-TAC	470bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
	250bp	0	1	-	-
E-CGA/M-TAG	330bp	1	0	-	-
	240bp	1	0	-	-
	160bp	0	1	-	-
E-CGA/M-TTC	470bp	0	1	-	-
	405bp	1	0	-	-
	365bp	1	0	-	-
	360bp	0	1	-	-
	340bp	1	0	-	-
	180bp	1	0	-	-
E-CGA/M-TCA	250bp	0	1	-	-
	180bp	0	1	-	-
E-CGA/M-TCC	380bp	1	0	-	-
	285bp	0	1	-	-
	280bp	0	1	-	-
	230bp	1	0	-	-
	200bp	0	1	-	-
	180bp	0	1	-	-
	150bp	1	0	-	-
E-CGA/M-TCG	480bp	0	1	-	-
	390bp	0	1	-	-
	380bp	1	0	-	-
	340bp	1	0	-	-
E-CGA/M-TGT	470bp	0	1	-	-
	380bp	0	1	-	-
	350bp	1	0	-	-
	220bp	0	1	-	-
	195bp	0	1	-	-
E-CGA/M-TGC	300bp	1	0	-	-
	185bp	0	1	-	-
	180bp	0	1	-	-
E-CGT/M-TGT	390bp	0	1	-	-
	300bp	0	1	0	1
E-CGT/M-TGC	600bp	1	0	-	-
	500bp	0	1	-	-
	300bp	0	1	-	-
	290bp	1	0	-	-
	260bp	1	0	-	-
	250bp	1	0	-	-
	220bp	1	0	-	-
	210bp	1	0	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2. *Bulks* compostos por cinco indivíduos cada, contrastantes para a característica em estudo.

**Tabela 5.** Continuação

Combinções de <i>primers</i> EcoRI CNN/ MseI TNN***	Tamanho de fragmentos amplificados (bp)	Polimorfismos* identificados entre:			
		Catuai**	HT	<i>bulk'S</i>	<i>bulk'R</i>
E-CGT/M-TGG	700bp	0	1	-	-
	560bp	0	1	-	-
	405bp	1	0	-	-
	400bp	0	1	-	-
	300bp	1	0	-	-
	180bp	0	1	-	-
E-CGC/M-TAC	500bp	0	1	-	-
E-CGC/M-TTA	250bp	1	0	-	-
E-CGC/M-TTT	550bp	1	0	-	-
	450bp	0	1	-	-
	400bp	0	1	-	-
	240bp	0	1	-	-
	190bp	0	1	-	-
E-CGC/M-TTG	440bp	0	1	-	-
	395bp	1	0	-	-
	380bp	1	0	-	-
	170bp	0	1	-	-
E-CGC/M-TCT	380bp	1	0	-	-
	360bp	0	1	-	-
	100bp	0	1	-	-
E-CGC/M-TCC	310bp	0	1	-	-
	305bp	0	1	-	-
	140bp	0	1	-	-
	120bp	0	1	-	-
E-CGC/M-TCG	600bp	0	1	-	-
	540bp	0	1	-	-
	205bp	0	1	-	-
	190bp	0	1	-	-
	160bp	1	0	-	-
	145bp	1	0	-	-
	135bp	1	0	-	-
	115bp	1	0	-	-
	105bp	1	0	-	-
E-CGG/M-TAT	400bp	0	1	-	-
	150bp	1	0	-	-
E-CGG/M-TAC	130bp	1	0	-	-
E-CGG/M-TTT	140bp	1	0	-	-
E-CGG/M-TTC	550bp	0	1	-	-
	520bp	0	1	-	-
	500bp	1	0	-	-
	250bp	1	0	-	-
	195bp	1	0	-	-
	120bp	0	1	0	1
	115bp	1	0	-	-
E-CGG/M-TCA	550bp	0	1	-	-
	450bp	0	1	-	-
E-CGG/M-TCT	480bp	0	1	-	-
	250bp	1	0	-	-
	210bp	0	1	-	-
E-CGG/M-TCC	550bp	1	0	-	-
	400bp	1	0	-	-
E-CGG/M-TGA	450bp	1	0	-	-
E-CGG/M-TGC	500bp	0	1	-	-
	380bp	1	0	-	-
E-CGG/M-TGG	390bp	0	1	-	-
	380bp	1	0	-	-

Detalhes: ver nota de rodapé na tabela 2. *Bulks* compostos por cinco indivíduos cada, contrastantes para a característica em estudo.