

ROSEMEIRE ALVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RESISTÊNCIA DO CAFEEIRO
HÍBRIDO DE TIMOR A *Hemileia vastatrix***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

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

T

S586c
2013
Silva, Rosemeire Alves da, 1984-
Caracterização molecular e resistência do cafeeiro Híbrido
de Timor à *Hemileia vastatrix* / Rosemeire Alves da Silva. –
Viçosa, MG, 2013.
ix, 54f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Laércio Zambolim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.48-54.

1. Café - Melhoramento genético.
 2. Marcadores genéticos.
 3. Microssatélites (Genética).
 4. Ferrugem-do-cafeeiro.
- I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD. 22.ed. 633.7394

ROSEMEIRE ALVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RESISTÊNCIA DO CAFEEIRO
HÍBRIDO DE TIMOR A *Hemileia vastatrix***

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

APROVADA: 30 de Julho de 2013.

Antonio Alves Pereira

Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof. Laércio Zambolim
(Orientador)

Aos meus pais, Jesus Alves e Maria Aparecida
Aos meus irmãos, Ana Paula, Paulo Roberto e Rogério
Aos meus amigos e familiares,
que sempre acreditaram em mim, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido tantas oportunidades e sempre ter me dado forças e sabedoria. Obrigado Senhor!

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio diários, sem os quais eu não chegaria até aqui, e a meus irmãos, pelo apoio mesmo distante.

À grande amiga Aline Marques e Priscila Alves, pelas palavras de incentivo nas horas de angústia e pela companhia e dos conselhos nos momentos mais difíceis.

E a amiga Charlene Neves pela paciência, ajuda e compreensão em dividir o mesmo espaço durante esse tempo. Obrigada!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), pela infraestrutura disponibilizada à realização do trabalho.

Ao meu orientador Laércio Zambolim, pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

À doutora Eveline Caixeta, pelos ensinamentos, pela paciência, amizade, confiança e pelo incentivo.

À doutora Eunize Zambolim, pelo incentivo, pelos ensinamentos e pela amizade e confiança.

Ao Professor Cosme, pelos ensinamentos e pela paciência e disposição a ajudar na realização deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos, pela amizade e pelos incentivos constantes.

A todos os funcionários do viveiro do café, em especial ao Geraldo e Mario, pelo apoio nas coletas de campo.

Aos meus amigos do Biocafé, pela agradável companhia.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

ROSEMEIRE ALVES DA SILVA, filha de Jesus Alves e Maria Aparecida da Silva Alves, nascida em Pitangueiras, São Paulo, em 18 de Outubro de 1984.

No período de 08/2003 a 05/2011 trabalhou como técnica de laboratório na Fundação Educacional de Ituverava São Paulo. Atuando na área de análise do solo, foliar, clínica fitopatológica e Sanidade de Sementes.

Em Fevereiro de 2007 ingressou no curso de Ciências Biológicas na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ituverava, graduando-se em 10 de janeiro de 2011.

Em Agosto de 2011 iniciou no Programa de Pós-graduação, em nível de Mestrado, em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 30 de Julho de 2013.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Ferrugem do Cafeeiro.....	4
2.2. Cafeeiro do grupo Híbrido de Timor.....	6
2.3. Marcadores Moleculares.....	12
2.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfisms)	13
2.5. SSR (Simple Sequence Repeats) ou Microsatélite.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Local de experimentação e material genético.....	15
3.2. Extração do DNA.....	18
3.3 Marcadores SSR.....	18
3.4 Marcadores AFLP	19
3.5 Isolados da raça II e XXXIII de <i>H. vastatrix</i>	20
3.6. Caracterização da resistência a <i>H. vastatrix</i> as raças II e XXXIII.....	20
3.7. Avaliação da resistência do cafeeiro Híbrido de Timor à ferrugem.....	21
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÃO.....	47
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	48

RESUMO

SILVA, ALVES Rosemeire M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Caracterização molecular e resistência do cafeeiro Híbrido de Timor à *Hemileia vastatrix***. Orientador: Laércio Zambolim.

O café representa um dos principais produtos de exportação do Brasil possuindo elevada importância para a economia do país. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que visam melhorar a cafeicultura brasileira. O principal problema fitossanitário que afeta a produção do café é a ferrugem, doença causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. O uso de variedades resistentes tem sido uma das principais medidas utilizadas para controle da doença. Uma das fontes de resistência mais utilizada para obtenção das variedades resistentes é o Híbrido de Timor. Dessa forma, a caracterização e o conhecimento da resistência dos acessos de Híbrido de Timor a *H. vastatrix* disponíveis é essencial para o entendimento da base genética da resistência a essa doença e para auxiliar na escolha de genótipos para serem usados nos programas de melhoramento que visam a obtenção de cultivares com resistência durável à ferrugem. Neste trabalho, o banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa, contendo 152 acessos de Híbridos de Timor e 6 genótipos do programa de melhoramento da EPAMIG foram caracterizados molecularmente e analisados quanto a resistência a duas raças de *H. vastatrix* raça II e XXXIII. Na caracterização molecular foram utilizados 29 *primers* microssatélites sendo obtidas 92 bandas com média de 3,17 bandas por *primer*. Das 92 bandas totais obtidas 75 foram polimórficas, foram utilizadas 5 combinações de *primers* AFLP onde foram obtidos 126 bandas polimórficas com média de 25,2 bandas por combinação de *primer*. Utilizando apenas os dados dos marcadores microssatélites e o agrupamento baseado nos complementos aritméticos de Jaccard e o método UPGMA foi possível separar 151 genótipos. Sete acessos não diferiram, sendo eles UFV450-06, UFV450-12, UFV428-01, UFV428-02, UFV427,15, UFV427-90 e UFV428-04. Ao acrescentar os dados dos marcadores dominantes AFLP foi possível separar estes indivíduos, não discriminando apenas os acessos UFV427-90 e UFV428-04. Foi possível determinar um padrão molecular único (*fingerprinting*) para cada indivíduo utilizando 58 marcas. Na caracterização fenotípica foram inoculadas às raças II e XXXIII nos 152 acessos Híbrido de Timor e 6 genótipos do melhoramento EPAMIG. Todos os acessos apresentaram resistência à raça II, o que mostra que os

acessos podem ter apenas um gene de resistência que não o SH₅ ou mais de um gene, sendo estes qualquer combinação dos genes SH_{5, 6, 7, 8 e 9}. Com a raça XXXIII, 14 acessos apresentaram suscetibilidade, sendo a raça XXXIII com mais de um gene de virulência que foi capaz de suplantar a resistência dos acessos UFV376-01, UFV376-02, UFV 376-08, UFV 376-09, UFV 376-14, UFV 376-37, UFV 377-51, UFV 408-10, UFV 408-18, UFV 432-30, UFV 445-70, 2 II P6, 12 III P6 e 22 IV P6, estes acessos contém os genes SH_{5, 7} ou SH_{5,7 e 9}. Conclui-se que 140 acessos de Híbridos de Timor continuam sendo uma boa fonte de resistência às raças II e XXXIII e três material do programa de melhoramento EPAMIG/UFV foram suscetível a raça XXXIII.

ABSTRACT

SILVA, ALVES Rosemeire M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Molecular characterization and resistance of Híbrido Timor coffee to *Hemileia vastratrix***. Adviser: Laércio Zambolim.

Coffee is a major export product from Brazil having high importance for the country's economy. Thus, it becomes necessary to develop technologies to improve the Brazilian coffee farming. The main disease problem affecting coffee production is the coffee rust, a disease caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastratrix*. The use of resistant varieties has been one of the main measures used to control the disease. One of the most used sources to obtain resistant varieties is the Híbrido Timor. Hence, the characterization and understanding of the resistance of available accessions of Híbrido Timor to *H. vastratrix* are essential for the comprehension of the genetic basis of the resistance to this disease and to assist in the choice of genotypes to be used in breeding programs aimed at obtaining cultivars with durable resistance to rust. In this work, the germplasm bank of the Federal University of Viçosa, containing 152 accessions of Híbrido Timor and 6 genotypes from the EPAMIG breeding program were molecularly characterized and analyzed for resistance to two races of *H. vastratrix*, namely II and XXXIII. For the molecular characterization, 29 microsatellite primers were used and 92 bands were obtained with an average of 3.17 bands per primer. Of the 92 total bands obtained, 75 were polymorphic. Five primer combinations of AFLP were utilized by which 126 polymorphic bands were obtained with an average of 25.2 bands per combination of primer. Using only the data from microsatellite markers and the grouping based on the arithmetical complements of Jaccard and the UPGMA method, it was possible to separate 151 genotypes. Seven accessions did not differ, namely UFV 450-06, UFV450-12, UFV 428-01, UFV 428-02, UFV427-15, UFV427-90 and UFV428-04. By adding the data from the dominant markers AFLP, it was possible to separate these individuals, not only discriminating the accessions 427-90 and 428-04. It was possible to determine a unique molecular pattern (fingerprinting) for each individual using 58 marks. For the phenotypic characterization, the races II and XXXIII were inoculated in the 152 accessions Híbrido Timor and 6 genotypes improving EPAMIG. All accessions were resistant to race II, which shows that the accessions may have either only one resistance gene, but not SH5, or more than one gene which may be any combination of SH_{5, 6, 7, 8 e 9}. With the race XXXIII, 14 accessions were susceptible.

The race XXXIII presents more than one virulence gene which was able to overcome the resistance of the accessions UFV376-01, UFV376-02, UFV 376-08, UFV 376-09, UFV 376-14, UFV 376-37, UFV 377-51, UFV 408-10, UFV 408-18, UFV 432-30, UFV 445-70, 2 II P6, 12 III P6 and 22 IV P6. These accessions contain the genes SH_{5,7} or SH_{5,7 e 9}. We conclude that 140 accessions of Híbrido Timor remain a good source of resistance to the races II and XXXIII and three materials from the EPAMIG/UFV program were susceptible to the race XXXIII.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Híbrido de Timor é um híbrido natural de um cruzamento interespecífico entre *C. arabica* L e *C. canephora* Pierre ex Froehner , foi encontrado em uma plantação de cultivar Typica na Ilha de Timor em 1917 (Bettencourt, 1973). Os derivados deste café têm sido utilizados como fonte de resistência para importantes doenças e pragas de cafeeiro como a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), doença dos frutos do café (CBD) causada por *Colletotrichum kahawae*, nematóides de galhas (*Meloidogyne exigua*) e bacteriose causada por *Pseudomonas syringae* pv *garçae* (Bettencourt 1973, Chaves, 1976, Gonçalves e Pereira 1998, Carvalho et al. 1989, Pereira et al. 2005). Cultivares derivadas de Híbrido de Timor foram liberadas para produção no Quênia, Brasil, Colômbia e Costa Rica (Charrier & Eskes 1997, Lashermes et al. 2000, Sera 2001, Pereira et al. 2005, Sera et al. 2008).

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., é considerada a principal doença dessa cultura, e seu controle pode ser eficientemente realizado por medidas de natureza química e genética (Zambolim et al. 1999). Apesar da eficiência dos fungicidas, o desenvolvimento de cultivares com resistência genética é economicamente a melhor alternativa para o controle da doença (Waller et al. 2007). No entanto a obtenção de cultivares resistente tem sido um constante desafio para os melhoristas, uma vez que, ao longo do tempo, as plantas podem tornar-se suscetíveis a novas raças do patógeno (Várzea & Marques, 2005). O conhecimento do nível de resistência de cafeeiros a *H. vastatrix* é importante para dar suporte aos programas de melhoramento genético. Existem dois níveis de resistência preconizados na obtenção de variedades, a resistência vertical ou específica que envolve geralmente, mecanismos cuja herança é governada por poucos genes e fáceis de manipular em programas de melhoramento e a resistência horizontal ou não específica que é poligênica,

caracterizada por apresentar um mesmo nível de proteção para todas as raças do patógeno (Van der Plank, 1963). A resistência vertical tem poucas chances de sucesso em culturas perenes e de clima tropical. É recomendado como uma estratégia para aumentar a durabilidade da resistência vertical, combinar a resistência vertical e a horizontal nas variedades melhoradas (Robinson, et al. 1976). E para conseguir estas combinações outras técnicas vêm sendo utilizadas para o melhoramento genético.

No melhoramento do cafeeiro, diferentes tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados, como RAPD, AFLP, RFLP, SSR (Lashermes et al., 2001, Combes et al., 2000, Teixeira-Cabral et al., 2004, Diniz et al., 2005, Maluf et al., 2005), os quais são aplicados para as mais diversas finalidades. Entretanto, com o grande avanço nos projetos de sequenciamento genético estão surgindo novas classes de marcadores moleculares, dentre eles destacam-se os *Expressed Sequence Tag* (EST-SSR), e *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs), os quais podem ser de grande utilidade para espécies como o cafeeiro que ainda não possuem grande quantidade de marcadores disponíveis para estudos genéticos.

O cafeeiro denominado Híbrido de Timor vem sendo estudados em diversas regiões produtoras de café do mundo (Várzea *et al.*, 2002). No Brasil esse germoplasma tem sido valioso para os programas de melhoramento, visando à resistência durável ao agente da ferrugem. Por esse motivo, foi criado em 1970/71 um Banco de Germoplasma de Café na Universidade Federal de Viçosa, localizado no Estado de Minas Gerais, inicialmente com cerca de 450 acessos, contendo grande variabilidade genética, incluindo fontes de resistência a *Hemileia vastatrix* e *Meloidogyne exigua*. Estas introduções foram provenientes do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro – CIFC, Portugal, do Centro Nacional de Investigação do Café – CENICAFE, Colômbia, do Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas –

IICA, Costa Rica e do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, Brasil e plantadas na Estação Experimental do Fundão/UFV. O Banco de Germoplasma da UFV tem sido utilizado em diversos programas de melhoramento genético de café no Brasil, possibilitando o desenvolvimento de novas cultivares. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a resistência de 152 indivíduos pertencentes aos acessos de Híbrido de Timor e 6 genótipos do melhoramento EPAMIG/UFV a duas raças de *H. vastatrix*. Estes acessos foram também caracterizados por meio de marcadores moleculares microssatélites e AFLPs, para identificar genótipos que possam ser utilizados em programas de melhoramento de café visando à obtenção de variedades com resistência duradoura à ferrugem do cafeeiro.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2013), a primeira estimativa de produção de café (arábica e conilon) para a safra de 2013, indica que o País deverá colher entre 46,98 e 50,16 milhões de sacas, neste ano a safra terá uma redução de 7,6 e 1,3% , quando comparada com a produção obtida na temporada anterior. Essa redução se deve ao ano de baixa bienalidade. Ainda de acordo com esses dados, as espécies de maior produção são *Coffea arabica* 74,71% (34,99 a 37,47 milhões de sacas) da produção do País e tem como maior produtor o Estado de Minas Gerais, com 67,93% (24,25 a 25,45 milhões de sacas) de café beneficiado. *Coffea canephora* participa da produção nacional com 25,29% de café beneficiado, e o Estado do Espírito Santos se destaca como o maior produtor dessa espécie, com 77,30% (9,24 a 7,869,81 milhões de sacas).

2.1 Ferrugem do cafeeiro

O principal problema que afeta a produção do café é a ferrugem, doença causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. O fungo ataca principalmente as folhas e raramente os frutos, podendo causar a queda precoce de folhas e a seca de ramos, que reduz a produção e vida útil da lavoura (Zambolim *et al.*, 1997). Os sintomas da doença são observados na face superior e sinais na face inferior das folhas, iniciando-se com manchas pequenas, de 1 a 3 mm de diâmetro, e coloração amarelo-pálida, que pode atingir 2 a 3 cm. Essa coloração pode evoluir para amarelo-alaranjado com aspecto pulverulento devido à produção de uredíniosporos. Os maiores índices de dano da doença são verificados nos anos de alta produção, com perdas que podem

chegar a 35-50%, dependendo das condições climáticas (Zambolim *et al.*, 1999; Van Der Vossem, 2001; Silva *et al.*, 2006).

A ferrugem do cafeeiro, inicialmente confinada na África e Ásia, 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 podem variar de um a dois bilhões de dólares anuais, devido à maioria dos cafeeiros arábicos cultivados apresentarem-se suscetíveis ao fungo causador desta doença (Van der Vossen, 2001).

A importância da ferrugem se deve ao surgimento de novas raças de *H. vastatrix*, assim como a ocorrência de raças com genes de virulência complexos que mostram um grande potencial evolutivo das populações do fungo (Várzea & Marques, 2005). Como consequência, o desenvolvimento de cultivares de cafeeiros com resistência durável à ferrugem representa um desafio aos programas de melhoramento. Raças fisiológicas ou patótipos são comuns, ou seja, variantes do patógeno com diferentes combinações de genes de virulência e, conseqüentemente, diferentes capacidades para infectar distintos genótipos de uma dada espécie hospedeira (Rodrigues Jr., 2002). Até o momento 45 raças fisiológicas de *H. vastatrix* foram identificadas no mundo (Várzea & Marques, 2005). No Brasil, desde 1971, já foram relatadas 16 destas raças sendo elas I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII e XXXVII. (Cabral *et al.*, 2009; Cardoso & Silva, 1992; Cardoso *et al.*, 1988; Chiacchio., 1973; Fazuoli *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 1975). A raça II é notadamente a de maior prevalência no país (Zambolim, 2005) e, portanto, a mais importante. O gene de virulência v5 é o único presente nesta raça (Várzea & Marques, 2005).

Apesar de existirem alternativas de controle para essa doença, a principal medida, sobretudo, pela eficiência, pela economicidade e pelo menor prejuízo ao meio ambiente, é o uso de variedades resistentes. Um problema enfrentado pelo produtor no uso dessas variedades, é que quase todas as variedades plantadas no país são suscetíveis à ferrugem. Com o objetivo de desenvolver variedades resistentes, a UFV implantou em 1970/71 um vasto germoplasma portador de genes de resistência a essa doença. Nesse banco de germoplasma destacam-se os Híbridos de Timor, que são híbridos naturais entre *C. arabica* x *C. canephora* e têm sido utilizados extensivamente em vários locais do mundo como principais fontes de resistência a pragas e doenças, principalmente à ferrugem do cafeeiro. A caracterização genética desses genótipos é de interesse para programas de melhoramento que objetivam transferir sua resistência para variedades comerciais (Caixeta, et al. 2003).

2.2 Cafeeiro do grupo Híbrido de Timor.

O Híbrido de Timor foi encontrado pela primeira vez em 1912 na Ilha de Timor, em plantações de *C. arabica* cv. *typica*, O HT é resultante do cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora* (Bettencourt, 1973).

Segundo informações coletadas na Ilha de Timor, o germoplasma Híbrido de Timor formou-se a partir de sementes de uma única planta existente em uma plantação de café arábica, provavelmente, da variedade típica estabelecida em 1917/18, naquela ilha, a uma altitude aproximada de 800metros (Bettencourt, 1973). O mesmo autor descreveu que o referido cafeeiro apresentava porte muito alto, atingindo cerca de nove metros de altura, com elevado vigor vegetativo, no entanto, já apresentando sinais de decrepitude, em razão da idade avançada. Tem fenótipo parecido com cafeeiros da

espécie *Coffea arabica*. Segundo informações, a referida planta nunca apresentou qualquer sintoma de ataque da ferrugem ou de outra doença grave. Gonçalves et al. (1978) também relataram características semelhantes as descritas por Bettencourt e acrescenta que os cafeeiros do germoplasma Híbrido de Timor apresentam reduzida frutificação e produz, quase exclusivamente, grãos do tipo moca ou “caracoli”. Relatam ainda que nas várias observações realizadas de 1962 a 1975, nunca se notaram quaisquer sintomas de ataque de *Hemileia vastatrix*. A hipótese mais provável é que a mencionada planta tenha se originado de uma hibridação entre *C. arabica* e *Coffea canephora*, em que, provavelmente, um gameta não reduzido de um cafeeiro da espécie *C. canephora* tenha combinado com outro gameta normal de um cafeeiro da espécie *C. arabica* (Bettencourt, 1973). Esse germoplasma, com fenótipo de arábica, após um número não definido de gerações, é constituído de cafeeiros autoférteis e tetraplóides, com $2n=44$ cromossomos. Algumas seleções do Híbrido de Timor passaram a ser cultivadas comercialmente em sua localidade de origem, a partir da década de 1940, em substituição as variedades locais de *C. arabica*, na ocasião, seriamente afetadas pela ferrugem (Rodrigues et al., 1975).

No ano de 1970 foi constatada a presença do ataque da ferrugem do cafeeiro em todas as regiões cafeeiras do Brasil. Neste ano a Universidade Federal de Viçosa (UFV), introduziu germoplasma constituídos por materiais portadores de alelos que conferem a resistência ao agente causador da ferrugem do cafeeiro. Este material, oriundo de seleções realizadas pelo Centro de Investigação da Ferrugem do Cafeeiro (CIFC) em Portugal, Instituto Interamericano de Ciências Agrárias (IICA), na Costa Rica e pelo Centro Nacional de Investigação do Café (CENICAFE), na Colômbia, foi inicialmente plantado em Viçosa-MG, onde foram realizadas as primeiras avaliações e seleção. Esse Banco de Germoplasma que inclui vários acessos de Híbrido de Timor está sendo

mantido pela UFV em trabalho desenvolvido conjuntamente com a Empresa de Pesquisas Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG (Miranda et al., 2005).

A propagação vegetativa da planta original do Híbrido de Timor, supostamente o híbrido F₁, da planta encontrada na Ilha de Timor em 1927, foi introduzida no Centro de Investigação das Ferrugens do cafeeiro, com registro CIFIC 4106. Esse clone foi introduzido no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em 1976, com o número de registro UFV 516. Nas condições edafoclimáticas de Viçosa, esse clone floresce intensamente, mas produz pouquíssimo frutos, todos contendo apenas sementes do tipo moca, indicando haver sérios problemas de auto-incompatibilidade na meiose, por ocasião da formação dos gametas, nesse clone UFV 516 (CIFIC 4106).

Sakiyama et al. (2008), estudando a variabilidade genética do germoplasma Híbrido de Timor, concluíram que o clone CIFIC 4106 mostrou a predominância do genoma de *C. arabica* em sua constituição genética. Os autores inferiram que, provavelmente, houve pelo menos uma geração de retrocruzamento natural com *C. arabica*, não sendo o clone CIFIC 4106 o híbrido F₁ original do germoplasma Híbrido de Timor. Os acessos do Híbrido de Timor possuem níveis variáveis de introgressão do genoma de *C. canephora*, notadamente menor do que era anteriormente presumido, porém encerrando, ainda, variabilidade genética de grande importância para o melhoramento genético de *C. arabica*.

Levantamento realizados nos livros de registro de introduções de germoplasma de *Coffea* sp. no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro – CIFIC, em Oeiras, Portugal, detectou-se que foram introduzidas naquele Centro de Pesquisa 17 amostras de sementes da Ilha de Timor e uma da Tanzânia. As 17 amostras foram introduzidas em sete diferentes datas, no período de 18 de outubro de 1957 a 21 de novembro de

1966. Há citações reportando que o material genético foi coletado em cafeeiros estabelecidos em diferentes ambientes. Além desses acessos, houve, também, a introdução do clone CIFIC 4106 originado de propagação vegetativa do cafeeiro considerado como o Híbrido Timor original.

A grande parte dos acessos do Híbrido de Timor existente no CIFIC também foi, posteriormente, introduzida no Brasil, pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa e pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC e passaram a constituir o germoplasma básico para vários programas de melhoramento genético do cafeeiro. Várias combinações genéticas portadoras de fatores de resistência as principais doenças do cafeeiro foram sintetizadas. A partir dessas combinações, novas cultivares de café estão sendo desenvolvidas e disponibilizadas para cultivo comercial nas diversas regiões brasileiras. Esses novos materiais genéticos são capazes de promover o controle genético dos principais agentes causadores das doenças da cultura do cafeeiro no Brasil. Esse mesmo germoplasma também tem sido a base de outros programas de melhoramento do cafeeiro em várias regiões cafeeiras do mundo. Esse fato demonstra o grande valor do germoplasma Híbrido de Timor como fonte de resistência aos principais patógenos que atacam o cafeeiro. Além disso, tem permitido a obtenção de cultivares de café com elevada qualidade da bebida (Pereira et al., 2008; Petek et al., 2008; Várzea et al., 2008; Van der Vossen, 2008).

Além de clones do acesso CIFIC 4106 do Híbrido de Timor, foram ainda introduzidas, na UFV, propagações vegetativas dos clones diferenciadores de raças de *H. vastatrix* designados CIFIC 832/1, CIFIC 832/2 e CIFIC 1343/269, registrados no Banco de Germoplasma de Viçosa como UFV 529, UFV 530 e UFV 305, respectivamente. Outras 39 introduções de acessos do Híbrido de Timor foram feitas na UFV, por meio de amostras de sementes colhidas em cafeeiros selecionados no CIFIC,

nas Estações Experimentais do Instituto de Investigação Agronômica de Angola e na Estação Regional de Uige(ERU), do Instituto de Café de Angola. (Pereira et al., 2008)

Com as informações disponíveis na UFV, sabe-se que as introduções UFV 342, UFV 376, UFV 377 e UFV 378 são originadas de material genético recebido pelo CIFIC, com os registros CIFIC 2234 e 2235, selecionados na Tanzânia, com a designação VCE 1587. A introdução UFV 376 foi selecionada do cafeeiro IIAA808/5 e a UFV 377 e UFV 378, dos cafeeiros IIAA 491-I originada do acesso CIFIC 832/1. As introduções UFV 379, UFV 380, UFV 381, UFV383 e UFV 401 são provenientes dos cafeeiros IIAA 845/5, IIAA 845/8, IIAA 845/19, IIAA 845/20, IIAA 845/21 e IIAA 845/17, respectivamente, que se originaram do acesso CIFIC 2252. A introdução UFV 407 originou-se da progênie do cafeeiro CIFIC 1343/234, e a UFV 410 da progênie do acesso CIFIC 1343/212. (Pereira et al., 2008)

As introduções registradas como UFV 427 a UFV 450 foram oriundas do Instituto de Café de Angola, selecionadas na Estação Regional de Uige, em cafeeiros das introduções ERU 202, ERU 206, ERU 207, ERU 208, ERU 209 e ERU 210. Os acessos UFV 427, UFV 428, UFV 429, UFV 430 e UFV 431 foram selecionados dos cafeeiros ERU 202/13, ERU 202/3, ERU 206/9, ERU 206/14 e ERU 206/12, respectivamente, todos descendentes do cafeeiro CIFIC 1343/136. As introduções UFV 432, UFV 433, UFV 434 e UFV 435 são oriundas de progênies dos cafeeiros ERU 207/6, ERU 207/15, ERU 207/12 e ERU 207/5, respectivamente, que são descendentes do acesso CIFIC 2568. A progênie UFV 436 é proveniente de ERU 208/10, que é descendente de CIFIC 2569. (Pereira et al., 2008)

Os acessos registrados como UFV 437, UFV 438, UFV 439, UFV 440, UFV 441, UFV 442, UFV 443, UFV 444, UFV 445, UFV 446, UFV 447 e UFV448 foram selecionados, respectivamente, nos cafeeiros ERU 209/1, ERU 209/13, ERU 209/2,

ERU 209/6, ERU 209/10, ERU 209/14, ERU 209/7, ERU 209/11, ERU 209/8 e ERU 209/12, todos provenientes da introdução CIFIC 2570. As progênies designadas UFV 449 e UFV 450 foram selecionadas nos cafeeiros ERU 210/4 e ERU 210/15, respectivamente, que são provenientes do acesso CIFIC 2571. Outras duas introduções do Híbrido de Timor recebidas pela UFV foram UFV 408 e UFV 451, sendo a primeira descendente do cafeeiro CIFIC 1590/9 e a segunda recebida somente com a designação de Híbrido de Timor. Essas informações detalhadas relatando as origens dos acessos do Híbrido de Timor podem ser importantes para possibilitar comparações de resultados obtidos em Centros de Pesquisa de várias partes do mundo, uma vez que, esse germoplasma encontra-se amplamente distribuído e faz parte de importantes programas de melhoramento de outras instituições. (Pereira et al., 2008)

Portanto, o conhecimento da resistência do Híbrido de Timor a *H. vastatrix* é fundamental para o entendimento da base genética da resistência a essa doença. Em geral, a resistência no patossistema *Coffea* spp. vs. *H. vastatrix* foi pouco estudada, os trabalhos existentes, além de escassos, são pouco informativos (Pereira, 1995; Prakash et al., 2004; Brito, 2007). Até o momento, foram identificados nove genes dominantes de resistência em plantas de café de diferentes espécies, caracterizados pela sigla S_H (Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967; Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Bettencourt & Rodrigues Júnior, 1988). Esses genes de resistência foram encontrados, principalmente, em *C. arabica* (S_H1, 2, 4, 5), *C. canephora* (S_H 5, 6, 7, 8, 9) e *C. liberica* (S_H3). Os genes S_H6, 7, 8 e 9 também foram encontrados em derivados do Híbrido de Timor. Além desses, foram detectados pelo menos mais dois genes de resistência ainda não caracterizados, que, isoladamente ou associados aos genes SH1-SH9, condicionam resistência a mais de 40 raças fisiológicas de ferrugem (Várzea & Marques, 2005).

O conhecimento da maneira pela qual os genes S_H são herdados é de extrema importância para os programas de melhoramento que buscam resistência duradoura a *H. vastatrix*, um fungo que apresenta elevada variabilidade genética. Os genes S_{H1} , 2, 4 e 5, encontrados em *C. arabica*, já foram suplantados por diversas raças de *H. vastatrix* (Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971), inclusive as identificadas no Brasil (Cardoso, 1986). Portanto, os programas de melhoramento do cafeeiro buscam a resistência em outras espécies e híbridos interespecíficos, como o Híbrido de Timor.

Portanto, o emprego de materiais oriundos do Híbrido de Timor que contém os fatores de resistência S_{H5} , S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} (Wagner & Bettencourt, 1965, Vishveshwara, 1974; Bettencourt & Rodrigues, 1988) se constitui em fonte importante para programas de melhoramento que visam a resistência duradoura do cafeeiro à ferrugem.

2.3 Marcadores moleculares

O desenvolvimento de marcadores moleculares impulsionou a pesquisa genética, propiciando a detecção de polimorfismos de DNA com comportamento mendeliano, passível de ser utilizado em diferentes áreas da genética e do melhoramento de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O surgimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tornou possível aliar o poder de informação gerada por marcadores moleculares à rapidez do processo de genotipagem (Mullis & Faloona, 1987). Existem, atualmente, grande variedade de marcadores moleculares disponíveis. Os tipos de marcadores diferem-se quanto a forma para identificar o polimorfismo. 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. Aqueles revelados por meio da amplificação incluem RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), SSR (*Single Sequence repeats*), dentre outros.

2.4 AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*)

A técnica de AFLP (Vos et al. 1995) combina aplicabilidade universal com alto poder de discriminação e reprodutibilidade. Esta técnica baseia-se na digestão do DNA genômico com enzimas de restrição e ligação de adaptadores de sequência conhecida nas extremidades coesivas dos fragmentos gerados, numa etapa inicial. As duas enzimas de restrição utilizadas na digestão possuem sítios de restrição distintos, normalmente, uma de corte raro (sítio de restrição com 6 pb) e outra de corte frequente (sítio de restrição de 4 pb), processo que resulta em três tipos de fragmentos: com ambas extremidades digeridas pela enzima de corte frequente, com ambas as extremidades digeridas com enzima de corte raro e com uma das extremidades cortadas com cada enzima. Uma vez que a sequência dos adaptadores e do sítio de restrição é conhecida, pode-se construir *primers* específicos a essas sequências para serem usados na amplificação seletiva dos fragmentos resultantes do processo de digestão.

Entre as vantagens do AFLP estão a detecção de maior número de locos por primer e ampla cobertura do genoma (Lopes *et al.*, 2002), revelando grande variabilidade genética, sem a necessidade de informação prévia de sequência. Além disso, apresenta maior reprodutibilidade, robustez e poder discriminatório, quando comparado ao RAPD e RFLP, as desvantagens incluem o alto custo e a necessidade de DNA de elevada pureza, além de várias etapas envolvidas na obtenção dos resultados. (Vanechoutte, 1996).

2.5 SSR (Simple Sequence Repeats) ou Microssatélites

Microssatélites são sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem no genoma. As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre indivíduos da mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Esses marcadores constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis. Esse alto nível de diversidade alélica possibilita a obtenção de polimorfismo em populações multiparentais e em populações derivadas de híbridos de genótipos relacionados, além de distinguir acessos de germoplasma intimamente relacionados. (Caixeta et al., 2009)

Esses marcadores apresentam vantagens em relação aos demais porque são co-dominantes e facilmente reproduzíveis, além disso, os microssatélites parecem ter distribuição frequente e aleatória, permitindo ampla cobertura do genoma. A limitação desses marcadores é a necessidade de eles serem isolados e desenvolvidos especificamente para cada espécie, não sendo possível utilizar a estratégia de desenho de “*primers* universais”. Além disso, o desenvolvimento desses marcadores envolve um processo demorado, trabalhoso e com alto custo. (Caixeta et al., 2009).

Os marcadores SSR tem sido largamente utilizado em diferentes culturas por apresentar alta reprodutibilidade, simplicidade técnica (PCR), custo relativamente baixo, grande poder de resolução, co-dominância e alto nível de polimorfismo (Yu et al., 2000). Apesar destas vantagens, poucos destes eficientes marcadores foram desenvolvidos para o café, principalmente para *Coffea arabica* (Poncet et al., 2006;

Aggarwal et al., 2007). Marcadores microssatélites derivado de DNA genômico têm sido extensivamente usado ao longo da última década, por causa do alto interesse nas suas propriedades (Ellegren, 2004). Entretanto, eles correspondem a sequências não codantes e assim não facilitam a identificação de genes de interesse. Com o aumento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) disponíveis, surge uma fonte complementar para identificação de microssatélites. As ESTs são fragmentos sequenciados do DNA complementar ao RNA mensageiro e representam parte de uma região transcrita do genoma em determinadas condições fisiológicas. Dessa forma, marcadores SSRs derivados de ESTs têm alta probabilidade de estarem relacionados a porções funcionais do genoma, apesar de a natureza conservada das sequências codantes poder limitar o seu polimorfismo (Varshney et al., 2005). Os conjuntos de dados de ESTs associados a evolução de ferramentas de bioinformática permite a rápida identificação e o desenvolvimento de marcadores EST-SSR. Estas sequências apresentam uma alternativa para o desenvolvimento de *primers* SSR, para identificação de cultivares de café (Poncet et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de experimentação e material genético

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Para a caracterização molecular e o estudo da resistência do cafeeiro a *H. vastatrix* foram utilizados 152 acessos de Híbrido de Timor do Banco de Germoplasma da UFV e 6 genótipos do melhoramento EPAMIG/UFV. Na Tabela 1 segue as identificações e origem de cada acesso.

Tabela 1 - Acessos de Híbrido de Timor utilizados para caracterização molecular com marcadores SSR e AFLP.

Genótipo	Origem	Genótipo	Origem
UFV 376-01	CIFC 2234	UFV 428-02	CIFC 1343/136
UFV 376-02	CIFC 2234	UFV 428-03	CIFC 1343/136
UFV 376-05	CIFC 2234	UFV 428-04	CIFC 1343/136
UFV 376-08	CIFC 2234	UFV 428-05	CIFC 1343/136
UFV 376-09	CIFC 2234	UFV 430-13	CIFC 1343/136
UFV 376-11	CIFC 2234	UFV 430-15	CIFC 1343/136
UFV 376-12	CIFC 2234	UFV 432-25	CIFC 2568
UFV 376-14	CIFC 2234	UFV 432-30	CIFC 2568
UFV 376-31	CIFC 2234	UFV 432-41	CIFC 2568
UFV 376-37	CIFC 2234	UFV 433-01	CIFC 2568
UFV 376-52	CIFC 2234	UFV 433-03	CIFC 2568
UFV 376-57	CIFC 2234	UFV 434-09	CIFC 2568
UFV 376-79	CIFC 2234	UFV 435-03	CIFC 2568
UFV 377-01	CIFC 2235	UFV 435-08	CIFC 2568
UFV 377-04	CIFC 2235	UFV 435-13	CIFC 2568
UFV 377-05	CIFC 2235	UFV 437-02	CIFC2570
UFV 377-15	CIFC 2235	UFV 437-03	CIFC2570
UFV 377-21	CIFC 2235	UFV 437-06	CIFC2570
UFV 377-23	CIFC 2235	UFV 437-09	CIFC2570
UFV 377-24	CIFC 2235	UFV 437-10	CIFC2570
UFV 377-34	CIFC 2235	UFV 438-03	CIFC2570
UFV 377-51	CIFC 2235	UFV 438-10	CIFC2570
UFV 379-07	CIFC 2252	UFV 438-12	CIFC2570
UFV 380-52	CIFC 2252	UFV 438-40	CIFC2570
UFV 408-01	CIFC 1590/9	UFV 438-49	CIFC2570
UFV 408-10	CIFC 1590/9	UFV 438-52	CIFC2570
UFV 408-18	CIFC 1590/9	UFV 439-01	CIFC2570
UFV 408-26	CIFC 1590/9	UFV 439-02	CIFC2570
UFV 408-28	CIFC 1590/9	UFV 439-03	CIFC2570
UFV 427-01	CIFC 1343/136	UFV 439-04	CIFC2570
UFV 427-09	CIFC 1343/136	UFV 439-05	CIFC2570
UFV 427-15	CIFC 1343/136	UFV 439-11	CIFC2570
UFV 427-22	CIFC 1343/136	UFV 439-13	CIFC2570
UFV 427-24	CIFC 1343/136	UFV 439-14	CIFC2570
UFV 427-40	CIFC 1343/136	UFV 439-16	CIFC2570
UFV 427-55	CIFC 1343/136	UFV 440-04	CIFC2570
UFV 427-56	CIFC 1343/136	UFV 440-07	CIFC2570
UFV 427-65	CIFC 1343/136	UFV 440-10	CIFC 2570
UFV 427-90	CIFC 1343/136	UFV 440-18	CIFC 2570
UFV 428-01	CIFC 1343/136	UFV 440-19	CIFC 2570

Tabela 1- Continuação.....

Genótipo	Origem	Genótipo	Origem
UFV 440-22	CIFC 2570	UFV 446-109	CIFC 2570
UFV 440-32	CIFC 2570	UFV 446-138	CIFC 2570
UFV 440-37	CIFC 2570	UFV 447-06	CIFC 2570
UFV 441-01	CIFC 2570	UFV 447-43	CIFC 2570
UFV 441-02	CIFC 2570	UFV 447-47	CIFC 2570
UFV 441-03	CIFC 2570	UFV 447-48	CIFC 2570
UFV 441-04	CIFC 2570	UFV 447-50	CIFC2570
UFV 441-05	CIFC 2570	UFV 447-51	CIFC 2570
UFV 441-11	CIFC 2570	UFV 447-67	CIFC 2570
UFV 441-13	CIFC 2570	UFV 448-12	CIFC 2570
UFV 441-14	CIFC 2570	UFV 448-16	CIFC 2570
UFV 441-20	CIFC 2570	UFV 448-40	CIFC 2570
UFV 442-34	CIFC 2570	UFV 448-42	CIFC 2570
UFV 442-40	CIFC 2570	UFV 448-48	CIFC 2570
UFV 442-42	CIFC 2570	UFV 448-69	CIFC 2570
UFV 442-44	CIFC 2570	UFV 448-75	CIFC 2570
UFV 442-47	CIFC 2570	UFV 449-20	CIFC 2571
UFV 442-50	CIFC 2570	UFV 450-06	CIFC 2571
UFV 442-108	CIFC 2570	UFV 450-12	CIFC 2571
UFV 443-02	CIFC 2570	UFV 450-18	CIFC 2571
UFV 443-03	CIFC 2570	UFV 450-61	CIFC 2571
UFV 443-07	CIFC 2570	UFV 450-63	CIFC 2571
UFV 443-08	CIFC 2570	UFV 450-65	CIFC 2571
UFV 444-01	CIFC 2570	UFV 450-84	CIFC 2571
UFV 444-02	CIFC 2570	UFV 451-28	CIFC
UFV 444-04	CIFC 2570	UFV 451-42	Híbrido de Timor
UFV 444-05	CIFC 2570	UFV 454-43	KP23 X Híbrido de Timor
UFV 445-01	CIFC 2570	UFV 477-02	CIFC H626
UFV 445-02	CIFC 2570	2 II P6	Melhoramento EPAMIG/UFV
UFV 445-03	CIFC 2570	12-III P4	Melhoramento EPAMIG/UFV
UFV 445-46	CIFC 2570	12- III P6	Melhoramento EPAMIG/UFV
UFV 445-53	CIFC 2570	22-IV P6	Melhoramento EPAMIG/UFV
UFV 445-70	CIFC 2570	77-P7	Melhoramento EPAMIG/UFV
UFV 445-92	CIFC 2570	85-P7	Melhoramento EPAMIG/UFV
UFV 446-08	CIFC 2570	CIFC 4106	UFV 516
UFV 446-09	CIFC 2570	CIFC 832-1	UFV 832/1
UFV 446-29	CIFC 2570	CIFC 832-2	UFV 832/2
UFV 446-50	CIFC 2570		
UFV 446-98	CIFC 2570		
UFV 446-99	CIFC 2570		
UFV 446-104	CIFC 2570		

3.2 Extração do DNA

Folhas jovens de cada cafeeiro foram coletadas, armazenadas em ultrafreezer - 80°C e liofilizadas. O DNA foi extraído seguindo o protocolo de Diniz et al. (2005). Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 e a sua qualidade confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1% %, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e fotodocumentado em Eagle-eye II TM (Stratagene). Os DNAs foram diluídos para a concentração final de 25 ng/μl e armazenados a - 20°C até o uso.

3.3 Marcadores SSR

Foram analisados 29 *primers* SSR nos 158 acessos de Híbrido de Timor. A reação de PCR foi realizada com 25 ng de DNA, 1 U de *Taq* DNA polimerase, tampão 1X da enzima, 1 mM de MgCl₂, 150 μM de cada dNTP e 0,1 μM de cada *primer*, completando o volume para 20 μl com água milli-Q estéril. A amplificação foi realizada com o auxílio dos termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*). Após desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, foram realizados 10 ciclos de *touchdown* PCR, a 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento decrescendo 1°C a cada ciclo (de 66°C até 57°C), durante 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos, seguidos por mais 30 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 57°C e extensão a 72°C, com 30 segundos cada etapa. A extensão final foi realizada a 72°C, por 20 minutos.

A detecção do polimorfismo dos marcadores microssatélites foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante 6%, corado com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Brito *et al.* (2010).

3.4 Marcadores AFLP

A técnica de AFLP foi realizada conforme descrito por Brito *et al.* (2010), com algumas modificações. Os DNAs dos Híbrido de Timor foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*, por 8 h, a 37 °C. Os fragmentos gerados foram ligados aos adaptadores específicos, utilizando-se a enzima *T4 DNA* ligase, por 14 h, a 4°C. O material digerido e ligado foi diluído 1:10 em TE pH 8,0 e armazenado a -20 °C. A amplificação pré-seletiva foi realizada com a utilização de *primers* complementares aos adaptadores, contendo um nucleotídeo adicional (N) na extremidade 3'. O programa de amplificação pré-seletiva foi de 23 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. O produto pré-amplificado foi diluído 1:40 em TE pH 8,0 e armazenado a -20 °C. Para a reação de amplificação, foram utilizadas 5 combinações de *primers* seletivos, E-CAT/M-AGC, E-CCT/M-ATA, E-CGA/M-AGC, E-CGT/M-AGT e E-CTT/M-AGC. O programa de amplificação seletiva foi de 13 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos (com diminuição de 0,7°C a cada ciclo) e extensão a 72°C por 60 segundos. O programa de amplificação ainda constou de 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 20 minutos. Ao produto amplificado foram adicionados 8 µL de formamida (formamida 98%, EDTA 20 pH 8,0 10 mM, *xylene cyanol* 1 mg/mL e *bromophenol blue* 1 mg/mL). O polimorfismo dos marcadores foi observado em gel de poliacrilamida desnaturante (6%), corado com prata.

3.5. Isolados das raças II e XXXIII de *H. vastatrix*

A obtenção dos isolados das raças II (v5) e XXXIII (v5,7 ou v5, 7, 9) foi adquirida no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (Biocafé) na Universidade Federal de Viçosa. A raça II foi a primeira a ser identificada no Brasil e desde então, tem sido a mais prevalente em regiões cafeeiras do País. O isolado utilizado foi caracterizado biologicamente por Cardoso et al (1988) e desde então está sendo mantido pelo laboratório. O isolado da raça XXXIII também está sendo mantido pelo Biocafé e foi identificado em genótipos de Catimor (Nascimento et al., 2010)

Os isolados das raças II e XXXIII foram multiplicados isoladamente em mudas de cafeeiro da variedade Caturra, pela inoculação dos uredíniosporos na face abaxial das folhas. Após a inoculação, as plantas foram levadas para uma câmara de nevoeiro (22°C UR~ 90%) onde permaneceram por 48h na ausência de luz. Após esse período foram transferidas para uma câmara mantida a 22°C e fotoperíodo de 12h, até a esporulação.

Após a multiplicação, os uredíniosporos foram coletados pela raspagem com cápsula de gelatina e armazenados em recipientes de vidro com 50%UR a 5°C (Zambolim & Chaves, 1974).

3.6 Caracterização da Resistência a *H. vastatrix* às raças II e XXXIII

A porcentagem de germinação dos uredíniosporos utilizados foi determinada em ágar – água, conforme a metodologia descrita por Zambolim & Chaves (1974). A avaliação da resistência genética dos Híbridos de Timor às raças II (v5) e XXXIII (v5,7 ou V5,7,9) de *H. vastatrix* foi realizada no departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. A raça II foi inoculada em Dezembro de 2012 e a raça XXXIII em fevereiro de 2013, em discos de folhas em cada acesso. Para cada Híbrido de Timor foram coletadas cerca de 20 folhas, completamente expandidas, apresentando

aspecto ligeiramente brilhante na superfície adaxial, situada no segundo ou no terceiro par de folhas de cada ramo. As folhas foram coletadas durante o período da manhã e acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados. Em seguida foram armazenadas em caixa de isopor com jornal umedecido, para evitar a exposição das amostras ao calor e danos mecânicos, durante o transporte até o Biocafé. A metodologia de disco de folhas foi utilizada para a caracterização da resistência dos Híbridos de Timor (Eskes, 1982), sendo utilizados 16 discos de folhas (1,5 cm de diâmetro) de cada um dos 152 acessos dos Híbridos de Timor e 6 genótipos do melhoramento EPAMIG/UFV. Cada disco de folha foi inoculado na face abaxial com uredíniosporos do patógeno com o auxílio de pincel de pêlo de camelo. Após a inoculação, os discos foram dispostos sobre uma tela de nylon e espuma, saturada com água, no interior de um gerbox, e então atomizados com água destilada. Os gerbox contendo os discos de folhas foram fechados e mantidos na ausência de luz durante 48 horas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Em seguida, os gerbox foram transferidos para uma câmara com condições controladas de temperatura e luminosidade ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de luz). Os discos de folhas inoculados foram limpos com o auxílio de algodão, 48 horas após a inoculação.

3.7. Avaliação resistência do cafeeiro Híbrido de Timor à ferrugem

As avaliações dos cafeeiros as raças II e XXXIII foi determinada de acordo com a reação de resistência (ausência de uredíniosporos) ou suscetibilidade (presença de uredíniosporos), manifestada em cada acesso utilizando a tabela de notas proposta por Eskes, 1982, onde notas 0 a 4 indivíduos resistentes e 5 a 9 suscetível quatro avaliações foram realizadas em intervalos de 15 dias

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização molecular dos acessos de Híbridos de Timor do banco germoplasma UFV por meio de marcadores microssatélites.

Os 29 *primers* microssatélites analisados amplificaram 92 bandas de DNA, dos quais 75 foram polimórficas (81,5%). Foi obtida uma média de 3,17 bandas por *primer* (Figura 1) e amplitude de 1 a 6 bandas para os 29 *primers* microssatélites avaliados. Dos 158 acessos analisados pelo método de agrupamento baseado nos complementos aritméticos de Jaccard, utilizando-se o método UPGMA (Figura 2), foi possível separar 151 genótipos. Sete acessos não diferiram, não separando UFV450-06 do UFV450-12, o UFV428-01 do UFV428-02 e o UFV427,15 do UFV427-90 e do UFV428-04. Essa não discriminação de acessos pode ter ocorrido devido ao uso reduzido de marcadores moleculares ou por esses acessos serem réplicas no banco de germoplasma.

Na análise de agrupamento pelo método de Tocher, observado na Tabela 2, foi verificada a formação de 15 grupos distintos, Grupo I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV e XV, sendo os grupos I e II, os mais numerosos, respectivamente com 32,09% e 39,8% dos acessos analisados. Os grupos X, XI, XII, XIII, XIV e XV foram formados por apenas um acesso, sugerindo que os acessos pertencentes a esses grupos sejam os mais divergentes. Os grupos VII e VIII apresentaram formação com três acessos cada, e o grupo IX com apenas dois, caracterizando um grau considerável de divergência. Os grupos III, IV, V e VI foram representados com 5, 11, 5 e 7 acessos, respectivamente.

Na análise realizada com o método hierárquico UPGMA, submetido a um corte de cerca de 0,12% de dissimilaridade, observou-se a formação de 19 grupos (Figura 2), sendo o décimo sétimo formado por um grande número de acessos (42). Os grupos I, XI

e XV foram os menos representativos, com um acesso cada, sendo eles UFV379-07, CIFC4106 e UFV441-11. Ambos os métodos demonstraram semelhança no agrupamento dos acessos, porém não idênticos, podendo-se observar divergência nos grupos VII, XI, XIII e XV do método Tocher, os quais foram formado pelos mesmos acessos dos grupos I,II, XI e XV do método UPGMA. O UPGMA ofereceu uma apresentação mais detalhada, possibilitando visualizar as distâncias dentro de um determinado grupo, complementando o Tocher, que por sua vez, forneceu grupos distintos. Esse resultado também foi observado por Kvitschal (2008), estudando a caracterização e divergência genética de germoplasma de mandioca da região urbana de Maringá – Paraná. E esse autor concluiu que a combinação dos dois métodos permite uma melhor orientação na condução dos acessos. O método UPGMA apresenta uma formação mais complexa e detalhada que o de Tocher, permitindo a visualização de acessos mais similares dentro dos grupos. Como exemplo, pode-se observar o grupo II do UPGMA (Figura 2) que é formado pelos acessos UFV435-03, UFV434-09 e UFV435-13, os quais compõem o grupo VII do Tocher (Tabela 2). Com o dendrograma UPGMA é possível visualizar que entre os três genótipos, o UFV434-09 e UFV435-13 apresentam maior similaridade, o que não pode ser observado no Tocher. Segundo Bertan et al. (2006), esse fato ocorre no Tocher porque nesse método preconiza-se sempre as maiores distâncias entre grupos em relação a distância dentro dos grupos, sendo considerado um método exclusivo na formação dos grupos de genótipos. O UPGMA associado ao Tocher fornece um suporte mais eficiente para a determinação de divergência, em que Tocher discrimina cada grupo e o UPGMA discrimina cada acesso. O método de Otimização de Tocher alocou os acessos previamente definidos como mais divergentes de forma isolada em grupos distintos, e a análise intergrupos revelou que as maiores divergências ocorrem entre os grupos V e

VII e XIII e XV, e maior similaridade entre os grupos V e VII. A análise intragrupo aponta o grupo VII como o que tem a menor médias de distâncias intragrupo (Tabela 3).

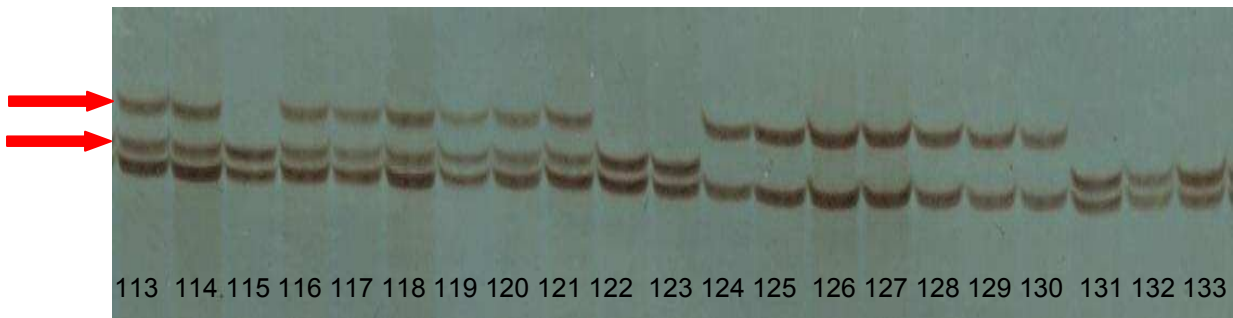


Figura 1- Padrão molecular dos Híbridos de Timor para *primer* SSR- 074 . Os números 113 a 133 correspondem a alguns acessos avaliados. As setas indicam as bandas polimórficas.

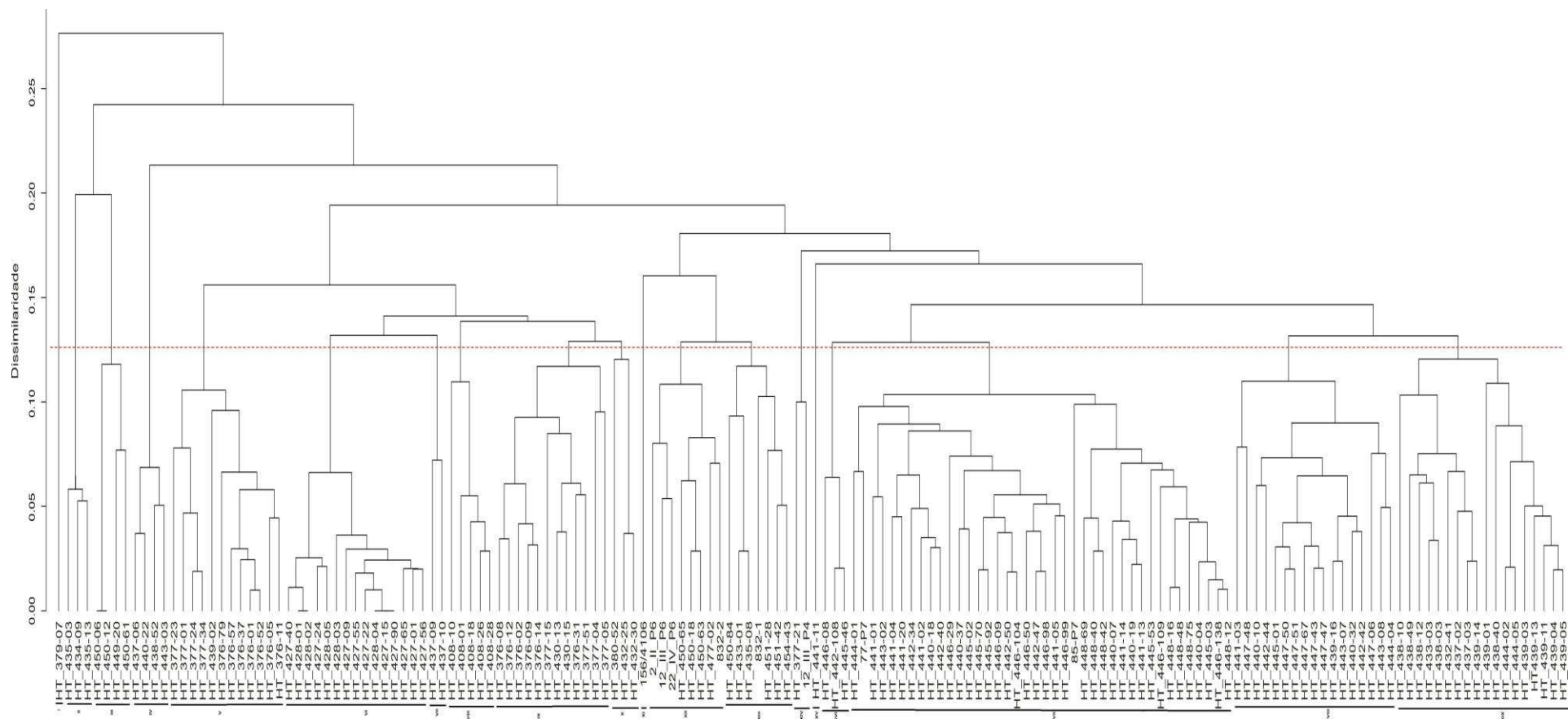


Figura 2 - Dendrograma obtido por meio do método UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, estimadas entre 158 genótipos de cafeeiro e baseadas em 92 marcadores SSR oriundos de 29 *primers* .

Tabela 2 – Grupos gerados pelo método de Otimização de Tocher com base na dissimilaridade entre os 158 acessos de Híbrido de Timor, analisados pelos 29 *primers* microssatélites

Grupos	Acessos	%
< 1 >	427-15, 427-90, 428-04, 427-22, 427-55, 427-56, 427-65, 427-01, 427-09, 428-03, 428-05, 428-02, 428-01, 427-40, 427-24, 430-13, 408-01, 12 III P6, 376-09, 430-15, 376-14, 376-31, 377-51, 442-34, 376-79, 376-08, 376-11, 376-01, 376-52, 376-02, 376-57, 408-18, 376-05, 376-37, 408-28, 442-40, 376-12, 408-26, 439-04, 432-25, 437-10, 435-08, 437-09, 377-15, 441-05, 441-02, 439-05, 439, 11, 446-98, 440-18, 446-104, 377-05	32,9
< 2 >	450-06, 450-12, 449-20, 450-63, 450-18, 448-12, 448-75, 445-03, 448-48, 446-138, 440-04, 448-16, 448-42, 441-14, 442-50, 446-09, 446-99, 446-50, 445-02, 445-92, 446-109, 442-47, 445-53, 441-13, 440-19, 440-07, 441-20, 448-40, 445-70, 440-37, 445-46, 441-04, 448-69, 442-108, 477-02, 77-P7, 439-13	39,8
< 3 >	377-24, 377-34, 377-01, 377-23, 439-02	3,16
< 4 >	437-03, 439-14, 437-02, 432-41, 433-03, 438-49, 447-06, 438-10, 12 III P4, 438-52, 439-01	6,9
< 5 >	437-06, 440-22, 443-03, 447-48, 441-03	3,16
< 6 >	451-42, 454-43, 451-28, 450-84, 832-1, 22 IV P6, 433-01	5,06
< 7 >	434-09, 435-13, 435-03	1,89
< 8 >	408-10, 432-30, 380-52	1,89
< 9 >	377-04, 377-21	1,26
< 10 >	438-40	0,63
< 11 >	4106	0,63
< 12 >	446-08	0,63
< 13 >	441-11	0,63
< 14 >	450-61	0,63
< 15 >	379-07	0,63

Tabela 3. Distâncias médias intra e intergrupos estimadas pelo método de Otimização de Tocher com base na Distância Euclidiana padronizada

Grupos	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
I	.1247	.1782	.1727	.1896	.2034	.1880	.2539	.1593	.1737	.1732	.2296	.1931	.2734	.2055	.2462
II		.1232	.2277	.1775	.1953	.1831	.2744	.2172	.1979	.1571	.2082	.1630	.1550	.1880	.3002
III			.0901	.2276	.2032	.2391	.3066	.2157	.1895	.2006	.2784	.1548	.2606	.2278	.2163
IV				.1124	.1671	.2426	.3240	.2190	.1992	.1579	.2255	.2115	.2072	.2672	.3270
V					.1032	.2703	.3992	.2701	.2588	.2300	.2518	.1511	.2922	.2001	.2494
VI						.1210	.1861	.1804	.2069	.1843	.1593	.2216	.1852	.2353	.2709
VII							.0564	.1977	.2565	.2536	.2084	.3333	.3026	.2612	.2726
VIII								.1242	.1773	.1757	.1919	.2485	.3119	.2857	.2468
IX									.1358	.2053	.2180	.2335	.2693	.2696	.2828
X										-	.2264	.1579	.1667	.2688	.3125
XI											-	.2321	.2727	.2364	.2613
XII												-	.2000	.1731	.2549
XIII													-	.2692	.3704
XIV														-	.2727
XV															-

4.2 Caracterização dos Híbridos de Timor analisados por marcador dominante AFLP

Visando avaliar se a não discriminação dos sete acessos ocorreu devido ao uso de número reduzido ou tipo de marcador molecular, esses cafeeiros foram submetidos a análise com marcadores AFLP (Figura 3). Com as cinco combinações de *primers* AFLP analisadas nos 158 acessos foram obtidas 126 bandas, com uma média de 25,2 bandas polimórficas por *primers*. Destes 158 acessos foram retirados os sete acessos para discriminação, sendo estes o UFV 427-90, UFV 428-04, UFV 428-01, UFV 450-06, UFV 427-15, UFV 450-12 e UFV 428-02. A Figura 4 representa o dendrograma obtido pelo método de agrupamento baseado nos complementos aritméticos de Jaccard, utilizando-se o método UPGMA. Os resultados obtidos confirmaram que os acessos UFV427-90 e UFV428-04 são réplicas no banco de germoplasma. Os acessos UFV450-06 e UFV427-15, apesar de terem sido agrupados com os marcadores AFLP como sendo o mesmo acesso, ele foram discriminados com os microssatélites, comprovando que constituem indivíduos distintos. Os demais cafeeiros que não haviam sido discriminados com os marcadores microssatélite, foram separados pelos AFLP, pela vantagem de favorecer uma ampla cobertura do genoma. Com a análise conjunta, concluiu-se que os acessos UFV450-06, UFV450-12, UFV428-01, UFV428-02 e UFV427-15 constituem acessos distintos e apenas duas réplicas estão presentes no banco de germoplasma. Esses resultados demonstraram a importância de se utilizar diferentes marcadores moleculares na análise de *fingerprinting* de acessos de germoplasma, principalmente quando são geneticamente aparentados.

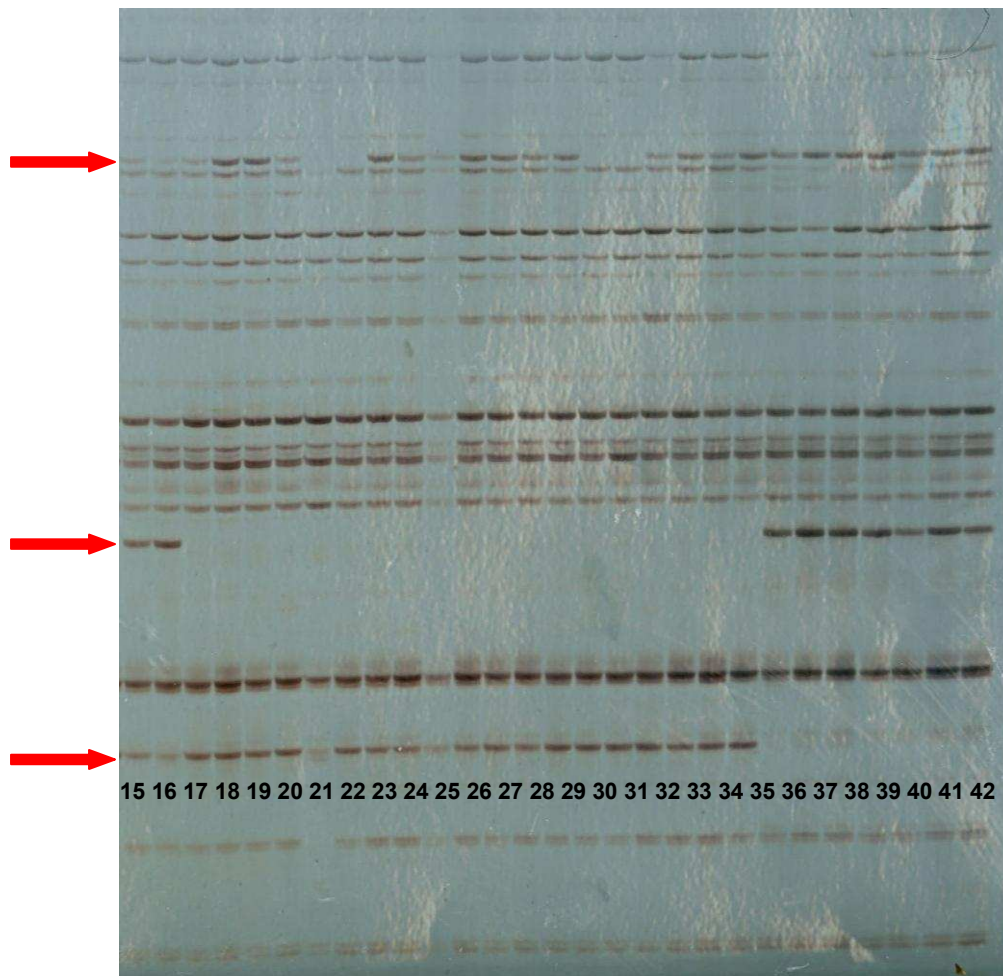


FIGURA 3- Padrão molecular do marcador AFLP E-CCT / M-ATA. Os números 15 a 42 correspondem a alguns dos acessos avaliados. As setas indicam as bandas polimórficas entre os acessos.

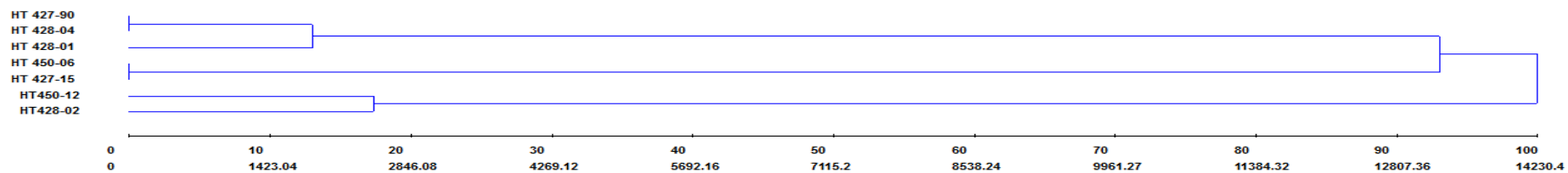


Figura 4 - Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas expressas em complementos de Jaccard, estimadas entre 7 genótipos de cafeeiro e baseadas em 126 marcadores AFLP oriundos de 5 combinação de *primers*

4.3 Número mínimo de marcadores moleculares

Visando determinar o número mínimo de marcadores microsatélites a ser utilizado para a análise dos acessos de Híbrido de Timor, foi realizada análise de correlação e estresse de diferentes matrizes de distância. A correlação e o estresse foram estimados por meio da distância genética calculada pelo índice de Jaccard, considerando os 92 bandas e as matrizes de distância calculadas por meio da amostragem de M_i ($1 \leq M_i \leq 91$) e a matriz de distância genética original com 92 bandas (Figura 5). Observou-se que o número mínimo de marcadores para obter o mesmo padrão de agrupamento e diversidade genética entre os 158 cafeeiros foi 55 marcas. A matriz de dissimilaridade gerada utilizando as 55 marcas apresentou correção de 0,90 ($P < 0,001$) com a matriz usando todas as 92 marcas.

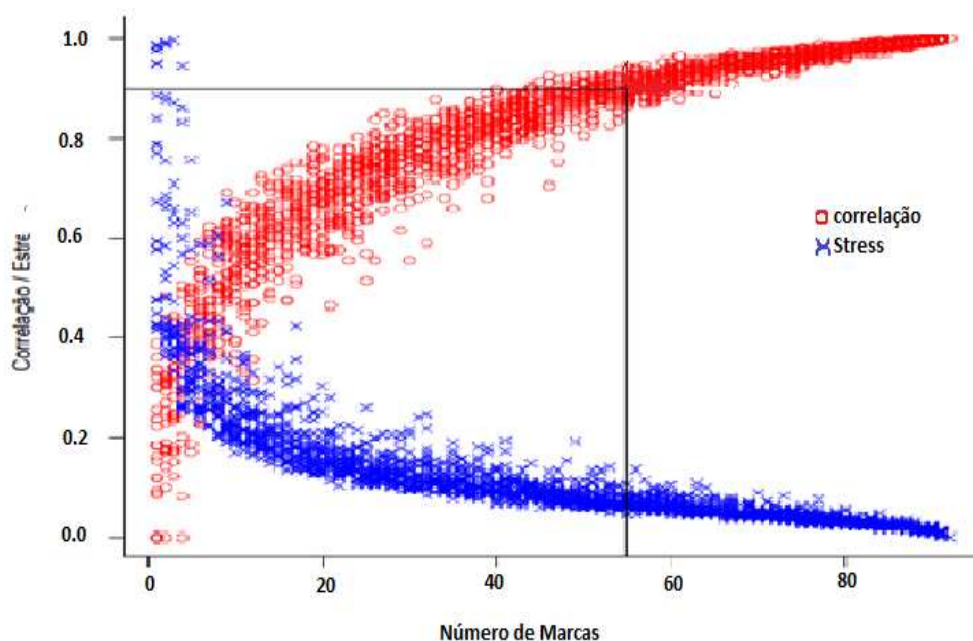


Figura 5. Número ótimo de bandas microsatélites necessárias para acessar a diversidade genética de 158 acessos de Híbrido de Timor. Os pontos correspondem a projeção da correlação e estresse estimado entre as marcas M_i ($1 \leq M_i \leq 92$) e a matriz original com M marcas ($M= 92$)

A correlação de distâncias genéticas permite observar o efeito do uso de um menor número de marcas em vez do número total disponível. As informações do número mínimo de alelos foi usado para analisar a distância genética entre os acessos do banco de germoplasma. A possibilidade da eliminação de um número de alelos menos informativos ao estudo de diversidade foi relatado anteriormente em acessos de *Coffea* (Missio et al., 2011) e Mangaba (Costa et al., 2011). Em *Coffea*, 120 alelo gSSR + EST SSR foram importantes para discriminar os acessos (Missio et al., 2011). Em Mangaba 75 alelos foram importantes para discriminar as populações (Costa et al., 2011). O presente trabalho mostrou que existem alguns alelos que são mais informativos do que outros para diferenciar os grupos genéticos, 55 alelos de 29 locos EST-SSR foram identificados como os alelos mais importantes para análise da diversidade. E para determinar quais foram os melhores marcadores escolhidos pela simulação, foi feito uma análise de frequência para determinar em quais frequências um marcador qualquer era escolhido para alcançar os 90% de correlação (Figura 5).

A figura 6 mostra que todos os marcadores foram escolhidos por pelo uma vez, mas os microssatélites que obtiveram uma maior frequência foram os EST-SSR-022, EST-SSR-074, EST-SSR-062, EST-SSR-041, EST-SSR-079, EST-SSR-069, EST-SSR-097, EST-SSR-096, EST-SSR-017, EST-SSR-018, EST-SSR-036 e EST-SSR-019 com mais de 0,04% de frequência e o que mais contribuiu foi o EST-SSR-097. Para as três análises o resultado foi praticamente o mesmo, obtendo uma média de aproximadamente 26, o que significa que 26 *primers* foram necessário para se obter 90% de correlação para calcular a mesma diversidade com os 29 *primers*.

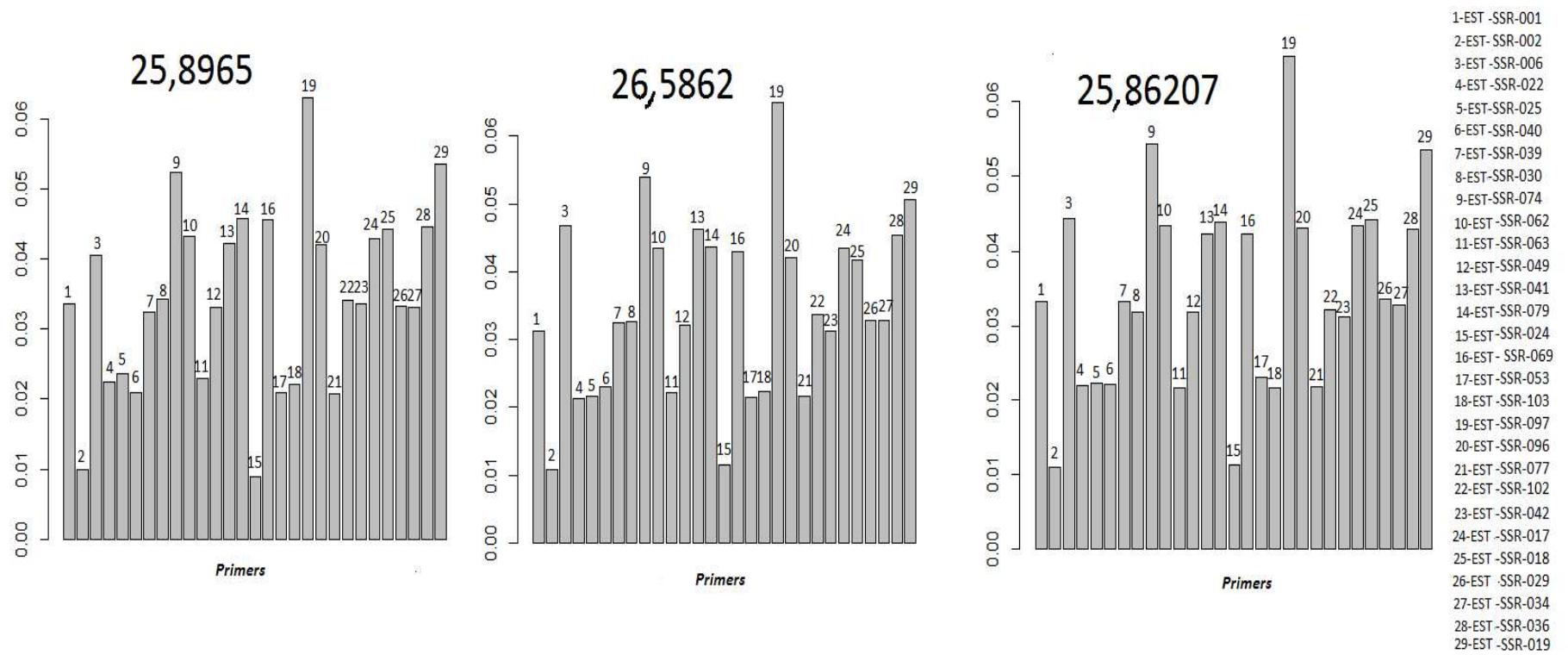


Figura 6- Representação gráfica dos 29 microssatélites escolhidos para acessar a diversidade entre acessos

4.4 *Fingerprinting* dos 152 Híbridos de Timor do banco de Germoplasma UFV

Das 92 bandas obtidas pelos 29 marcadores microssatélites, 75 foram polimórficas, variando de 50 a 100% de polimorfismo para cada *primer* (Tabela 4). Com a análise de *Fingerprinting* utilizando o *software* GENES (Cruz, 20013) foi possível selecionar 58 bandas para diferenciar os acessos. As 58 bandas selecionadas foram suficiente para determinar um padrão para cada acesso, e assim proporcionando um conhecimento individualizado, através dos 29 *primers* microssatélites utilizados. Cabral (2001), quando estudou 18 clones de cafeeiro diferenciadores de *Hemileia vastatrix* conseguiu 12 padrões utilizando o marcador RAPD. A tabela 5 está representado o padrão obtidos com as 58 bandas para diferenciar todos os acessos estudados do banco de germoplasma, E este padrão é fundamental para identificação e manuseio dos acessos pertencente ao Banco de Germoplasma na UFV.

Tabela 4- Descrição das marcas microssatélites analisadas nos 158 acessos de Híbrido de Timor

Nome	Alelos	Alelos polimórfico	Marcas selecionadas	% Polimorfismo
EST-SSR 001	5	a,b,c,d,e	1, 3 e 4 (a,c, d)	100
EST-SSR 002	4	a,b,c, d	6, 7, 8 e 9 (a, b,c,d)	100
EST-SSR 006	2	a,b	10 e 11 (a,b)	100
EST-SSR 017	4	a,b,c, d	74, 75,76,77 (a,b,c,d)	100
EST-SSR018	2	a,b	78, 79 (a,b)	100
EST-SSR019	2	-	-	0
EST-SSR022	6	a,b,c,d,e, f	12, 14 (a,c)	100
EST-SSR024	4	a,b,d	48 (d)	75
EST-SSR025	2	b	19(b)	100
EST-SSR029	3	a,b, c	80, 81, 82 (a,b,c)	100
EST-SSR030	3	a,b, c	24, 25 (a,b)	100
EST-SSR034	4	a,b,c ,d	83, 84, 85, 86 (a,b,c,d)	100
EST-SSR036	4	a,b,c,d	87, 88, 89 (a,b,c)	100
EST-SSR039	3	,b, c	-	100
EST-SSR040	1	-	-	0
EST-SSR041	2	a, b	38, 39 (a, b)	100
EST-SSR042	4	,c, d	72, 73 (c,d)	100
EST-SSR049	2	a	36 (a)	50
EST-SSR053	2	a,	-	100
EST-SSR062	3	a,b,	30, 31 (a,b)	100
EST-SSR063	3	b,c	34, 35 (b,c)	100
EST-SSR069	3	a, c	49, 51(a,c)	66,6
EST-SSR074	3	a,b	27, 28 (a,b)	66,6
EST-SSR077	4	,b, c,d	63, 64, 65 (b,c,d)	100
EST-SSR079	5	, c,d,e	43, 44 (d,e)	60
EST-SSR096	3	a,b, c	59, 60, 61(a,b,c)	100
EST-SSR097	4	a, b, c, d	55, 56,57 (a,b,c)	100
EST-SSR102	4	a, b, c, d	66, 67, 69 (a, b,d)	100
EST-SSR103	1	-	-	0
Total	92	75	58	

Tabela 5 – Continuação....

Acessos	1	3	4	6	7	8	9	10	11	12	14	19	24	25	27	28	30	31	34	35	36	38	39	43	44	48	49	51	55	56	57	59	60	61	63	64	65	66	67	69	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89							
UFV 450-63	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-										
UFV 450-65	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-									
UFV 450-84	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
UFV 451-28	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-								
UFV 451-42	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
UFV 454-43	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
UFV 477-02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
2 II P6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
12 III P4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
12 III P6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
22 IV P6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
77-P7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
85-P7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
4106	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
832-1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
832-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.5 Caracterização da resistência do cafeeiro Híbrido de Timor as raças II e XXXIII de *Hemileia vastatrix*

Para caracterização fenotípica foram inoculadas as raças II e XXXIII nos 158 acessos, considerando que os acessos que apresentaram urediniósporos foram suscetíveis e os que não apresentaram, foram considerados resistentes, de acordo com a tabela de avaliação proposta por Eskes (1982). Os resultados mostraram que todos os acessos apresentaram resistência à raça II (Tabela 6) resistência vertical. O que poderia explicar este resultado é a existência de apenas um gene que não seja o S_{H5} ou combinações dos genes de resistência S_H 5, 6, 7, 8 e 9 nos diferentes Híbridos de Timor. O mesmo não ocorreu com a raça XXXIII, contendo 14 acessos (UFV 376-01, UFV 376-02, UFV376-08, UFV 376-09, UFV376-14, UFV376-37, UFV377-51, UFV408-10, UFV408-18, UFV432-30, UFV445-70, 2 II P6, 12 III P6 e 22 IV P6) foram suscetíveis (figura 7) isto era esperado, pelo fato da raça XXXIII apresentar mais de um gene de virulência (v5, 7 ou v5,7,9) por ser uma raça mais complexa, a mesma foi capaz de suplantar a resistência do acessos que continham os genes S_{H5} , 7 ou S_{H5} , 7 e 9.

Como este banco de germoplasma composto por Híbridos de Timor só existe no Brasil, é válido ressaltar a importância da caracterização da resistência de cada acesso do banco. Existe pouca literatura com relação ao estudo da resistência tanto com as duas raças estudadas no presente trabalho, quanto a outras raças de *H. vastatrix*. O que se tem são trabalhos que avaliaram apenas um Híbrido de Timor como a principal fonte de resistência a doença. Brito (2005) quando trabalhou com população de 177 indivíduos F_2 derivada do Híbrido de Timor UFV 427-15, ele observou que 134 das plantas foram resistentes e 43 suscetíveis à raça II de *H. vastatrix*. No presente trabalho o Híbrido de Timor se comportou como resistente as duas raças do fungo, raça II e XXXIII. Barbosa (2005) também trabalhou com uma população de 113 indivíduos F_2 derivada do Híbrido

de Timor UFV 440-22 e observou que 101 dos indivíduos foram resistentes e 12 suscetíveis à raça II do fungo.

A maioria dos trabalhos é com a raça II, devido a mesma ser a mais abundante no Brasil. Em estudo com as raças II e XXV de *H. vastatrix*, observou-se herança monogênica dominante no Híbrido de Timor UFV 427-15. Também foram observados três genes dominantes governando a resistência às mesmas raças em outros seis Híbridos de Timor UFV 377-10, UFV440-22, UFV442-108, UFV443-03, UFV445-46 e UFV446-08 avaliados (Pereira, 1995), e os mesmos também apresentaram resistência a raça XXXIII. A explicação para os diferentes padrões de herança encontrados está na origem dos diferentes acessos do Híbrido de Timor. Esse germoplasma consiste em uma população heterogênea de plantas coletadas pelo CIFC na década de 50, na Ilha de Timor. Essas plantas e as derivadas dos seus cruzamentos com cultivares de *C. arabica* foram introduzidas em vários centros experimentais do cafeeiro, inclusive no Brasil (Bettencourt, 1973).

Bettencourt e Rodrigues Jr. (1988) relataram que as populações do Híbrido de Timor, possuem pelo menos cinco genes dominantes S_{H5} , S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} que, isolados ou em associação, condicionam espectros de resistência às raças que caracterizam os grupos R (S_{H6}), 1 ($S_{H5,6,7,9}$), 2 ($S_{H5,8}$) 3($S_{H5,6,9}$). Os genes S_{H6} a S_{H9} vêm do *C. canephora*, um dos genitores do Híbrido de Timor. O efeito desses genes são anulados, total ou parcialmente, pelas raças de ferrugem com diferentes combinações dos genes v5, v6, v7, v8 e v9. Com isso podemos explicar a capacidade da raça XXXIII (v5,7 ou v5, 7,9) em suplantar a resistência dos acessos UFV376-01, UFV376-02, UFV376-08, UFV376-09, UFV376-14, UFV376-37, UFV377-51, UFV408-10, UFV408-18, UFV432-30, UFV445-70, e dos indivíduos 2 II P6, 12 III P6 e 22 IV P6 de variedades do programa de melhoramento UFV (Figura 7), e com este resultado

podemos inferir o genótipo dos acessos que foram suscetíveis, os 11 híbridos de Timor e os três em processo de melhoramento EPAMIG/UFV com os genes S_{H5} e 7 ou $S_{H5,7}$ e 9. O presente trabalho ressalta a importância de caracterizar todos acessos que compõem o banco de gemoplasma da UFV, para conseguir identificar quais são os genes que caracterizam a resistência a ferrugem para cada acesso, de modo a facilitar o programa de melhoramento. Manter este banco de germoplasma é de grande importância, já é de conhecimento que a maior fonte de resistência a ferrugem é derivada do Híbrido de Timor e que quanto o conhecimento do patossistema às diversas raças de *H. vastatrix* favorece o melhor conhecimento e identificação e uso do banco de germoplasma. Diante dos resultados obtidos neste e em outros trabalhos, ficou destacado o elevado nível de resistência dos Híbridos de Timor à *H. vastatrix*, sendo assim, um grande potencial para o melhoramento genético do cafeeiro, visando à obtenção de cultivares resistente a ferrugem.

Tabela 6- Caracterização da Resistência dos Híbridos de Timor às raças II e XXXIII de *Hemileia vastatrix*

Acessos	Raça II	Raça XXXIII	Acessos	Raça II	Raça XXXIII	Acessos	Raça II	Raça XXXIII	Acessos	Raça II	Raça XXXIII
UFV 376-01	R	S	UFV 432-41	R	R	UFV 442-50	R	R	UFV 451-28	R	R
UFV 376-02	R	S	UFV 433-01	R	R	UFV 442-108	R	R	UFV 451-42	R	R
UFV 376-05	R	R	UFV 433-03	R	R	UFV 443-02	R	R	UFV 454-43	R	R
UFV 376-08	R	S	UFV 434-09	R	R	UFV 443-03	R	R	UFV 477-02	R	R
UFV 376-09	R	S	UFV 435-03	R	R	UFV 443-07	R	R	2 II P6	R	S
UFV 376-11	R	R	UFV 435-08	R	R	UFV 443-08	R	R	12 III P4	R	R
UFV 376-12	R	R	UFV 435-13	R	R	UFV 444-01	R	R	12 III P6	R	S
UFV 376-14	R	S	UFV 437-02	R	R	UFV 444-02	R	R	22 IV P6	R	S
UFV 376-31	R	R	UFV 437-03	R	R	UFV 444-04	R	R	77 P7	R	R
UFV 376-37	R	S	UFV 437-06	R	R	UFV 444-05	R	R	85-P7	R	R
UFV 376-52	R	R	UFV 437-09	R	R	UFV 445-01	R	R	4106	R	R
UFV 376-57	R	R	UFV 437-10	R	R	UFV 445-02	R	R	832-1	R	R
UFV 376-79	R	R	UFV 438-03	R	R	UFV 445-03	R	R	832-2	R	R
UFV 377-01	R	R	UFV 438-10	R	R	UFV 445-46	R	R	Caturra	S	S
UFV 377-04	R	R	UFV 438-12	R	R	UFV445-53	R	R			
UFV 377-05	R	R	UFV 438-40	R	R	UFV 445-70	R	S			
UFV 377-15	R	R	UFV 438- 49	R	R	UFV 445-92	R	R			
UFV 377-21	R	R	UFV 438-52	R	R	UFV 446-08	R	R			
UFV 377-23	R	R	UFV 439-01	R	R	UFV 446-09	R	R			
UFV 377-24	R	R	UFV 439-02	R	R	UFV 446-29	R	R			
UFV 377-34	R	R	UFV 439-03	R	R	UFV446-50	R	R			
UFV 377-51	R	S	UFV 439-04	R	R	UFV 446-98	R	R			
UFV379-07	R	R	UFV 439-05	R	R	UFV 446-99	R	R			
UFV 380-52	R	R	UFV 439-11	R	R	UFV 446-104	R	R			
UFV 408-01	R	R	UFV 439-13	R	R	UFV 446-109	R	R			
UFV 408-10	R	S	UFV 439-14	R	R	UFV446-138	R	R			
UFV 408-18	R	S	UFV 439-16	R	R	UFV 447-06	R	R			
UFV 408-26	R	R	UFV 440-04	R	R	UFV 447-43	R	R			
UFV 408-28	R	R	UFV 440-07	R	R	UFV447-47	R	R			
UFV 427-01	R	R	UFV 440-10	R	R	UFV447-48	R	R			
UFV 427-09	R	R	UFV440-18	R	R	UFV447-50	R	R			
UFV 427-15	R	R	UFV 440-19	R	R	UFV447-51	R	R			

Tabela 6- Continuação.....

Acessos	Raça II	Raça XXXIII	Acessos	Raça II	Raça XXXIII	Acessos	Raça II	Raça XXXIII	Acessos	Raça II	Raça XXXIII
UFV 427-22	R	R	UFV 440-22	R	R	UFV 447-67	R	R			
UFV 427-24	R	R	UFV 440-32	R	R	UFV 448-12	R	R			
UFV 427-40	R	R	UFV 440-37	R	R	UFV 448-16	R	R			
UFV 427-55	R	R	UFV 441-01	R	R	UFV 448-40	R	R			
UFV 427-56	R	R	UFV 441-02	R	R	UFV 448-42	R	R			
UFV 427-65	R	R	UFV 441-03	R	R	UFV 448-48	R	R			
UFV 427-90	R	R	UFV 441-04	R	R	UFV448-69	R	R			
UFV 428-01	R	R	UFV 441-05	R	R	UFV 448-75	R	R			
UFV 428-02	R	R	UFV 441-11	R	R	UFV449-20	R	R			
UFV 428-03	R	R	UFV 441-13	R	R	UFV 450-06	R	R			
UFV 428-04	R	R	UFV 441-14	R	R	UFV 450-12	R	R			
UFV 428-05	R	R	UFV441-20	R	R	UFV 450-18	R	R			
UFV 430-13	R	R	UFV442-34	R	R	UFV 450-61	R	R			
UFV 430-15	R	R	UFV 442-40	R	R	UFV 450-63	R	R			
UFV 432-25	R	R	UFV442-42	R	R	UFV 450-65	R	R			
UFV 432-30	R	S	UFV442-47	R	R	UFV 450-84	R	R			

R – Resistência e S- Suscetível

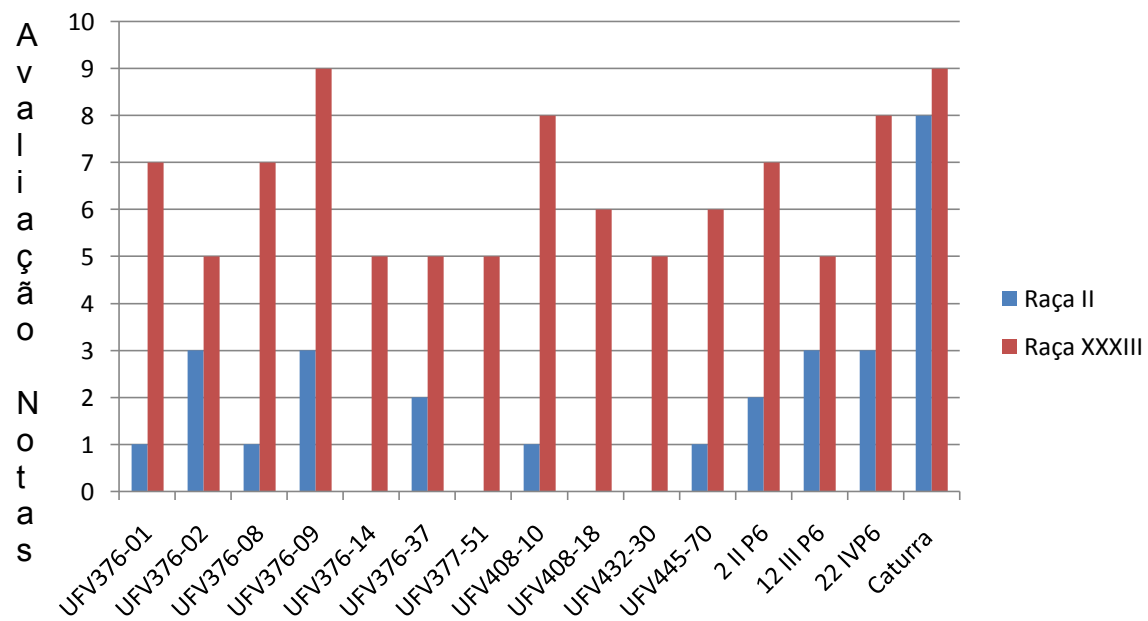


Figura 7- Suscetibilidade e resistência de 14 acessos de HT às raças II e XXXIII de *H. vastatrix*

5.CONCLUSÃO

- A análise dos marcadores moleculares evidenciou a existência de variabilidade genética nos acessos de Híbrido de Timor do Banco de Germoplasma da UFV.
- Foram identificados dois cafeeiros que correspondem a clones, que estão sendo mantidos como plantas distintas.
- Foi possível obter um padrão molecular único (*fingerprinting*) de cada acesso de Híbrido de Timor que está sendo mantido no banco de germoplasma
- Todos os acessos apresentaram resistência vertical à raça II de *Hemileia vastatrix*.
- 11 acessos apresentaram suscetibilidade à raça XXXIII de *Hemileia vastatrix*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL R.K, HENDRE P.S, VARSHNEY R.K, BHAT P.R, KRISHNAKUMAR V and SINGH L (2007) Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theor Appl Genet* 114:359-372.

BARBOSA, J.C., CAIXETA, E.T., CAPUCHO, A.S., KOEHLER, A., MAIA, T.A., SAKIYAMA, N.S. & ZAMBOLIM, L. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 440-22 à raça II de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. pp. s123 In: XXXVIII Congresso de Fitopatologia, Brasília (Resumos). 2005.

BERTAN I.; CARVALHO F.I.F.; OLIVEIRA A.C.; VIEIRA I.; HARTWIG E.A.; SILVA J.A.G.; SHIMIDT, D.A.M; VALERIO I.P.; BUSATO C.C.; RIBEIRO G. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distancia morfológica entre genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas*, 12: 279-286. 2006.

BETTENCOURT A.J.; RODRIGUES C.J. (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, A.J. Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timor'. Campinas: Instituto Agrônomo, 1973. 20p. (Circular, 23).

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

BRITO, G.G. de. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. 2007. 66p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

BRITO, G.G.; ALMEIDA, R.F.; CAIXETA, E.T.; LOUREIRO, M.E; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A.A. Padrão de herança de fonte de resistência do cafeeiro à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (4. : 2005 : Londrina, PR). Anais. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2005.

CAIXETA E.T, RUFINO R.J.N, OLIVEIRA A.B.C, SAKIYAMA N.S, ZAMBOLIM E.M, ZAMBOLIM L (2003) Caracterização da resistência genética do Híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro. In: III Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil. P.226

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

CAIXETA, E.T. ; RUFINO, R.J.N.; OLIVEIRA, A.C.B.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM,L. Caracterização da resistência genética do Híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro. p. 226. 2003. III Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil <http://www.sbicafe.ufv.br//handle/10820/943>

CABRAL, P.G.C., ZAMBOLIM, E.M., ZAMBOLIM, L., LELIS, T.P., CAPUCHO, A.S., CAIXETA, E.T. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. Australasian Plant Disease Notes 4:129-130.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. Melhoramento do cafeeiro: XLI. Produtividade do Híbrido Timor, de seus derivados e outras fontes de resistência a *Hemileia vastatrix*. Bragantia, Campinas, v. 48, n. 1, p. 73-86, 1989.

CARDOSO, R.M.L., ZAMBOLIM,L. & CHAVES, G.M. Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Coletada do germoplasma de *Coffea arabica* L. no Estado de Minas Gerais. Fitopatologia Brasileira, v.13, n.4, p.p 343-346.1988

CARDOSO, R.M.L. & SILVA, E. Raças de *Hemileia vastatrix* identificadas em cafeeiros de genótipos simples e complexos no Estado do Paraná. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Araxá- MG (Resumos)- 1992

COMBES, M.C.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; ROVELLI, P.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. (2000) Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. Molecular Ecology, 9:1171–1193.

CONAB 2013- Levantamento de safra de café – safra /2013 Disponível em: http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos

COSTA, T.S.; SILVA, A.V.C.; LÉDO, A.S.; SANTOS, A.R.F.S.; JUNIOR, J.F.S. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. Pesq. Agropec. bras, Brasília, v.46, n5, p. 499-508. 2011.

CHIACCHIO, F.P.B. Identificação de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., Em material proveniente dos Estados da Bahia e Espírito Santo, *Magister Scientiae* Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG 1973.

CHAVES GM (1976) Melhoramento do cafeeiro visando à obtenção de cultivares resistentes à *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Revista Ceres 23: 321-332.

CHARRIER, A.; ESKES, A. Coffee. In: Tropical Plant Breeding. Eds. CHARRIER, A.; JACQUOT S.; HAMOR, D. NICOLAS COLL. Répres, Cirad, France, pp. 128-152. 1997.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Acta Scientiarum. v.35, n.3, p.271-276, 2013

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

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Review Genetics, London, v.5, n.6, p.435-445, 2004.

ESKES, A.B. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). European Journal of Plant Pathology, v.88, n.4, pp. 127-141, 1982.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GONÇALVES, W; PEREIRA, A.A (1998) Resistência de cafeeiros a nematóides IV-reação de cafeeiros derivados de Híbridos de Timor a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira 22:39-50.

GONÇALVES, M. M., RODRIGUES, M.L., MEXIA, J. N.& DAEHNHARDT, E. 1978. Melhoramento da cafeicultura em Timor face à *Hemileia vastatrix* B. & Br. *Garcia de Orta, Ser. Est. Agron.* 5(1-2):3-10.

KVITSCHAL, M.V. Caracterização e divergência genética de germoplasma de mandioca-de-mesa da região urbana de Maringá, Paraná. Maringá. Tese Doutorado em Genética e Melhoramento. Pos-Graduação em genética e melhoramento, Universidade Estadual de Maringá. 2008.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; PRAKASH, N.S.; TROUSLOT, P.; LORIEUX, M.; CHARRIER, A. (2000) Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. Genome, 44:589-596.

LOPES, M. S.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes

(RAPD e AFLP). Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Uberlândia, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

MALUF, M.P.; SILVESTRINI, M.; RUGGIERO, L.M.C.; GUERREIRO FILHO, O.; COLOMBO, C.A. (2005) Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP AND SSR marker systems. Scientia Agricola, 62:366-373.

MIRANDA, J.M.; PERECIN, D.; PEREIRA, A. A.; Produtividade e resistência à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) de progênies f5 de catuaí amarelo com o híbrido de Timor. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 29, n. 6, p. 1195-1200, nov./dez., 2005.

MISSIO, R.F. CAIXETA, E.T. ZAMBOLIM, E.M. PENA, G.F. ZAMBOLIM, L. DIAS, L.A.S, and SAKIYAMA, N.S. Genetic characterization of an elite coffee germplasm assessed by gSSR and EST-SSR markers. Genetics and Molecular Research 10 (4): 2366-2381, 2011.

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

NASCIMENTO, N.P., ZAMBOLIM, E.M., HADDAD, F., ZAMBOLIM, L. & CAIXETA, E.T. Identificação de clones de cafeeiro para a caracterização de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix*. Simpósio de Integração Acadêmica – 2010 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG (Resumos) 2010.

NORONHA-WAGNER, M.; BETTENCOURT, A.J. Genetic study of resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. I. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. Canadian Journal of Botany, v.45, p.2021-2031, 1967.

PEREIRA, A.A. Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. 1995. 66p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PEREIRA, M.G.; ANJOS, L.H.C. & VALLADARES, G.S. Organossolos: Ocorrência, gênese, classificação, alterações pelo uso agrícola e manejo. In: TORRADO, P.V.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P. & CARDOSO, E.J., eds Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v.4. p.233-27

PEREIRA, A. A.; OLIVEIRA, A.C.B.; SAKIYAMA, N.S. Híbrido de Timor como fonte de resistência a doenças e de qualidade da bebida do cafeeiro. IN: Manejo Fitossanitário da Cultura do Cafeeiro. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Brasília DF - 2008.

PRAKASH, N.S.; MARQUES, D.V.; VÁRZEA, V.M.P.; SILVA, M.C.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene

from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. Theoretical and Applied Genetics, v.109, p.1311-1317, 2004.

PONCET V, RONDEAU M, TRANCHANT C, CAYREL A, HAMON S, KOCHKO A and HAMON P (2006) SSR mining in coffee tree EST databases: Potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. Mol Genet Genomics 276: p 436-449.

PONCET V, HAMON P, MINIER J, CARASCO C, ET AL. (2004). SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome* 47: 1071-1081.

RIBEIRO, I.J.A., SUGIMORI, M.H., MORAES, S.A & MONACO, L.C. Raça Fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. No Estado de São Paulo. Summa Phytopathologica, v.1, pp. 19-22. 1975.

RODRIGUES JÚNIOR, C.J.; GONÇALVES, M.M.; VÁRZEA, V.M.P. Importância do Híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. Revista de Ciências Agrárias, v.27, p.203-213, 2004.

ROBINSON, R.A. Plant pathosystems. Berlin: Springer Verlag, Heidelberg, New York. 1976.

SAKIYAMA, N.S.; CAIXETA, E.T.; SETOTAW, T.A.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A. Híbrido de Timor: a valuable source of genetic variability for Arabica coffee. In: Abstracts of the 22nd International Conference on Coffee Science, Campinas, SP. Brazil. pp169. 2008.

SERA, G.H.; SERA, T.; FONSECA, I.C.B. & ITO, D.S. Resistance to leaf rust in coffee cultivars. Coffee Science, v.5, n1, pp. 59-66. 2008.

SERA, T.; ALTEIA M.Z.; PETEK, M.R. (2001) Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). In: Zambolim L (eds) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, pp217-251

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

TEIXEIRA-CABRAL, T.A.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A.A.; BARROS, E.G.; SILVA, D.S. (2004) Characterization of differential coffee tree hosts for *Hemileia vastatrix*.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends in Biotechnology, v.23, p.48-55, 2005.

VÁRZEA, V.M.P.; RODRIGUES Jr, C.J.; SILVA M.C.M.L.; GOUVEIA, M.; MARQUES, D.V.; 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, PP. 297-320

- VÁRZEA, V.M.P.; MARQUES, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M.; VÁRZEA, V.M.P. (Ed.). Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa: UFV, 2005. p. 53-74.
- VAN DER PLANK, J.E. Plant Disease: Epidemics and Control. New York: Academic Press, 349p. 1963.
- VAN DER VOSSSEN, H. Coffee breeding practices. In: CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. (Eds.). Coffee: recent developments. Oxford-Balckwell Science, UK, 2001, p. 184-201.
- VANEECHOUTTE, M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. Mol. Biotechnol., v. 6, p. 115-142, 1996.
- 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.; RIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, London, v. 23, n. 21, p. 4.407-4.414, 1995.
- YU K, PARK SJ, POYSA V, GEPTS P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Heredity, Saint Louis, v. 91, n.6, p.429-434, 2000.
- WAGNER, M. and BETTENCOURT, A.J (1965) Inheritance of reactin to *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. In: *Coffea arabica* L. Progress report, Coffee Rusts research Center, Oeiras, Portugal, pp1960-65
- WALLER, J.M.; BIGGER, M.; HILLOCKS, R.J. Coffee pests, diseases and their management. Oxfordshire: CAB International, 2007. 400p.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.D.; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). Produção de café com qualidade. Viçosa: UFV, 1999. p. 134-215.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). Controle de doenças de plantas – Grandes culturas, v. 1, p. 83-140, 1997.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. Princípios de fitopatologia. Brasília: ABEAS, 1999. (ABEAS – Curso de Proteção de Plantas – Módulo 5).
- ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix*. Berk. et Br. e *Uromyces phaseolityca* Arth. Experientiae, v.17, pp. 151-184. 1974.

ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M., VALE, F.X.R., PEREIRA, A.A., SAKIYAMA, N.S., CAIXETA, E.T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. In Brazil. pp. 75-115 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VARZEA, V.M.P (Eds) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.