

KÁTIA NOGUEIRA PESTANA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA
RESISTÊNCIA DO CAFEIRO HÍBRIDO DE TIMOR A *Hemileia
vastatrix***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

KÁTIA NOGUEIRA PESTANA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA 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
Fitotecnia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de julho de 2010.

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta
(Coorientadora)

Pesq. Eunize Maciel Zambolim
(Coorientadora)

Prof. Cosme Damião Cruz

Prof. Laércio Zambolim

Prof. Ney Sussumu Sakiyama
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais Antonio Nunes Pestana e Marinalva Nogueira Pestana.

Às minhas irmãs Karla, Renata, Camila e Rafaela.

Ao meu noivo Ubiraci.

Aos meus amigos e familiares.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e força para enfrentar os desafios.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização do Curso.

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

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

Aos meus pais, em especial à minha mãe, pelo carinho, apoio e incentivo.

Às minhas irmãs, pelo incentivo, carinho e pela compreensão e amizade.

Ao meu noivo Ubiraci, pelo carinho, pela atenção, pelo incentivo e pela paciência durante esse tempo.

Ao Professor Ney Sakiyama, pela orientação, amizade, pelo incentivo e pelos aconselhamentos.

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 Laércio Zambolim, pelos aconselhamentos e pelas sugestões.

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

Aos meus amigos do Biocafé (Rej, Pat, Brenda, Bruninha, Samuel, Fernando, Alex, Giselle, Dênia, Dani, Felipe, Flávio, Tesfahun e Rodrigo),

pela amizade, pelo incentivo, pela descontração nas horas vagas e pelo apoio para a realização deste trabalho.

Ao Caio pela amizade e pela força para realização desta pesquisa.

Ao pessoal de campo (Senhor Mário, Senhor Geraldo e Senhor Gerson), pelo apoio para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos que aqui conquistei, em especial a Telma, Éder, Mônica e Daiane, pelo companheirismo.

Às minhas amigas da República Ceis no Quarto: Thalita, Tetê, Tharcy, Natália, Bruna, Alice e Nathali, pela amizade e descontração nas horas vagas.

Aos pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, por terem sempre me incentivado e apoiado o meu crescimento profissional, em especial à Dra. Cláudia, Dr. Sebastião, Dr. Edson e Dr. Alberto Vilarinhos.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, por terem sempre me incentivado, em especial a Onildo, Vânia, Paulo e Epaminondas.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

KÁTIA NOGUEIRA PESTANA, filha de Antônio Nunes Pestana e Marinalva Nogueira Pestana, nasceu em Cruz das Almas, BA, no dia 21 de novembro de 1984.

Em 2003, ingressou no Curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal da Bahia (UFBA), graduando-se pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) em 2008.

No período de julho de 2004 a julho de 2008, foi bolsista de Iniciação Científica na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, desenvolvendo atividades de pesquisa na área de Melhoramento Genético, com a utilização de marcadores moleculares RAPD e SSR.

Em agosto de 2008, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa da dissertação em julho de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Ferrugem do cafeeiro	3
2.2. Genética e melhoramento do cafeeiro	4
2.2.1. Melhoramento para resistência a <i>Hemileia vastatrix</i>	5
2.3. Herança da resistência	6
2.4. Mapeamento genético	8
2.5. Mapeamento de QTLs (<i>Quantitative Trait Loci</i>)	10
2.6. Marcadores moleculares.....	12
2.6.1 Marcadores microssatélites (SSR)	13
2.6.2. Marcadores AFLP.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Local de experimentação e material genético.....	15
3.2. Herança da resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de <i>Hemileia vastatrix</i>	16
3.2.1. Análise fenotípica dos cafeeiros	16
3.2.2. Análise estatística.....	17
3.3. Marcadores moleculares.....	17
3.3.1. Extração do DNA.....	17
3.3.2. Marcadores SSR	18
3.3.3. Marcadores AFLP	19
3.4. Construção do mapa de ligação	20

3.5. Mapeamento de QTLs associados à resistência do cafeeiro à ferrugem	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Herança da resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de <i>Hemileia vastatrix</i>	22
4.2. Mapeamento genético visando à localização dos genes associados à resistência a <i>Hemileia vastatrix</i>	24
4.3. Mapeamento de QTLs associados à resistência do cafeeiro à ferrugem	36
4.3.1. Marca simples	36
4.3.2. Intervalo simples.....	43
5. CONCLUSÕES.....	49
6. REFERÊNCIAS	50

RESUMO

PESTANA, Kátia Nogueira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Caracterização fenotípica e molecular da resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 a *Hemileia vastatrix*.** Orientador: Ney Sussumu Sakiyama. Coorientadoras: Eveline Teixeira Caixeta e Eunize Maciel Zambolim.

Com o intuito de dar suporte aos programas de melhoramento do cafeeiro que visam à obtenção de cultivares resistentes à ferrugem (*Hemileia vastatrix*), neste trabalho objetivou-se estudar a herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 e identificar marcadores moleculares ligados aos genes caracterizados. Para o estudo de herança foram avaliadas três populações originadas do cruzamento entre o progenitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03 e o cultivar suscetível Catuaí Amarelo (UFV 2148-57). Dessas plantas analisadas, 243 correspondem a uma população F₂, 114 a retrocruzamento suscetível (RCs) e 87 a retrocruzamento resistente (RCr). A inoculação foi realizada com a suspensão de esporos (2 mg/mL) do isolado da Raça I de *H. vastatrix*, em discos foliares, com três repetições para as populações F₂ e RCs e duas para RCr. As plantas do Catuaí Amarelo UFV 2148-57 foram suscetíveis em todas as inoculações, enquanto o Híbrido de Timor UFV 443-03, a planta F₁ e as plantas do RCr foram resistentes. Pela análise de segregação das populações F₂, obtiveram-se duas hipóteses significativas: uma de que a resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 a *H. vastatrix* era governada por dois genes dominantes e independentes (15:1; P = 63,10) e a outra de que era conferida por três genes, sendo dois dominantes e um recessivo (61:3; P = 8,87). Plantas do RCs foram utilizadas para a confirmação dos padrões de segregação e

segregaram na proporção de 3:1 ($P = 74,56$), o que era esperado para dois e para três genes. Esse resultado indicou que a resistência desse Híbrido de Timor é condicionada por dois genes dominantes independentes ou três genes independentes (dois dominantes e um recessivo). Como a herança encontrada foi oligogênica (dois ou três genes), para a confirmação e identificação de marcadores moleculares ligados aos genes, estes foram tratados como QTL e, então, localizados em mapa genético de ligação. Para isso, os indivíduos da população F_2 foram analisados com um total de 110 marcadores moleculares. Como 16 marcadores apresentaram distorção da razão de segregação mendeliana esperada, o mapa foi construído com 94 marcadores (62 AFLP, 28 SSR e 4 RAPD). Considerando um LOD *score* mínimo de 3 e máxima recombinação de 40%, os marcadores ficaram agrupados em 11 grupos de ligação, cobrindo uma distância de 964,31 cM do genoma, e 13 marcadores não se ligaram a nenhum dos grupos formados. O maior intervalo entre dois marcadores foi de 32,1 cM, e 68,57% dos marcadores não excederam 20 cM. A caracterização e identificação de QTLs foram realizadas com o auxílio de metodologias de marca simples e intervalo simples. Pela metodologia da marca simples foi possível identificar cinco marcadores associados aos QTLs pelos métodos da ANOVA, regressão e máxima verossimilhança. Esses QTLs foram confirmados pela metodologia de intervalo simples por meio da regressão e máxima verossimilhança. Dois QTLs foram identificados, um deles no grupo de ligação 2 a 0 cM do marcador 21a, explicando 9,6% da variação fenotípica. O outro ficou localizado no grupo de ligação 3 a 13 cM do marcador 43a, explicando 9,3% da variação fenotípica. Esses dois QTLs confirmam, em número e posição, que a resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 a *H. vastatrix* é governada por dois genes dominantes e independentes, mostrando, assim, a importância da genômica para a identificação destes genes. Cabe salientar que as informações deste trabalho são inéditas para o caso do cafeeiro e podem ser úteis em programas de melhoramento baseado em seleção assistida e na clonagem posicional do gene de resistência à ferrugem. Assim, os dados deste estudo deverão fornecer subsídios para futuros trabalhos de melhoramento visando à obtenção de populações mais resistentes e produtivas.

ABSTRACT

PESTANA, Kátia Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Phenotypic and molecular characterization of the resistance of coffee Híbrido de Timor of the *Hemileia vastatrix***. Adviser: Ney Sussumu Sakiyama. Co-Advisers: Eveline Teixeira Caixeta and Eunize Maciel Zambolim.

In order to support the breeding programs coffee that to aim to obtain cultivars resistant to rust (*Hemileia vastatrix*), this work aimed to study the resistance inheritance of Híbrido de Timor UFV 443-03 and identify molecular markers linked characterized genes. To study the inheritance were evaluated three populations originated from cross the Híbrido de Timor UFV 443-03 resistant parent and Catuaí Amarelo (UFV 2148-57) susceptible cultivar. These plants analyzed, 243 correspond to an F₂ population of 114 susceptible backcrossing (BCs) and 87 resistant backcrossing (BCr). Inoculation was performed with a spore suspension (2mg/mL) isolated from the Race I of *H. vastatrix* in leaf discs, with three replicates for the F₂ and RCs, and two for RCr. Plants of the Catuaí Amarelo UFV 2148-57 were susceptible in all inoculations, while the Híbrido de Timor UFV 443-03, the plant F₁ and the BCr plants were resistant. Segregation analysis of F₂ populations obtained two significant cases, the resistance of a coffee Híbrido de Timor UFV 443-03 the *H. vastatrix* was governed by two independent and dominant genes (15:1, P = 63.10) and the other three genes is conferred by two dominant and one recessive (61:3, P = 8.87). Plants of the BCs were used to confirm the segregation patterns, which segregated in a rate of 3:1 (P = 74.56), expected segregation for two and three genes. This result demonstrate that the resistance of the Híbrido de Timor is conditioned by two

dominant independent genes or three independent genes (two dominant and one recessive). As was found oligogenic inheritance (two or three genes), for confirmation and identification of molecular markers linked to genes, they were treated as QTL, and then located in link genetic map. For this, subjects in the F₂ population were analyzed with a total of 110 molecular markers. As 16 markers showed distortion of Mendelian segregation expected rate, the map was constructed with 94 markers (62 AFLP, 28 SSR and 4 RAPD). Whereas a LOD score minimum of three and of 40% recombination maximum, the markers were grouped into 11 linkage groups covering a distance 964.31 cM of the genome, with 13 markers not in any of the linkage groups formed. The longest interval between two markers was 32.1 cM and 68.57% of the markers did not exceed 20 cM. The characterization and identification of QTLs were performed by simple mark and simple interval methods. Methodology of the simple mark was possible to identify markers five associated with QTLs by the methods of ANOVA, regression and maximum likelihood. These QTLs were confirmed by simple interval methodology by means of regression and maximum likelihood. Two QTLs were identified in a 2 linkage group the 0 cM marker 21a, explaining 9.6% of the phenotypic variation. The other was located in 3 linkage group to 13 cM marker 43a, explaining 9.3% of the phenotypic variation. These two QTLs confirm the number and position in the coffee resistance Híbrido de Timor UFV 443-03 *H. vastatrix* is governed by two independent and dominant genes, thus demonstrating the importance of genomics to identify them. It should be noted that the information obtained in this study are unique to coffee, which may be useful in breeding programs based on assisted selection and positional cloning of the gene for rust resistance. So, should provide support for future breeding populations to obtain more productive and resistance.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de café do mundo, com destaque para o Estado de Minas Gerais, que produz 19,6 milhões de sacas de café beneficiado/ano (68,08%) (CONAB, 2009). As duas principais espécies de cafeeiro cultivadas no mundo são *Coffea arabica* L. (café arábica) e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (café robusta) (FAZUOLI, 2006), contribuindo com 73,1% e 26,9% da produção mundial, respectivamente (CONAB, 2009).

Coffea arabica é uma espécie tetraploide, com 90% de autofecundação, enquanto as demais espécies são diploides, autoincompatíveis e de fecundação cruzada (FAZUOLI, 2006). A maior limitação do cafeeiro é a ferrugem, doença causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. 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 VOSSSEN, 2001; SILVA *et al.*, 2006). A forma de controle ideal dessa doença é a obtenção de variedades resistentes, por ser método mais barato e causar menor impacto ao meio ambiente.

Uma das principais fontes de resistência utilizadas nos programas de melhoramento de *C. arabica* visando à obtenção de variedades resistentes a *H. vastatrix* tem sido o Híbrido de Timor (HT). Esse híbrido foi encontrado pela primeira vez em 1912 na Ilha de Timor, em plantações de *C. arabica* cv. Typica (BETTENCOURT, 1973). O HT é resultante do cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*. Por ser tetraplóide, cruza-se facilmente com as cultivares de *C. arabica*, favorecendo, assim, a transferência de sua resistência (CARVALHO *et al.*, 1989). A partir de 1960, várias progênies

resultantes do Híbrido de Timor foram distribuídas para diversos países cafeicultores. Com o intuito de desenvolver variedades resistentes, o Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), juntamente com o Programa Integrado de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (PIPAEMG), implantou em 1972 um valioso banco de germoplasma, único no mundo, com diversos acessos resultantes do Híbrido de Timor (PEREIRA, 1995; CAIXETA *et al.*, 2003). Esse banco tem sido mantido pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) antiga PIPAEMG.

Nos diversos acessos de Híbrido de Timor existentes e disponíveis nos bancos de germoplasma, já foram identificados cinco genes, cujas formas alélicas dominantes que conferem resistência a *H. vastatrix* são (S_H 5, 6, 7, 8, 9) (BETTENCOURT *et al.*, 1992). No entanto, poucos acessos desse híbrido foram estudados. O conhecimento e caracterização da resistência dos acessos de Híbrido de Timor são de grande utilidade para a introgressão e eficiente utilização dos genes de resistência nos programas de melhoramento. Outra estratégia que pode auxiliar no melhoramento é a identificação de marcadores moleculares associados aos genes de resistência. Uma vez detectados, esses marcadores podem ser utilizados para seleção precoce de genótipos resistentes, reduzindo o tempo necessário para o desenvolvimento de grandes populações, e para estimar parâmetros usados na seleção indireta (CAIXETA *et al.*, 2009), além de servirem de fontes para clonagem de genes de resistência.

Com o intuito de dar suporte aos programas de melhoramento do cafeeiro, neste trabalho objetivou-se estudar a herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03, bem como identificar marcadores moleculares ligados aos genes caracterizados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ferrugem do cafeeiro

A principal doença do cafeeiro é a ferrugem, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. A doença foi constatada pela primeira vez no Brasil em 1970, no Estado da Bahia, e disseminou-se rapidamente por todas as regiões cafeeira do País e, em seguida, pelos países produtores de café das Américas do Sul, Central e do Norte (CHAVES *et al.*, 1970; CARDOSO, 1986; CARVALHO, 1988).

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 anos de alta produção apresentam os maiores índices da doença, e as perdas podem chegar a 35-50%, dependendo das condições climáticas (ZAMBOLIM *et al.*, 1999; Van der VOSSSEN, 2001; SILVA *et al.*, 2006).

Os sintomas e sinais da doença são observados 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 uredósporos. A ferrugem pode ocasionar queda prematura de folhas, prejudicando o desenvolvimento das plantas jovens e comprometendo a produção das adultas (MATIELLO *et al.*, 2002; FAZUOLI *et al.*, 2007).

O controle da ferrugem pode ser realizado por medidas químicas e genéticas. O controle químico com uso de fungicidas, além de aumentar os custos de produção, causa impactos ambientais (ZAMBOLIM *et al.*, 1999;

MATIELLO *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2002; ZAMBOLIM *et al.*, 2002; ZAMBOLIM *et al.*, 2005). Assim, a melhor opção de controle da doença é o desenvolvimento de cultivares resistentes, devido ao seu baixo custo, à sua eficiência, à facilidade de sua implantação e aos menores danos ao meio ambiente (BETTENCOURT; Carvalho, 1968; ZAMBOLIM *et al.*, 2003; WALLER *et al.*, 2007). No entanto, o desenvolvimento de cultivares de cafeeiros com resistência durável representa um desafio, devido ao surgimento e alternância de raças do patógeno, assim como a ocorrência de raças complexas que ilustram o potencial evolutivo da população de *H. vastatrix* (CABRAL *et al.*, 2009; MAIA, 2009; VÁRZEA; MARQUES, 2005).

2.2. Genética e melhoramento do cafeeiro

Coffea arabica é uma espécie tetraploide, com 90% de autofecundação, enquanto as demais espécies são diploides, autoincompatíveis e de fecundação cruzada. Há duas exceções, que são as espécies diploides, *C. heterocalyx* e *C. sp. moloundou*, que são espécies autocompatíveis (FAZUOLI, 2006). *Coffea arabica* apresenta limitada variabilidade genética decorrente dos fatores evolutivos da espécie, quais sejam: pequeno número de acessos introduzidos no Brasil e tipo de reprodução autógama, fatores que favorecem a manutenção da uniformidade genética (MALUF *et al.*, 2001). Já as espécies diploides possuem limitações relacionadas aos cruzamentos controlados (PAILLARD *et al.*, 1996).

O melhoramento do cafeeiro é realizado por vários ciclos de autofecundação e, ou, retrocruzamento, dependendo da espécie, o que torna o processo bastante demorado. A manipulação assistida por marcadores moleculares visa tornar mais eficiente a transferência de fatores genéticos (CAIXETA *et al.*, 2009), diminuindo o tempo necessário para a obtenção de linhagens melhoradas.

Marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças facilitam a introgressão desses genes em cultivares comerciais (ALZATE-MARIN *et al.*, 2001), sendo ferramentas úteis para detectar variações no

genoma e, assim, aumentar o poder da análise genética das plantas (CAIXETA *et al.*, 2009). Os marcadores moleculares passaram a representar complementos importantes para os programas de melhoramento, por facilitarem a localização e mapeamento de QTLs e a clonagem de genes com base em mapas genéticos.

2.2.1. Melhoramento para resistência a *Hemileia vastatrix*

O conhecimento das raças fisiológicas e de *H. vastatrix* é fundamental para o melhoramento de plantas visando à resistência a doenças. Até o momento, foram identificadas 45 raças fisiológicas de *H. vastatrix* (VÁRZEA; MARQUES, 2005), sendo a raça II a de maior distribuição nos países cafeicultores, seguida pela raça I (VÁRZEA; MARQUES, 2005).

No Brasil já foram identificadas 15 raças de *H. vastatrix* (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI e XXXVII) (ZAMBOLIM *et al.*, 2005; CABRAL *et al.*, 2009;). A raça XXXVII, com amplo espectro de virulência ($v_{2,5,6,7,9}$), foi identificada recentemente por Cabral *et al.* (2009).

Em cafeeiro, nove genes (S_{H1} , S_{H2} , S_{H3} , S_{H4} , S_{H5} , S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9}) foram identificados conferindo resistência a diversas raças de *H. vastatrix*. Esses genes são dominantes/recessivos, aparentemente independentes (MAYNE, 1936; NORONHA-WAGNER; BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT; NORONHA-WAGNER, 1971; BETTENCOURT *et al.*, 1980; BETTENCOURT; RODRIGUES, 1988).

Em *C. arabica*, quatro genes dominantes S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} , simples ou associados, conferem resistência a algumas raças fisiológicas de *H. vastatrix* (NORONHA-WAGNER; BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT; NORONHA-WAGNER, 1971), enquanto em *C. canephora* estão presentes os genes S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} (BETTENCOURT *et al.*, 1980). Além desses genes, admite-se haver outros ainda não identificados.

Com o intuito de obter variedades resistentes a *H. vastatrix*, vários programas de melhoramento têm sido desenvolvidos nos principais países cafeicultores (CARVALHO; FAZUOLI, 1993). No Brasil, destacam-se os

trabalhos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), do Instituto Agrônomo do Paraná e os desenvolvidos pelo Departamento de Fitopatologia da UFV juntamente com a EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) (Pereira, 1995).

No país, um dos enfoques tem sido dado ao estudo de populações derivadas de Híbrido de Timor, considerado como principal fonte de resistência a pragas e doenças, principalmente à ferrugem do cafeeiro (BETTENCOURT; LOPES, 1976; BETTENCOURT, 1981; PEREIRA, 1995). Esse híbrido foi encontrado pela primeira vez em 1912 na Ilha de Timor, em plantações de *C. arabica* cv. Typica (BETTENCOURT, 1973). O Híbrido de Timor é resultante do cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*. Esse híbrido possui fenótipo de *C. arabica*, é tetraploide, autofértil (RIJO, 1974; CARVALHO *et al.*, 1989) e se cruza facilmente com as cultivares de *C. arabica*, favorecendo, assim, a transferência de sua resistência (CARVALHO *et al.*, 1989).

Acessos derivados de Híbrido de Timor possuem cinco genes dominantes, S_H5, S_H 6, S_H 7, S_H 8 e S_H 9, que condicionam, sozinhos ou associados, os espectros de resistência (BETTENCOURT *et al.*, 1980; BETTENCOURT *et al.*, 1992). Os genes S_H6 a S_H9 são provenientes de *C. canephora*, enquanto o S_H5, de *C. arabica*. Os genes dessas plantas podem ser suplantados, total ou parcialmente, pelas raças de *H. vastatrix* com diferentes combinações de genes de virulência v5, v6, v7, v8 e v9 (BETTENCOURT; RODRIGUES, 1988).

2.3. Herança da resistência

Determinar o número de genes relacionados à resistência, assim como caracterizar sua herança, é essencial para os programas de melhoramento voltados para resistência a doenças.

Estudos de herança de resistência do cafeeiro à ferrugem têm mostrado que a resistência é governada por um ou poucos genes com formas alélicas dominantes e, ou, recessivos, determinando o padrão de resistência. Kukhang *et al.* (1993), trabalhando com uma população F₂

resultante do cruzamento entre S.1934 (portadora do gene S_{H3}) e AB3, observaram a segregação mendeliana clássica 3:1, indicando que a herança da resistência à raça II de *H. vastatrix* era governada por um único gene dominante (S_{H3}). Em outro trabalho, foram avaliadas populações F_2 resultantes de sete combinações de hibridações dos Híbridos de Timor (UFV 445-46, UFV 442-105, UFV 377-1, UFV 334-19, UFV 446-8 e UFV 443-03) com as cultivares Catuaí e Mundo Novo (H 419, H 430, H 447, H 464, H 469, H 484 e H 421), inoculadas com as raças II e XXV de *H. vastatrix* (PEREIRA, 1995). A segregação encontrada foi de 63:1 (três genes dominantes e independentes) em todas as populações, com exceção da H 421; nesta população, observou-se um padrão de segregação para um único gene dominante (3:1).

Diante da complexidade de resistência das populações derivadas do Híbrido de Timor a *H. vastatrix*, outros trabalhos surgiram, com o objetivo de caracterizar a herança da resistência em novas populações.

A herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 427-15 à raça II de *H. vastatrix*, caracterizada como monogênica (CAIXETA *et al.*, 2003), foi confirmada nas populações F_2 , RCr e RCs, resultantes do cruzamento entre 'Catuaí Amarelo' UFV 2143-236 (IAC 30) e Híbrido de Timor UFV 427-15 (BRITO *et al.*, 2010). Dois genes dominantes e um recessivo governando o padrão de resistência a *Hemileia vastatrix* foram verificados por Oliveira *et al.* (2004) em população F_2 resultante do cruzamento entre Híbrido de Timor UFV 440-10 e Catuaí Amarelo UFV 2154-344 inoculada com a raça II desse patógeno.

Entretanto, resultados obtidos com uma população F_2 oriunda do cruzamento entre o Híbrido de Timor UFV 443-03 e a cv. Catuaí Amarelo UFV 2148-57 inoculada com a raça II e o patótipo 001 de *H. vastatrix* revelaram um padrão de segregação esperado para dois genes dominantes e independentes; esse padrão de herança foi confirmado em populações F_2 , RCr e RCs (CAPUCHO *et al.*, 2009).

2.4. Mapeamento genético

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares, potencialmente, no melhoramento de plantas. A localização e mapeamento de QTLs e a clonagem de genes com base em mapas genéticos passaram a representar complementos importantes para os programas de melhoramento (LEE, 1995).

A construção de um mapa de ligação envolve basicamente a aplicação das técnicas de biologia molecular aos conceitos originais de herança genética demonstrados por Mendel. Dois requisitos básicos são necessários para a construção do mapa: a reprodução sexuada com produção de descendência e uma fonte de marcadores moleculares com comportamento mendeliano. As etapas envolvidas incluem desenvolvimento de populações segregantes adequadas, análises moleculares e a utilização de diversas técnicas de análise estatística e computacional para a estimação de ligação e distância entre os marcadores (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Os primeiros mapas genéticos foram baseados em marcadores morfológicos e citológicos. No início da década de 1960, foram descobertos os marcadores bioquímicos (isoenzimas), cuja limitação, relacionada ao baixo número de locos detectados, não permitia boa cobertura do genoma. Com o aparecimento dos marcadores de DNA, a partir da década de 1980 os mapas genéticos de algumas espécies foram amplamente saturados (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Atualmente, com a disponibilidade de marcadores moleculares altamente polimórficos, cuja herança não sofre influência ambiental, aliada aos métodos estatísticos complexos, tem sido possível a construção de mapas de ligação para a maioria das espécies vegetais de interesse agrônomo (GALE *et al.*, 1990).

A construção de um mapa genético de qualidade requer a seleção apropriada da população, de forma que os genitores sejam contrastantes para a característica de interesse. Além disso, deve-se levar em conta a distância genética entre os indivíduos que separam as linhagens a serem

examinadas, uma vez que, quanto mais próximas as espécies, menor o polimorfismo entre elas. Assim, a escolha de linhagens sem ancestral comum, ou mesmo o uso de cruzamentos interespecíficos para espécies de autofecundação, tem sido utilizada para permitir ou otimizar o processo de análise de marcadores (BONIERBALE *et al.*, 1988; TANKSLEY *et al.*, 1988). No entanto, para os marcadores moleculares altamente polimórficos, baseados em sítios de microssatélites, não há a necessidade de cruzamentos distantes para maximizar o polimorfismo, o que torna qualquer cruzamento potencialmente informativo no mapeamento genético (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Outro requisito é a determinação do tipo de população a ser utilizado na análise e mapeamento de QTLs, como F_2 , Retrocruzamento, RILs (*Recombinant Inbred Lines*), entre outros (FERREIRA *et al.*, 1994; NAGATA *et al.*, 2002; ZHUANG *et al.*, 2002), sendo necessário que os locos estejam em desequilíbrio de ligação (TANKSLEY, 1993). Esse desequilíbrio de ligação entre os locos segregantes é atribuído à ligação física entre os locos e originado do desequilíbrio gamético de ligação, decorrente, por sua vez, da redução na frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas ao longo de determinado cromossomo (COELHO, 2000). A informação genética é maximizada com a utilização de populações segregantes do tipo F_2 , obtidas pela autofecundação de indivíduos F_1 . Os indivíduos F_2 apresentam o dobro de informação genética esperada em indivíduos provenientes de retrocruzamento. As populações com sucessivas autofecundações, como as RILs, possuem menor desequilíbrio de ligação em relação ao encontrado nas gerações F_2 , devido à maior probabilidade de recombinação meiótica (BURR; BURR, 1991; TANKSLEY *et al.*, 1993).

A genotipagem dos indivíduos que compõem a população segregante também é mais um requisito básico, devendo ser considerados o tipo de marcador genético, o número de locos que podem ser detectados pelo marcador, o grau de polimorfismo entre acessos e dentro deles e as características de dominância (MALIEPAARD *et al.*, 1997; JOSHI *et al.*, 1999).

O grau de cobertura do genoma e a densidade do mapa a ser construído são funções diretas do número de marcadores, do tamanho

populacional e do número de recombinantes. É importante considerar também o conteúdo informativo dos marcadores de natureza codominante em relação aos marcadores dominantes, além de aspectos como custo, tempo necessário para a realização das avaliações e dificuldades na execução de cada técnica.

Outro ponto importante é a análise estatística da cossegregação do marcador. O esperado é que se obtenha um padrão mendeliano com relação à população e tipo de marcador. No entanto, a ocorrência de distorção da segregação mendeliana pode comprometer as premissas assumidas na análise estatística, afetando o cálculo da distância e a ordem dos marcadores nos grupos de ligação (BENTOLILA *et al.*, 1992; FERREIRA, 1993; FERREIRA *et al.*, 1994). As segregações esperadas quando se utiliza marcador codominante para população F_2 , retrocruzamento e RILs são de 1:2:1, 1:1 e 1:1, respectivamente, enquanto para marcador dominante as proporções são de 3:1, 1:1 e 1:1, respectivamente.

Complicações advindas da poliploidia podem dificultar o mapeamento genético de espécies, devido ao grande número de grupos de ligação e à detecção de locos múltiplos por um único marcador, entre outros fatores (O'DONOUGHUE *et al.*, 1995).

2.5. Mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*)

Uma das aplicações de maior importância dos mapas genéticos é a localização de genes que controlam características de importância econômica, como produção de grãos, altura da planta, teor de proteína e resistência a doenças, entre outras, e que resultam da ação cumulativa de um conjunto de genes. Essas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, e os locos que as controlam são chamados de QTLs, ou seja, locos controladores de características quantitativas (TANKSLEY, 1993). Muitos locos estão envolvidos no controle genético da variação quantitativa de uma característica, denominados poligenes, cuja composição ainda não é bem conhecida. São “genes menores”, de pequeno efeito sobre determinada característica, ao contrário

dos oligogenes, definidos como “genes maiores”, que exercem grande efeito sobre a característica (CRUZ; SCHUSTER, 2008), embora a distinção entre poligenes e oligogenes não seja tão simples (GELDERMANN, 1975).

O mapeamento de QTLs possibilita mensurar o número de locos quantitativos envolvidos na herança complexa, bem como sua localização cromossômica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

As grandes regiões englobadas pelo QTL, a baixa densidade de marcadores e o pequeno número de genitores recombinantes utilizados dificultam a identificação dos genes responsáveis pelo QTL (HANSEN *et al.*, 2008). Uma vez detectados os genes, a seleção dos indivíduos pode ser feita com base na genotipagem do marcador, sem a necessidade de avaliar o fenótipo da característica, por meio da seleção assistida por marcadores (SAM) (SOUZA *et al.*, 2001).

O conhecimento do número e efeitos dos QTLs pode propiciar aos melhoristas o controle genético das características não estudadas, permitindo a elaboração de estratégias de seleção mais eficientes (SCHUSTER; CRUZ, 2004). No entanto, a capacidade de detecção dos QTLs depende de uma série de fatores, como: magnitude do seu efeito sobre a característica, tamanho da população segregante avaliada, frequência de recombinação entre o marcador e o QTL, número de marcadores utilizados no mapeamento e herdabilidade da característica em estudo. Quanto maior o efeito do QTL, o tamanho da população e a herdabilidade da característica e quanto mais próximo o marcador estiver do QTL, mais fácil será sua detecção (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; LANZA *et al.*, 2000).

O mapeamento de QTLs baseia-se em testes de associação entre marcadores moleculares e dados fenotípicos, por meio de vários métodos estatísticos. Para isso, deve-se envolver a fenotipagem e genotipagem para permitir boa precisão na identificação do QTL, uma vez que fatores genéticos e ambientais afetam a expressão final do fenótipo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Entre os testes utilizados para a detecção de QTLs estão os modelos lineares ou o mapeamento por marca simples (regressão linear, análise de variância e razão de verossimilhança), com os quais se analisam, de forma

separada, as diferenças entre os valores fenotípicos médios de cada marcador. Esses métodos têm como vantagem economia de tempo e de recursos na análise dos marcadores. No entanto, há grande dificuldade em detectar um QTL quando a distância entre ele e o marcador é grande. Embora essa análise seja eficiente para a detecção de ligação entre o loco marcador e o QTL, ela é pouco eficiente na determinação de efeitos individuais dos QTLs (TANKSLEY, 1993; LIU, 1998; CRUZ; SCHUSTER, 2008). A alternativa para aumentar o poder de detecção das associações e estimar a posição e efeito dos QTLs foi proposta por Lander e Botstein (1989), por meio do mapeamento por intervalo. Para a utilização desse método, é preciso dispor, antes da análise, de associação com o QTL e do mapa de ligação dos marcadores. O mapeamento por intervalo tem como vantagem a possibilidade de verificação da presença de QTL em várias posições dentro de um intervalo flanqueado por dois marcadores moleculares, utilizando-se a metodologia de análise de regressão e máxima verossimilhança, para estimar a frequência de recombinantes e a magnitude do efeito do QTL no intervalo entre dois marcadores ligados (LYNCH; WALSH, 1998). No entanto, uma desvantagem desse método é que os QTLs fora do intervalo são ignorados (BEARZOTI, 2000).

Outro método é a detecção de QTLs por meio do intervalo composto, que considera os QTLs fora do intervalo em questão por um modelo de regressão linear múltipla. A vantagem é maior resolução no mapeamento, permitindo o uso de dados obtidos em vários ambientes, para se avaliarem os efeitos de QTLs x ambientes (ZENG, 1994).

2.6. 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).

Há, atualmente, grande variedade de marcadores moleculares disponíveis, entre eles os microssatélites e os AFLPs (BRUNELLI *et al.*, 2002).

2.6.1 Marcadores microssatélites (SSR)

Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, que consistem de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*, altamente polimórficos. Essas sequências, denominadas microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), estão distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma. As sequências que flanqueiam essas regiões são conservadas dentro da mesma espécie, permitindo que se construam *primers* que amplifiquem via PCR o mesmo loco em todos os indivíduos da espécie (CAIXETA *et al.*, 2009).

A amplificação do DNA é feita por PCR, utilizando-se *primers* específicos (20 a 30 bases) nas regiões que flanqueiam o SSR. Os marcadores microssatélites são altamente informativos, permitindo detectar o polimorfismo molecular com grande eficácia. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os SSR São marcadores codominantes e multialélicos, o que facilita a sua obtenção mesmo com pouca quantidade de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; McCOUCH *et al.*, 1997). Em função da sua natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia da PCR, esses marcadores têm sido amplamente utilizados em estudos de mapeamento genético (BRUNELLI *et al.*, 2002).

A construção e saturação de mapas de ligação com marcadores codominantes permitem a distinção entre genótipos homozigotos e heterozigotos. Esses marcadores podem ser usados como âncoras para combinar mapas de ligação obtidos em diferentes locais ou com diferentes populações, gerando assim um mapa genético que melhor represente a estrutura e organização dos diferentes grupos de ligação (KIJAS *et al.*, 1997).

2.6.2. Marcadores AFLP

Os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) aliam a especificidade dos sítios de restrição do RFLP às facilidades de amplificação da PCR, apresentando-se como ferramenta útil na caracterização de genomas e no mapeamento genético (VOS *et al.*, 1995). Em espécies com bastante variabilidade, pode-se obter grande número de marcadores com apenas uma combinação de *primers*.

A técnica de AFLP envolve as seguintes etapas: digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, sendo uma de corte raro (sítio de restrição 6 pb) e outra de corte frequente (sítio de restrição com 4 pb); ligação a adaptadores específicos com sequências conhecidas; amplificação seletiva por PCR com oligonucleotídeos específicos (sequência complementar à do adaptador, seguida de sequência específica do sítio de restrição da enzima e de uma extensão de nucleotídeos seletivos na extremidade 3'); e separação dos fragmentos em géis de poliacrilamida desnaturante. As enzimas de restrição comumente utilizadas são *EcoRI* e *MSel*, capazes de clivar o DNA genômico da planta, originando número extremamente elevado de fragmentos. Em razão da baixa concentração, esses fragmentos não podem ser detectados diretamente por eletroforese, sendo necessária a etapa de PCR para amplificação (CAIXETA *et al.*, 2009).

Entre as vantagens do AFLP estão a detecção de maior número de locos 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 (VANECHOUTTE, 1996). As desvantagens incluem o alto custo e a necessidade de DNA de elevada pureza, além de várias etapas envolvidas na obtenção dos resultados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de experimentação e material genético

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (Biocafé), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para o estudo da herança da resistência do cafeeiro a *H. vastatrix* foram utilizadas populações derivadas do cruzamento entre o Híbrido de Timor UFV 443-03 (progenitor resistente) e Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) (progenitor suscetível), obtidas por Pereira (1995). Para se obter a população F₂, a planta F₁, denominada H-511-1, foi autofecundada em condições controladas. Além disso, foi feito o retrocruzamento com o Híbrido de Timor UFV 443-03 e com o Catuaí Amarelo UFV 2148-57, para obtenção dos retrocruzamentos resistente (RCr) e suscetível (RCs), respectivamente.

Para a construção do mapa genético e identificação de marcadores moleculares ligados aos genes/QTLs envolvidos na resistência, utilizaram-se apenas informações da população F₂.

As plantas de todas as populações foram mantidas em viveiro e, posteriormente, transplantadas em campo. Todos os tratamentos culturais recomendados, com exceção do controle da ferrugem, foram realizados.

3.2. Herança da resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de *Hemileia vastatrix*

3.2.1. Análise fenotípica dos cafeeiros

Os uredósporos da raça I, armazenados na micoteca do BioCafé/BIOAGRO/UFV, foram multiplicados de acordo com a metodologia descrita por Capucho *et al.* (2009).

Um total de 448 plantas, sendo 247 correspondentes à população F₂, 114 RCs e 87 RCr, bem como os progenitores e a planta F₁, foram inoculadas com a raça I de *H. vastatrix*, usando-se a estratégia de discos foliares descrita por Eskes (1982).

A inoculação foi realizada utilizando-se 20 µL de suspensão de esporos com viabilidade acima de 30%, na concentração de 2,0 mg mL⁻¹. Foram realizadas três repetições das plantas, que corresponderam a inoculações em épocas diferentes, das populações F₂ e RCs; e duas repetições da RCr. Em cada planta das diferentes populações e em cada repetição, foram usados 16 discos de folhas, de 1,5 cm de diâmetro, que constituíram as unidades amostrais; e quatro discos de cada planta não foram inoculados, servindo como controle. Após a inoculação, os discos foram colocados sobre uma tela de náilon e espuma saturada com água no interior de um gerbox (caixa plástica de 11x11x3 cm) desinfetado, seguindo-se a metodologia descrita por Capucho *et al.* (2009).

A avaliação de resistência/suscetibilidade foi iniciada no momento em que o progenitor suscetível Catuaí Amarelo UFV 2148-57 iniciou a esporulação, em torno dos 25 dias após a inoculação (dpi). A avaliação seguiu a escala de Tamayo *et al.* (1995), que se baseia na ausência ou presença de uredósporos. De acordo com essa escala, são consideradas a resistência, notas 1 a 3; a ausência de sintomas, nota 1; as lesões cloróticas pequenas, nota 2; e as lesões cloróticas grandes sem esporulação, nota 3. A suscetibilidade (notas 4 a 6) é atribuída a lesões cloróticas grandes com poucos uredósporos, ocupando menos de 25% da área da lesão (nota 4), lesões com esporulação ocupando de 25 a 50% da área (nota 5) e lesões

com esporulação ocupando mais de 50% da área com uredósporos (nota 6). No estudo de herança, as plantas que obtiveram notas de 1 a 3 (ausência de esporulação) foram consideradas resistentes e de 4 a 6 (presença de esporulação), suscetíveis.

3.2.2. Análise estatística

A fim de verificar a segregação fenotípica para resistência/suscetibilidade das plantas da população F₂ e RCs, foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2), com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2008a). Para a população F₂ foram testadas as proporções fenotípicas esperadas para um gene (3:1 e 1:3), dois genes (15:1, 13:3, 7:9, 9:7, 3:13 e 1:15) e três genes (63:1, 61:3, 55:9, 37:27, 27:37, 9:55, 3:61, 1:63, 57:7, 51:13, 49:15, 43:21, 25:39 e 19:45), significativos a 5% de probabilidade, conforme Tabela 1. Nas populações de retrocruzamento foram testadas as proporções de 1:1, 3:1 e 7:1, para um, dois e três genes, respectivamente.

3.3. Marcadores moleculares

3.3.1. Extração do DNA

A extração de DNA dos progenitores (Híbrido de Timor UFV 443-03 e Catuaí Amarelo UFV 2148-57), da planta F₁ H 511-1 e das 247 plantas da população F₂ foi realizada por Capucho (2008), utilizando a metodologia descrita por Diniz *et al.* (2005).

A concentração do DNA foi verificada em espectrofotômetro (Smart Spec™ 3000- BioRad) e sua qualidade verificada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e fotodocumentado em Eagle-eye II™ (Stratagene). As amostras de DNA foram diluídas para uma concentração final de 25 ng/μL.

Tabela 1 - Proporções fenotípicas esperadas para um, dois e três genes envolvidos na característica em uma população F₂

N° de genes	Proporção
Um gene dominante	3:1
Um gene recessivo	1:3
Dois genes dominantes	15:1
Um gene dominante e outro recessivo	13:3
Dois genes recessivos	7:9
Dois genes dominantes complementares	9:7
Um gene dominante e outro recessivo complementares	3:13
Dois genes recessivos complementares	1:15
Três genes dominantes	63:1
Dois genes dominantes e um recessivo	61:3
Um gene dominante e dois recessivos	55:9
Três genes recessivos	37:27
Três genes dominantes complementares	27:37
Dois genes dominantes e um recessivo complementares	9:55
Um gene dominante e dois recessivos complementares	3:61
Três genes recessivos complementares	1:63
Um gene dominante independente e dois dominantes complementares	57:7
Um gene dominante independente e um dominante e outro recessivo complementares	51:13
Um gene dominante independente e dois recessivos complementares	49:15
Um gene recessivo independente e dois dominantes complementares	43:21
Um gene recessivo independente e um dominante e outro recessivo complementares	25:39
Um gene recessivo independente e dois recessivos complementares	19:45

3.3.2. Marcadores SSR

Em trabalho preliminar no laboratório, 150 *primers* SSR foram testados nos dois progenitores da população F₂. Dos marcadores polimórficos, 10 foram, neste trabalho, analisados em todos os indivíduos da população F₂.

A reação de PCR foi realizada com 50 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 min, foram realizados 10 ciclos de *touchdown* PCR, a 94 °C por 30 seg, temperatura de anelamento decrescendo 1 °C a cada ciclo (de 66 °C até 57 °C), durante 30 seg, e extensão a 72 °C por 30 seg, seguidos por mais 30 ciclos de desnaturação a 94 °C, anelamento a 57 °C e extensão a 72 °C, com 30 seg cada etapa. A extensão final foi realizada a 72 °C, por 8 min.

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

3.3.3. Marcadores AFLP

A técnica de AFLP foi realizada conforme descrito por Brito *et al.* (2010), com algumas modificações. Os DNAs dos genitores (Híbrido de Timor UFV 443-03 e Catuaí Amarelo UFV 2148-57) e dos indivíduos F₂ resultantes desse cruzamento 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 produto pré-amplificado foi diluído 1:40 em TE pH 8,0 e armazenado a -20 °C. Para a reação de amplificação, foram utilizadas 17 combinações de *primers* seletivos resultantes de *EcoRI* e *MseI* (E-CAG/M-TGC; E-CAT/M-AGT; E-CCT/M-ATA; E-CCC/M-AGC; E-CCC/MAGA; E-CGA/M-ACA; E-CGG/M-ACG; E-CGT/M-TCT; E-CGA/M-TCC; E-CGC/M-ATA; E-CGT/M-ATC; E-CTG/M-AAT; E-CTG/M-TAC; E-CTT/M-TGC; E-CTC/M-AGT; E-CTC/M-AAG; e E-CTT/MTCG). Ao produto amplificado foram adicionados 8 µL de formamida (formamida 98%, EDTA

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.

3.4. Construção do mapa de ligação

O mapa foi construído com base nos dados de genotipagem da população F₂ com os marcadores SSR e AFLP obtidos neste trabalho, bem como os previamente gerados por Capucho (2008). No total foram utilizadas 17 combinações de *primers* AFLP, 31 *primers* SSR, quatro RAPD e um *primer* CARF. Este último amplifica uma região de 400 pb de um potencial gene de resistência a doenças. Esse marcador foi desenvolvido a partir de sequência minerada do Projeto Brasileiro do Genoma Café e corresponde a uma porção do gene de resistência com anotação “gj|24459841|emb|CAC82597.1| disease resistance-like protein” de *C. arabica* (ALVARENGA, 2007).

Os dados foram analisados com o auxílio do programa GQMOL (CRUZ, 2008b), que permite a análise conjunta de marcadores segregando na proporção esperada para dominante (3:1) e codominante (1: 2: 1) numa população F₂. Todos os marcadores foram codificados para serem analisados por meio do programa GQMOL. Assim, aos marcadores dominantes em aproximação (bandas provenientes do progenitor resistente – Híbrido de Timor UFV 443-03) foram atribuídos 4 para a presença e 2 para a ausência da banda. Nos marcadores dominantes em repulsão (provenientes do progenitor suscetível Catuaí UFV 2148-57), as codificações foram 3 e 0 para a presença e ausência da banda, respectivamente. Os marcadores codominantes foram codificados como 1 para o heterozigoto, 0 para bandas provenientes do progenitor resistente e 2 para bandas provenientes do progenitor suscetível.

A segregação em cada marcador foi avaliada por meio do teste qui-quadrado χ^2 ($p = 0,05$, GL 1), usando-se a correção de Bonferroni (nível crítico de significância que reduz a probabilidade de rejeição de uma hipótese verdadeira, ou seja, erro tipo I – rejeitar H₀ quando esta é

verdadeira). As hipóteses de segregação mendeliana foram de 3:1 e 1:2:1, para cada um dos marcadores dominantes e codominantes, respectivamente. Os marcadores que apresentaram distorção de segregação não foram considerados na construção do mapa.

Os grupos de ligação foram formados e ordenados utilizando-se LOD *score* mínimo de 3,0 e máxima recombinação de 40%. As frequências de recombinação estimadas foram convertidas em distância genética (centiMorgans – cM). O LOD igual a 3 significa que a verossimilhança considerando o valor estimado de r é de 1.000 vezes maior do que a verossimilhança considerando ausência de ligação ($r = 0,5$).

3.5. Mapeamento de QTLs associados à resistência do cafeeiro à ferrugem

A identificação de QTLs associados à resistência do cafeeiro a *H. vastatrix*, raça I, foi realizada com o auxílio do programa QMOL (CRUZ, 2008b). Utilizou-se o método de marca simples, por meio da análise de variância, regressão linear e máxima verossimilhança. Visando aumentar o poder de detecção das associações e estimar o efeito e posição dos QTLs, foram realizados, também, análises de mapeamento por intervalo simples associado à análise de regressão e máxima verossimilhança.

Para o mapeamento por marca simples pela ANOVA e regressão linear, foram considerados significativos os marcadores com probabilidade inferior a 1% pelo teste F e para máxima verossimilhança, marcadores com LOD superior a 2,9 e máxima frequência de recombinação de 20 cM.

Para intervalo simples, foram verificados os possíveis QTLs segundo a metodologia descrita por Lander e Botstein (1989). Para a análise de regressão, o coeficiente de determinação do QTL corresponde ao pico de maior significância estatística do QTL, sendo adotado um valor de LOD *score* superior a 3. A posição do possível QTL foi declarada quando os valores de LOD excederam os valores críticos de corte em cada grupo de ligação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Herança da resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de *Hemileia vastatrix*

Os resultados da análise fenotípica indicaram que o Híbrido de Timor UFV 443-03, a planta F₁ e as plantas do RCr foram resistentes à raça I de *H. vastatrix*. As plantas de cafeeiro Catuaí Amarelo UFV 2148-57 foram suscetíveis à raça I de *H. vastatrix* em todas as inoculações. Esses resultados evidenciam a presença de gene(s) dominante(s) envolvido(s) na resistência do cafeeiro à ferrugem. Entre as plantas avaliadas na população F₂, 226 foram resistentes (93%) e 17 suscetíveis (7%). Na população oriunda do RCs, verificaram-se 84 plantas resistentes (73,7%) e 30 suscetíveis (26,3%).

Com base nos dados fenotípicos encontrados na população F₂, foram testadas 22 hipóteses de segregação esperada para um, dois e três genes (Tabela 2). Considerando o nível de significância de 5%, duas proporções foram significativas, sendo uma delas esperada para dois genes dominantes e independentes (15:1; P = 63,09%) e a outra, para três genes, sendo dois dominantes e um recessivo (61:3; P = 8,87%).

Para confirmar a hipótese de segregação na população F₂ de dois ou três genes envolvidos na resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de *H. vastatrix*, utilizou-se a população de retrocruzamento suscetível, a qual segregou na proporção de 3:1 (P = 74,56%) (Tabela 3), segregação esperada para dois e três genes. Esse resultado mostrou que a resistência desse Híbrido de Timor é condicionada por dois genes dominantes independentes ou três genes independentes, sendo dois dominantes e um recessivo.

Com esses dados não foi possível confirmar a presença ou ausência do gene recessivo na resistência genética do Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de *H. vastatrix*, sendo necessária a análise genômica para tal confirmação, o que é comentado mais adiante.

Herança oligogênica também foi detectada nesse mesmo Híbrido de Timor quando inoculado com outras raças de *H. vastatrix*. Capucho *et al.* (2009) encontraram dois genes dominantes e independentes, conferindo a resistência do Híbrido de Timor UFV 443-3 à raça II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix*.

Tabela 2 - Hipóteses de segregação esperadas para um, dois e três genes envolvidos na resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de *H. vastatrix* na população F₂

Proporção testada	Proporção esperada		Proporção observada		χ^2	Probabilidade (%)
	R	S	R	S		
3:1	182	61	226	17	42,01	0,00
1:3	61	182	226	17	599,35	0,00
15:1	228	15	226	17	0,23 ns	63,09
13:3	197	46	226	17	22,04	0,00
7:9	106	137	226	17	239,55	0,00
9:7	137	106	226	17	133,39	0,00
3:13	46	197	226	17	879,47	0,00
1:5	41	202	226	17	1019,56	0,00
63:1	239	4	226	17	46,64	0,00
61:3	232	11	226	17	2,90 ns	8,87
55:9	209	34	226	17	10,04	0,15
37:27	140	103	226	17	123,39	0,00
27:37	103	140	226	17	257,28	0,00
9:55	34	209	226	17	1253,06	0,00
3:61	11	232	226	17	4242,29	0,00
1:63	4	239	226	17	13210,32	0,00
57:7	216	27	226	17	3,87	4,90
51:13	194	49	226	17	26,62	0,00
49:15	186	57	226	17	36,60	0,00
43:21	163	80	226	17	73,46	0,00
25:39	95	148	226	17	297,03	0,00
19:45	72	171	226	17	466,69	0,00

R - resistente; S - suscetível; χ^2 - qui-quadrado; ns - não significativo a 5% de probabilidade.

Em outros acessos de Híbrido de Timor inoculados com outras raças, observou-se que a resistência era governada por um ou três genes dominantes. Pereira (1995), trabalhando com sete acessos de Híbrido de Timor com as raças II e XXV, verificou que em seis deles a herança era governada por três genes dominantes e independentes e em apenas um por um gene dominante. Brito *et al.* (2010) encontraram um gene dominante conferindo a resistência ao Híbrido de Timor UFV427-15 à raça II de *H. vastatrix*.

Tabela 3 - Proporção esperada e observada para dois e três genes responsáveis pela resistência a *H. vastatrix*, nos progenitores, F₁, população F₂, retrocruzamento resistente (RCr) e retrocruzamento suscetível (RCs)

População	Proporção esperada		Proporção observada		χ^2	Probabilidade %
	R	S	R	S		
UFV 443-03	1	0	1	0	-	-
UFV 2148-57	0	1	0	1	-	-
F ₁	1	0	1	0	-	-
RCr ¹	1	0	87	0	0,00	100,00
F ₂	15 ^a	1	226	17	0,04	63,10
RCs ²	3 ^{ab}	1	84	30	0,10	74,56
F ₂	61 ^b	3	226	17	2,90	8,87

¹ Retrocruzamento resistente; ² Retrocruzamento suscetível; ^a proporção esperada para dois genes (15:1, na geração F₂), ^b proporção esperada para três genes (61:3, na geração F₂); ^{ab} proporção esperada para dois e três genes no retrocruzamento suscetível. **R** - plantas resistentes; **S** - Suscetíveis; e χ^2 - qui-quadrado.

4.2. Mapeamento genético visando à localização dos genes associados à resistência a *Hemileia vastatrix*

Como não foi possível afirmar que a resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de *H. vastatrix* é controlada por dois ou três genes (característica oligogênica), optou-se pela estratégia de localização dos genes em mapa genético de ligação para confirmar o número (posição) e identificar marcadores moleculares ligados a esses genes. A mesma população F₂ do estudo de herança foi utilizada na construção do mapa de ligação.

Com as 17 combinações de *primers* AFLP utilizadas foram obtidas 74 bandas polimórficas, com média de 4,35 bandas polimórficas/*primer*. Em outros trabalhos realizados em cafeeiros também foi detectado baixo polimorfismo de marcadores moleculares AFLP. Ky *et al.* (2000) analisaram 30 combinações de AFLP em diferentes espécies de café (*Coffea* sp.), obtendo média de 6,4 bandas polimórficas/*primer*. Pearl *et al.* (2004), utilizando 128 combinações de AFLP, numa população F₂ resultante de Catimor vs. Híbrido Mokka, encontraram 1,34 banda polimórfica/*primer*. Brito *et al.* (2010) detectaram apenas 1,10 banda polimórfica/*primer* em uma população F₂, resultante de Catuaí vs. Híbrido de Timor. Para *C. canephora*, a média de bandas polimórficas/*primer* AFLP encontrada foi de 16,17 (LASHERMES *et al.*, 2001), o que pode ser explicado por sua maior variabilidade genética em comparação com cafeeiros da espécie *C. arabica* estudados neste trabalho.

Baixo nível de polimorfismo também tem sido encontrado em outros marcadores moleculares. Teixeira-Cabral *et al.* (2004), trabalhando com RAPD em uma população de retrocruzamento derivada de Híbrido de Timor, obtiveram 1,18 banda polimórfica/*primer*. Lashermes *et al.* (2001) analisaram 90 *primers* de RAPD em *C. canephora* e encontraram apenas 11 polimorfismos, resultando em uma banda polimórfica/*primer*. Resultado similar foi obtido por Oliveira *et al.* (2007), que encontraram 1,3 banda polimórfica/*primer* RAPD analisada em população de retrocruzamento resultante de Catuaí Amarelo e Híbrido de Timor. Capucho (2008), trabalhando com 286 *primers* SSR, obteve 7,34% de polimorfismo em uma população F₂ resultante do cruzamento entre Catuaí Amarelo UFV 2148-57 e Híbrido de Timor UFV 443-03.

Neste trabalho, além dos marcadores AFLP, foram usados marcadores SSR, RAPD e um marcador *primer* específico desenvolvido por Alvarenga (2007). Os dados de genotipagem dos marcadores RAPD e 21 SSR nas plantas da população de mapeamento foram obtidos por Capucho (2008). Outros 10 marcadores SSR foram genotipados neste trabalho. Obtiveram-se 110 marcadores polimórficos (Tabela 4), dos quais 86 segregaram como dominantes e 24 como codominantes. Dos 86 marcadores dominantes, sete foram SSR, quatro de RAPD, 74 de AFLP e um *primer* específico. Os 24 marcadores codominantes foram SSR.

A segregação dos marcadores de acordo com a proporção esperada para marcador dominante (3:1) e codominante (1:2:1) foi verificada pelo teste do qui-quadrado com o uso da correção de Bonferroni ($P \leq 0,05$) e pode ser visualizada na Tabela 5. Dezesesseis marcadores apresentaram distorção na razão de segregação, sendo 15 marcadores dominantes e um codominante, correspondendo a 14,54% de distorção. Dos marcadores dominantes distorcidos, 12 foram AFLP (16,21% do total de marcadores AFLP analisados), dois SSR e um *primer* específico. Dos dominantes distorcidos, cinco (três AFLP, um SSR e um CARF) correspondem a marcadores em fase de aproximação, ou seja, alelo proveniente do progenitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03, e 10 (nove AFLP e um SSR) em fase de repulsão, isto é, alelo proveniente do progenitor suscetível Catuaí Amarelo UFV 2148-57.

Tabela 4 - Marcadores moleculares que apresentaram polimorfismo nos progenitores (Híbrido de Timor UFV 443-03 e Catuaí Amarelo UFV 2148-57), os quais foram utilizados na população F₂

Primers	N ° marcador	Tamanho (pb)	Tipo de marcador	Primers	N ° marcador	Tamanho (pb)	Tipo de marcador
E-CTC M-AGT	1 a	440	AFLP	E-CTT M-TGC	57 b	1100	AFLP
	2 a	400	AFLP		58 a	1000	AFLP
	3 b	320	AFLP		59 b	600	AFLP
	4 b	300	AFLP		60 a	130	AFLP
	5 a	280	AFLP	E-CCC M-AGA	61 a	220	AFLP
	6 b	230	AFLP		62 a	210	AFLP
	7 a	120	AFLP	E-CGA M-ACA	63 a	420	AFLP
	8 b	60	AFLP		64 a	210	AFLP
9 b	180	AFLP	65 a		140	AFLP	
E-CAT M-AGC	10 a	150	AFLP	E-CGG M-ACG	66 a	295	AFLP
	11 a	80	AFLP		67 b	290	AFLP
E-CGC M-ATA	12 a	145	AFLP		68 b	250	AFLP
	13 b	142	AFLP		69 b	190	AFLP
E-CCT M-ATA	14 a	400	AFLP		70 b	150	AFLP
	15 b	260	AFLP		71 a	115	AFLP
	16 a	210	AFLP	72 b	260	AFLP	
E-CGT M-ATC	17 b	150	AFLP	E-CTC M-AAG	73 b	192	AFLP
	18 b	550	AFLP		74 a	90	AFLP
E-CTG M-AAT	19 a	545	AFLP	EST-SSR023	75 a	207	SSR
	20 a	222	AFLP	EST-SSR067*	76 a	100	SSR
E-CCC M-AGC	21 a	670	AFLP	SSR 45*	77 a	194	SSR
	22 b	380	AFLP	SSR Ca 23*	78 a	259	SSR
	23 a	118	AFLP	OPA 14*	79 a	1300	RAPD
	24 b	113	AFLP	OPA 17*	80 a	860	RAPD
E-CTT M-TCG	25 a	95	AFLP	EST-SSR025*	81 b	108	SSR
	26 b	70	AFLP	SSR 100*	82 b	157	SSR
	27 a	290	AFLP	OPA 1*	83 b	1450	RAPD
	28 b	165	AFLP	OPAB 9*	84 b	1150	RAPD
E-CAG M-TGC	29 b	145	AFLP	SSR70	85 b	167-230	SSR
	30 b	800	AFLP	CARF 005	86 a	400	Específico
	31 b	300	AFLP	EST-SSR 077	87 ab	151	SSR
	32 b	270	AFLP	SSR Ca 018	88 ab	115	SSR
	33 b	115	AFLP	SSR Ca 080	89 ab	250	SSR
	34 a	1100	AFLP	EST-SSR 050	90 ab	129	SSR
E-CGT M-TCT	35 b	1000	AFLP	EST-SSR 009	91 ab	160	SSR
	36 a	300	AFLP	EST-SSR069*	92 ab	101	SSR
	37 b	302	AFLP	EST-SSR107*	93 ab	170	SSR
	38 b	280	AFLP	EST-SSR046*	94 ab	119	SSR
	39 b	260	AFLP	EST-SSR096*	95 ab	152	SSR
E-CGA M-TCC	40 b	1400	AFLP	EST-SSR032*	96 ab	109	SSR
	41 a	1300	AFLP	EST-SSR061*	97 ab	155	SSR
	42 a	1200	AFLP	SSR 16 *	98 ab	140-146	SSR
	43 a	800	AFLP	EST-SSR001*	99 ab	180	SSR
	44 b	780	AFLP	EST-SSR035*	100 ab	139	SSR
	45 b	700	AFLP	EST-SSR074*	101 ab	259	SSR
	46 b	600	AFLP	EST-SSR062*	102 ab	200	SSR
	47 b	300	AFLP	SSR 95 *	103 ab	352	SSR
	48 b	295	AFLP	SSR 18 *	104 ab	132-166	SSR
	49 a	190	AFLP	SSR Ca 52 *	105 ab	129	SSR
E-CTG M-TAC	50 a	180	AFLP	SSR 8 *	106 ab	198	SSR
	51 b	400	AFLP	SSR 30 *	107 ab	220	SSR
	52 a	235	AFLP	EST-SSR 002	108 ab	184	SSR
	53 b	230	AFLP	EST-SSR 006	109 ab	227	SSR
	54 b	214	AFLP	EST-SSR 041	110 ab	176	SSR
	55 a	212	AFLP				
	56 b	210	AFLP				

* Marcadores obtidos por Capucho (2008); a - marcador com presença no Híbrido de Timor UFV 443-03; b - marcador com presença no Catuaí Amarelo UFV 2148-57; e ab - marcador codominante.

Tabela 5 - Teste de segregação mendeliana esperada (3:1 e 1:2:1, $P \leq 0,05$ para nível global segundo Bonferroni) para os marcadores moleculares usados no mapeamento. Nas classes, o marcador dominante em aproximação recebeu o número 4 para presença do alelo do progenitor resistente (Híbrido de Timor UFV 443-03) e 2 para ausência do alelo. Para marcador dominante em repulsão, o número 3 representa a presença do alelo do progenitor suscetível (Catuaí Amarelo UFV 2148-57) e 0 ausência do alelo. Para marcador codominante, 0 significa presença do alelo do progenitor resistente, 1 heterozigoto e 2 presença do alelo do suscetível. O valor 9 significa dado perdido

Marcador	Classes						Hipótese	Qui- quadrado	Probabilidade (%)
	0	1	2	3	4	9			
1a			49		197	1	3: 1	3.388	6.5691ns
2a			49		197	1	3: 1	3.388	6.5691 ns
3b	62			184		1	3: 1	0.005	94.1312ns
4b	67			179		1	3: 1	0.656	41.8037ns
5a			52		194	1	3: 1	1.957	16.1873ns
6b	57			189		1	3: 1	0.439	50.7594ns
7a			61		185	1	3: 1	0.005	94.1312ns
8b	68			178		1	3: 1	0.916	33.853 ns
9b	61			184		2	3: 1	0.001	97.0576ns
10a			46		199	2	3: 1	5.063	2.4448 ns
11a			119		126	2	3: 1	72.6	0.0 *
12a			48		198	1	3: 1	3.951	4.6837 ns
13b	80			166		1	3: 1	7.42	0.645 ns
14a			59		185	3	3: 1	0.087	76.7468ns
15b	65			179		3	3: 1	0.35	55.4268ns
16a			51		193	3	3: 1	2.186	13.9289ns
17b	54			190		3	3: 1	1.071	30.0711ns
18b	47			198		2	3: 1	4.42	3.5512 ns
19a			70		175	2	3: 1	1.667	19.6706ns
20a			63		183	1	3: 1	0.049	82.5199ns
21a			44		200	3	3: 1	6.317	1.1959 ns
22b	64			182		1	3: 1	0.136	71.2795ns
23a			78		168	1	3: 1	5.902	1.512 ns
24b	87			159		1	3: 1	14.098	0.0174 *
25 ^a			54		192	1	3: 1	1.22	26.9456ns
26b	100			146		1	3: 1	32.136	0.0 *
27a			32		213	2	3: 1	18.624	0.0016 *
28b	78			168		1	3: 1	5.902	1.512 ns
29b	80			166		1	3: 1	7.42	0.645 ns
30b	70			176		1	3: 1	1.566	21.0731ns
31b	66			180		1	3: 1	0.439	50.7594ns
32b	76			168		3	3: 1	4.918	2.6578 ns
33b	65			181		1	3: 1	0.266	60.631 ns
34a			53		193	1	3: 1	1.566	21.0731ns
35b	72			174		1	3: 1	2.39	12.2095ns

Continua...

Tabela 5 - Cont.

Marcador	Classes						Hipótese	Qui- quadrado	Probabilidade (%)
	0	1	2	3	4	9			
36a			55		191	1	3: 1	0.916	33.853 ns
37b	159			87		1	3: 1	206.098	0.0 *
38b	57			189		1	3: 1	0.439	50.7594ns
39b	50			196		1	3: 1	2.867	9.0402 ns
40b	26			220		1	3: 1	27.322	0.0 *
41a			38		208	1	3: 1	11.973	0.054 ns
42a			50		196	1	3: 1	2.867	9.0402 ns
43a			62		184	1	3: 1	0.005	94.1312ns
44b	14			232		1	3: 1	48.916	0.0 *
45b	60			186		1	3: 1	0.049	82.5199ns
46b	66			179		2	3: 1	0.491	48.3412ns
47b	87			159		1	3: 1	14.098	0.0174 *
48b	66			180		1	3: 1	0.439	50.7594ns
49a			43		203	1	3: 1	7.42	0.645 ns
50a			56		190	1	3: 1	0.656	41.8037ns
51b	72			173		2	3: 1	2.516	11.2721ns
52a			33		213	1	3: 1	17.61	0.0027 *
53b	71			175		1	3: 1	1.957	16.1873ns
54b	91			155		1	3: 1	18.867	0.0014 *
55a			54		192	1	3: 1	1.22	26.9456ns
56b	59			187		1	3: 1	0.136	71.2795ns
57b	68			176		3	3: 1	1.071	30.0711ns
58a			48		196	3	3: 1	3.694	5.4609 ns
59b	77			169		1	3: 1	5.209	2.2475 ns
60a			73		173	1	3: 1	2.867	9.0402 ns
61a			59		182	6	3: 1	0.035	85.2482ns
62a			35		205	7	3: 1	13.889	0.0194 *
63a			55		187	5	3: 1	0.667	41.4216ns
64a			56		187	4	3: 1	0.495	48.1617ns
65a			39		204	4	3: 1	10.383	0.1272 ns
66a			55		186	6	3: 1	0.61	43.4803ns
67b	49			192		6	3: 1	2.801	9.4216 ns
68b	62			181		4	3: 1	0.034	85.3084ns
69b	57			167		23	3: 1	0.024	87.7371ns
70b	53			191		3	3: 1	1.399	23.6907ns
71a			73		154	20	3: 1	6.204	1.2745 ns
72b	67			98		82	3: 1	21.432	0.0004 *
73b	65			149		33	3: 1	3.296	6.9451 ns
74a			50		167	30	3: 1	0.444	50.5231ns
75a			65		181	1	3: 1	0.266	60.631 ns
76a			59		187	1	3: 1	0.136	71.2795ns

Continua...

Tabela 5 - Cont.

Marcador	Classes						Hipótese	Qui- quadrado	Probabilidade (%)
	0	1	2	3	4	9			
77a			78		167	2	3: 1	6.107	1.3461 ns
78a			172		71	4	3: 1	271.639	0.0 *
79a			53		193	1	3: 1	1.566	21.0731ns
80a			48		195	4	3: 1	3.568	5.8907 ns
81b	60			184		3	3: 1	0.022	88.2466ns
82b	99			146		2	3: 1	31.022	0.0 *
83b	74			168		5	3: 1	4.017	4.5056 ns
84b	62			183		2	3: 1	0.012	91.1889ns
85b	53			189		5	3: 1	1.24	26.5535ns
86a			24		218	5	3: 1	29.361	0.0 *
87 ab	55	121	69			2	1: 2: 1	1.637	44.1151ns
88 ab	67	114	65			1	1: 2: 1	1.35	50.926 ns
89 ab	56	126	64			1	1: 2: 1	0.667	71.6531ns
90 ab	57	147	42			1	1: 2: 1	11.195	0.3707 ns
91 ab	81	122	39			5	1: 2: 1	14.595	0.0677 ns
92 ab	52	128	65			2	1: 2: 1	1.873	39.1905ns
93 ab	82	111	52			2	1: 2: 1	9.506	0.8625 ns
94 ab	66	131	49			1	1: 2: 1	3.39	18.3577ns
95 ab	49	124	72			2	1: 2: 1	4.355	11.3319ns
96 ab	84	128	33			2	1: 2: 1	21.727	0.0019 *
97 ab	68	125	53			1	1: 2: 1	1.894	38.7843ns
98 ab	77	120	46			4	1: 2: 1	7.947	1.8812 ns
99 ab	79	104	63			1	1: 2: 1	7.951	1.8768 ns
100 ab	65	121	60			1	1: 2: 1	0.268	87.4462ns
101 ab	53	130	60			4	1: 2: 1	1.593	45.0996ns
102 ab	48	149	48			2	1: 2: 1	11.465	0.3238 ns
103 ab	49	136	59			3	1: 2: 1	4.033	13.3135ns
104 ab	60	131	47			9	1: 2: 1	3.84	14.6582ns
105 ab	65	133	48			1	1: 2: 1	3.976	13.6996ns
106 ab	54	124	67			2	1: 2: 1	1.416	49.2548ns
107 ab	59	121	63			4	1: 2: 1	0.136	93.4353ns
108 ab	51	129	61			6	1: 2: 1	2.029	36.2575ns
109 ab	36	127	72			12	1: 2: 1	12.566	0.1868 ns
110 ab	52	120	62			13	1: 2: 1	1.009	60.3944ns

* - Significativo para distorção, ou seja, marcadores que apresentaram distorção na segregação esperada; ^{ns} - Não significativo para distorção, ou seja, segregou de acordo com a proporção esperada; a - marcador com presença no Híbrido de Timor UFV 443-03; b - marcador com presença no Catuaí Amarelo UFV 2148-57; e ab - marcador codominante.

Em vários estudos tem sido verificada a distorção na razão de segregação esperada para os marcadores analisados em populações de mapeamento. A percentagem de distorção dos marcadores depende da espécie em estudo e do tipo de população em que se utilizam o mapeamento e o marcador. Para os marcadores RAPD utilizados no mapeamento de cafeeiro, Oliveira *et al.* (2007), Teixeira-Cabral *et al.* (2004) e Paillard *et al.* (1996) verificaram, respectivamente, 24,85%, 5,50% e 20,00% de distorção. Oliveira *et al.* (2007) utilizaram população de retrocruzamento derivada do cruzamento do Híbrido de Timor UFV 445-46 e Catuaí Amarelo IAC 30. Teixeira-Cabral *et al.* (2004) também utilizaram uma população de retrocruzamento derivada de Híbrido de Timor (CIFC 2570) e Mundo Novo IAC 464-18. Paillard *et al.* (1996) fizeram o mapeamento em população F₂ resultante de café robusta. Neste trabalho, não foi observada distorção de segregação nos marcadores RAPD, no entanto apenas quatro marcadores desse tipo foram analisados.

Em trabalhos com AFLP, Ky *et al.* (2000) e Pearl *et al.* (2004) verificaram distorção na ordem de 30% e 25%, respectivamente. O primeiro trabalho foi realizado com diferentes espécies de *Coffea sp.* e, o segundo, com população resultante de *C. arabica* (Híbrido Mokka vs. Catimor). A distorção observada nestes trabalho foi inferior (16,21%) a encontrada nos dois trabalhos citados.

Do total de 31 marcadores SSR utilizados, verificou-se distorção em 3 (9,68%), inferior ao encontrado por Capucho (2008). Esse autor utilizou população F₂ resultante do cruzamento de Híbrido de Timor UFV 443-03 com Catuaí Amarelo UFV 2148-57 e verificou 12% de distorção na razão de segregação esperada para os marcadores SSR.

Segundo Liu (1998) e Yao *et al.* (1999), marcadores com distorção afetam os testes estatísticos e podem gerar falsos-positivos no mapeamento. Xu (2008) demonstrou em seus trabalhos que apenas um loco com distorção pode ser interferido na qualidade do mapa e prejudicar a detecção de QTLs, com efeito de dominância, mas nem sempre pode afetar os QTLs com efeitos aditivos. No entanto, Wang *et al.* (2005) descobriram que em regiões do genoma com intensa distorção de segregação é mais provável não se detectarem QTLs. Yao *et al.* (1999) e Bearzoti (2000)

sugeriram o descarte de locos com distorção para não comprometer a qualidade do mapa. Por isso, neste estudo foram retirados os marcadores com segregação distorcida para a construção do mapa genético de ligação. O mapa foi, portanto, construído com 94 marcadores, sendo 62 AFLP (65,96%), 28 SSR (29,79%) e quatro RAPD (4,25%). Foram formados 11 grupos de ligação (GL), contendo 81 marcadores e cobrindo a distância de 964,31 cM do genoma (Figura 1). Treze marcadores (oito provenientes de AFLP, quatro de SSR e um de RAPD) não se ligaram a nenhum dos GL formados. O mapa construído neste trabalho corresponde ao número básico de cromossomos da espécie de cafeeiro.

A distância entre dois marcadores consecutivos variou de 0 (isto é, dois marcadores que cossegregam completamente ligados) a 32,10 cM. Os tamanhos individuais dos grupos de ligação variaram de 9 (GL 7) a 246,30 (GL 3) cM. A maior parte dos intervalos (68,57%) não excedeu 20 cM. Dentro de cada grupo, a distância média variou de 5,29 cM (GL 5) a 26,83 cM (GL 9). E para todos os grupos de ligação a distância média entre dois marcadores foi de 13,77 cM.

A distância média obtida entre marcadores foi superior à encontrada em outros trabalhos de mapeamento em cafeeiros. Oliveira *et al.* (2007) e Teixeira-Cabral *et al.* (2004) utilizando populações derivadas de Híbrido de Timor, encontraram distância média em torno de 7,5 cM. Já em *C. canephora*, Lashermes *et al.* (2001) e Paillard *et al.* (1996) encontraram distância média entre dois marcadores de 6,5 e 10 cM, respectivamente. Pearl *et al.* (2004), em população resultante de *C. arabica* (Catimor vs. Híbrido Mokka), encontraram o valor de 10,2 cM.

Apesar de a distância média entre marcadores ter sido superior neste trabalho, a maior parte dos intervalos ficou abaixo de 20 cM. Portanto, essa média mais alta foi dada por alguns poucos marcadores que ficaram distanciados acima de 30 cM de outro. Dessa forma, o mapa de ligação construído, apesar de apresentar algumas regiões pouco saturadas, pode ser utilizado para identificação de QTLs. Vinte centimorgans correspondem ao valor de recombinação máximo utilizado na maioria dos modelos estatísticos para mapeamento de QTL.

Por meio de análise de simulação, Bhering e Cruz (2008) verificaram

que o tamanho ótimo de populações de irmãos completos, completamente informativa, é de 200 indivíduos. Em 2008, Good-God, trabalhando com família de meios-irmãos por análise de simulação, concluiu que não são recomendáveis populações com 50 e 100 indivíduos mesmo com alto nível de informatividade e que com 200 indivíduos é possível obter mapas com certa fidelidade desde que o número de alelos segregando na população-base seja igual a 4 ou maior, à semelhança do que ocorre em populações de irmãos-completos para acasalamentos entre genitores completamente informativos. Cruz (2006) concluiu que, em populações F_2 , é inviável a utilização de amostras pequenas, como 50 indivíduos, mesmo com alto nível de saturação, sugerindo que amostras com tamanho mínimo de 100, 150 e 200 indivíduos podem ser utilizadas para recuperação completa do genoma. Em populações RILs, Silva (2005), trabalhando com amostras de tamanhos 100, 154 e 500 indivíduos, concluiu que, quanto maior o tamanho da população, maior a precisão na estimativa de distância entre marcas adjacentes.

Uma vantagem do mapa de ligação obtido neste estudo em relação aos outros publicados para cafeeiros é o número de indivíduos analisados na população (247 plantas de população F_2). Portanto, a análise de populações F_2 com o mínimo de 200 indivíduos pode gerar mapa de ligação genético mais acurado. Além disso, neste trabalho foram usados marcadores SSR que, por serem locos-específicos, podem ser utilizados como âncoras na integração de mapas de cafeeiro. Pode-se observar na Figura 1 que, com exceção dos grupos de ligação 5, 8 e 10, todos os demais possuem marcadores SSR. A integração de mapas tem sido proposta como alternativa para saturação de mapas genéticos.

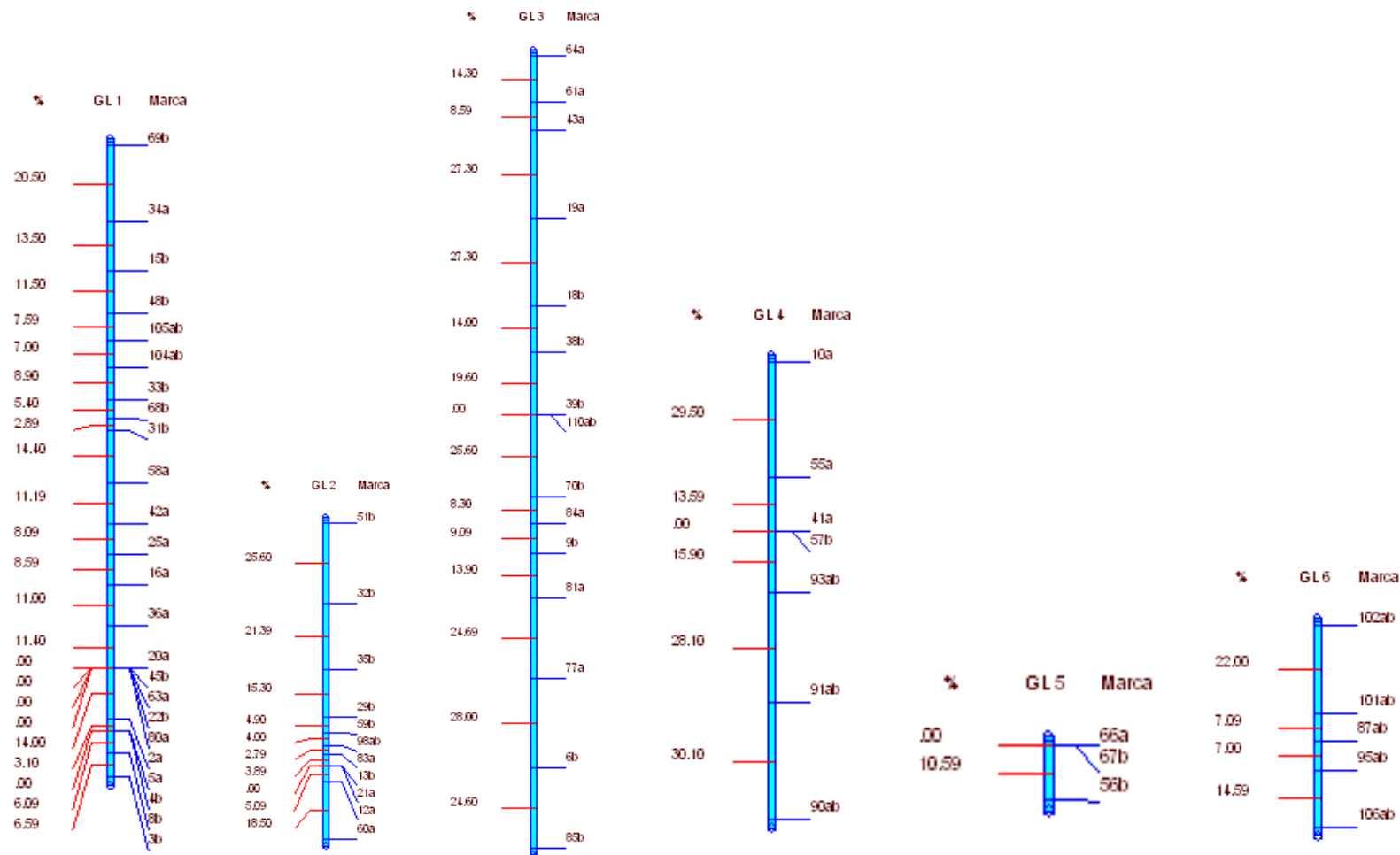


Figura 1 - Mapa de ligação contendo 86 marcadores (dominante e codominante). À direita da barra estão os nomes dos marcadores moleculares, de acordo com a Tabela 4, e à esquerda, as respectivas distâncias em cM.

Continua...

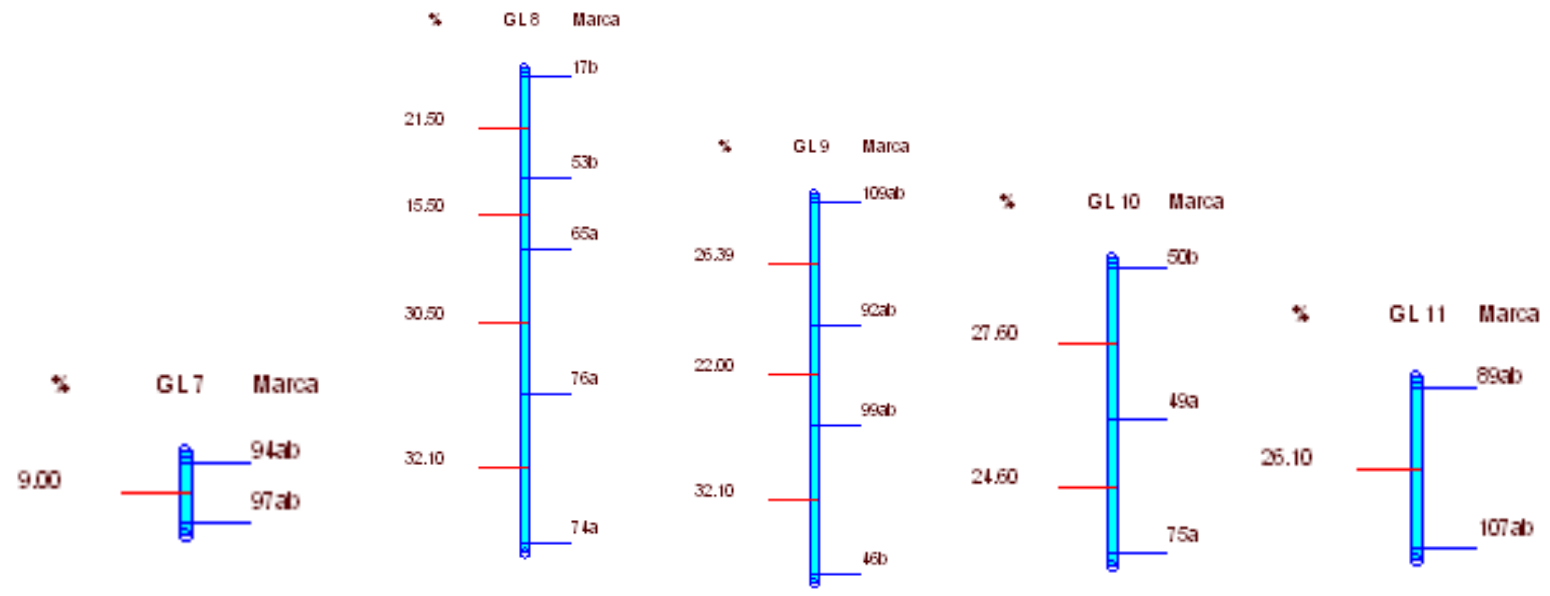


Figura 3 - Cont.

4.3. Mapeamento de QTLs associados à resistência do cafeeiro à ferrugem

Os genes, previamente identificados no estudo de herança e envolvidos na resistência ao cafeeiro, foram tratados como QTLs (*Quantitative Trait loci*), com o objetivo de localizá-los no mapa genético e identificar marcadores a eles ligados. Para isso, foram tomados os dados fenotípicos de cada planta da população F₂, considerando-se a nota média das três repetições de inoculação.

A associação entre os 94 marcadores não distorcidos usados na construção do mapa genético de ligação e os dados fenotípicos foi testada por meio de análises de marca simples. Para a confirmação dos possíveis QTLs associados aos marcadores moleculares, utilizou-se o método de mapeamento por intervalo simples. Essa análise foi efetuada apenas com os marcadores dominantes. A análise conjunta de marcadores dominantes e codominantes não foi possível devido à inexistência de programas estatísticos que realizem essa análise.

4.3.1. Marca simples

Análise de variância (ANOVA)

De acordo com esta análise, foi possível identificar cinco marcadores moleculares (12a, 21a, 43a, 61a e 98ab), com efeito significativo ($P < 0,01$) pelo teste F (Tabela 6), ligados à resistência à ferrugem do cafeeiro. Três desses marcadores estão localizados no grupo de ligação 2 e outros três no grupo de ligação 3.

O maior efeito significativo foi verificado para o marcador 43a, com maior valor de F. Embora seja possível estimar o efeito da associação do marcador ao QTL, esse método é pouco eficiente por não determinar a sua posição em relação ao marcador analisado.

Tabela 6 - Marcadores moleculares associados a QTLs para resistência do cafeeiro à ferrugem, identificados por marca simples por meio da análise de variância ($P < 0,01$)

Marcador	Análise de variância		Grupo de ligação
	F	Prob (F)	
12a	6,78	0,0098**	2
21a	9,27	0,0026**	2
43a	12,40	0,0005**	3
61a	10,16	0,0016**	3
98ab	6,86	0,0013**	2

** Significância pelo teste F, probabilidade ($P < 0,01$); a - marcadores dominantes em fase de aproximação; e ab - marcador codominante.

Diante disso, não se pode afirmar que a maior significância pelo teste F apresentada pelo marcador 43a corresponde, de fato, a um QTL de maior efeito para resistência à ferrugem, podendo ser resultado da proximidade desse marcador a um QTL de menor efeito. Vale salientar que os efeitos dos marcadores tendem a ser sempre menores que o efeito verdadeiro do QTL (BROMAN, 2001).

Os marcadores dominantes identificados associados ao QTL estão em fase de aproximação, indicando, assim, que eles estão associados aos genes de resistência presentes no progenitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03.

Regressão linear

Esta análise mostrou significância para os mesmos marcadores detectados pelo método da ANOVA e maior significância também para o marcador 43a (Tabela 7).

Por meio deste método estatístico foi possível estimar a proporção da variação fenotípica da resistência à ferrugem explicada pelo marcador, que variou de 2,70% (marcador 12a) a 5,415% (marcador 98ab). Esse valor explicado pelo R^2 dessa análise pode ser afetado pela herdabilidade da característica e pela distância do marcador ao QTL.

Tabela 7 - Marcadores moleculares associados a QTLs para resistência do cafeeiro à ferrugem, identificados por marca simples, por meio da análise de regressão ($P < 0,01$)

Marcador	F	Análise de regressão		
		Prob (F)	R ² (%)	Grupo de ligação
12a	6,78	0,0098**	2,7033	2
21a	9,27	0,0026**	3,6902	2
43a	12,40	0,0005**	4,8335	3
61a	10,16	0,0016**	4,0759	3
98ab	6,86	0,0013**	5,415	2

** Significância pelo teste F de probabilidade ($P < 0,01$); R² - coeficiente de determinação; **a**: marcadores dominantes em fase de aproximação; e **ab**: marcador codominante.

Segundo Cruz e Schuster (2008), a probabilidade de encontrar um QTL depende tanto do seu efeito quanto da proximidade em que ele se encontra do marcador. Diante disso, as associações detectadas pelo marcador por essa metodologia podem ser atribuídas a QTLs de grandes efeitos distantes do marcador, ou de pequenos efeitos, porém próximos do marcador.

Portanto, é fundamental a utilização de metodologias que permitam analisar o efeito do marcador molecular com o QTL, pela metodologia da máxima verossimilhança.

Máxima verossimilhança

No método de marca simples usando a máxima verossimilhança, considerou-se valor de LOD acima de 2,9 e máxima recombinação de 20 cM. Os QTLs identificados pela análise de variância e regressão foram também identificados nessa análise (Tabela 8).

O valor 3 para LOD significa que a verossimilhança considerando o valor estimado de r é 1.000 vezes maior do que a verossimilhança considerando a ausência de ligação ($r = 0,5$).

Tabela 8 - Marcadores moleculares associados a QTLs para resistência do cafeeiro à ferrugem identificados por marca simples, por meio da análise de máxima verossimilhança (LOD>2,9)

Marcador	LOD Max	r	Grupo de ligação
12a	2,983	16	2
21a	4,347	14	2
43a	3,099	13	3
61a	2,932	15,5	3
98ab	12,362	13,5	2

r - frequência de recombinação (distância do marcador ao QTL); **LOD** - logaritmo da razão entre a probabilidade de dois locos estarem ligados e a probabilidade de não estarem ligados; **a** - marcadores dominantes em fase de aproximação; e **ab** - marcador codominante.

Quanto maior o valor de LOD, maior a ligação entre o marcador e a característica, e isso é atribuído à probabilidade de existência do QTL com a probabilidade de que nenhum QTL exista em determinada posição no mapa de ligação. Assim, verificaram-se marcadores com valor de LOD variando de 2,932 (marcador 61a) a 12,362 (marcador 98ab). A recombinação associada ao LOD máximo obtida variou de 13 a 15,5 cM, esses valores correspondem à distância entre o marcador e o QTL.

As Figuras 2, 3, 4, 5 e 6 expressam a porcentagem de recombinação entre o marcador e o possível QTL com os valores de LOD correspondentes à associação entre eles. O pico do gráfico mostra a distância do marcador ao QTL. Pode-se verificar que os marcadores 12a, 21a, 43a, 61a e 98ab se encontram a 16, 14, 13, 15,5 e 13,5 cM de distância do QTL, respectivamente.

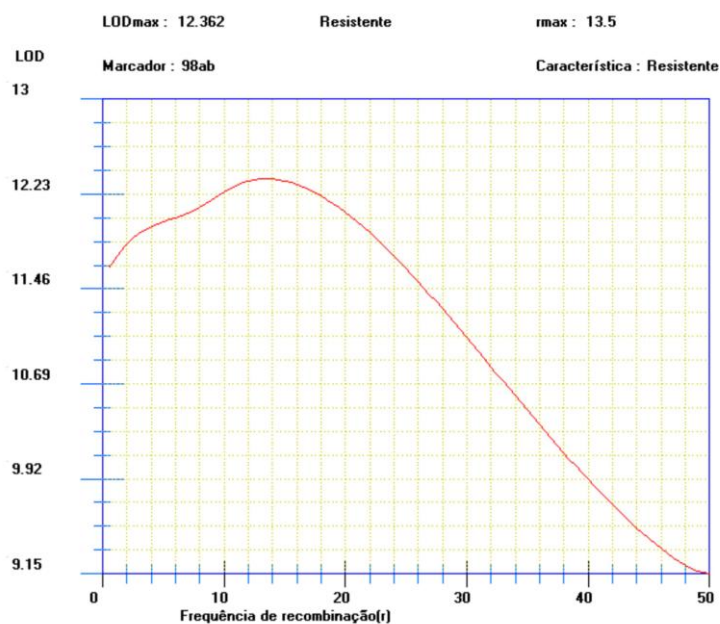


Figura 6 - Marcador 98ab associado ao QTL com distância máxima de 13,5 cM, verificado pelo método da máxima verossimilhança.

Com base nas três metodologias estatísticas (ANOVA, regressão e máxima verossimilhança), identificaram-se, portanto, cinco marcadores moleculares associado à resistência do cafeeiro à ferrugem (Tabela 9), sendo três localizados no GL2 e dois no GL3. Observa-se, pelo mapa genético (Figura 3), que os marcadores identificados em cada GL estão ligados, ou seja, localizados na mesma região do mapa.

Tabela 9 - Resumo das análises por marca simples pelo método da ANOVA, regressão e máxima verossimilhança dos marcadores moleculares associados à resistência do cafeeiro Híbrido de Timor UFV.443-03 à raça I de *H. vastatrix*

Marcador	F	Prob (F)	R ² (%)	LOD máx	r	Grupo de ligação
12a	6,78	0,0098**	2,7033	2,983	16	2
21a	9,27	0,0026**	3,6902	4,347	14	2
43a	12,40	0,0005**	4,8335	3,099	13	3
61a	10,16	0,0016**	4,0759	2,932	15,5	3
98ab	6,86	0,0013**	5,415	12,362	13,5	2

** Significância pelo teste F (P<0,01); R² - coeficiente de determinação; e r – frequência de recombinação.

O marcador 98ab (SSR-16) também foi identificado por Capucho (2008) como associado à resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça II e ao Patótipo 001 de *H. vastatrix*. Esses dados sugerem que um dos genes que conferem a resistência desse Híbrido de Timor à raça II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* pode ser o mesmo ou estar bem próximo (em bloco) ao gene que confere resistência à raça I desse patógeno. Esse marcador pode ser, portanto, eficientemente utilizado em programas de melhoramento baseados em seleção assistida por marcadores para identificar plantas resistentes às três raças de *H. vastatrix*.

4.3.2. Intervalo simples

Visando aumentar o poder de detecção das associações e estimar o efeito e a posição dos QTLs, utilizou-se também a metodologia de mapeamento por intervalo simples.

Para a realização do mapeamento de QTLs por esse método, é preciso dispor antes do mapa de ligação dos marcadores moleculares (CRUZ; SHUSTER, 2008). Como neste estudo só foram utilizados os marcadores dominantes, construiu-se um novo mapa de ligação apenas com esse tipo de marcador (Figura 7).

Método baseado em análise de regressão

Por meio desta metodologia foi possível identificar dois QTLs (Tabela 10), um localizado no grupo de ligação 2 à distância de 0 cM do marcador 21a e o outro no grupo de ligação 3 a 13,01 cM do marcador 43a. Esses dados confirmam a posição de dois QTLs nas duas regiões onde foram detectados QTLs significativos pelo método de marca simples. O QTL encontrado no grupo de ligação 2 explicou 9,6% da variação fenotípica, e o encontrado no grupo de ligação 3 explicou 9,3% dessa variação.

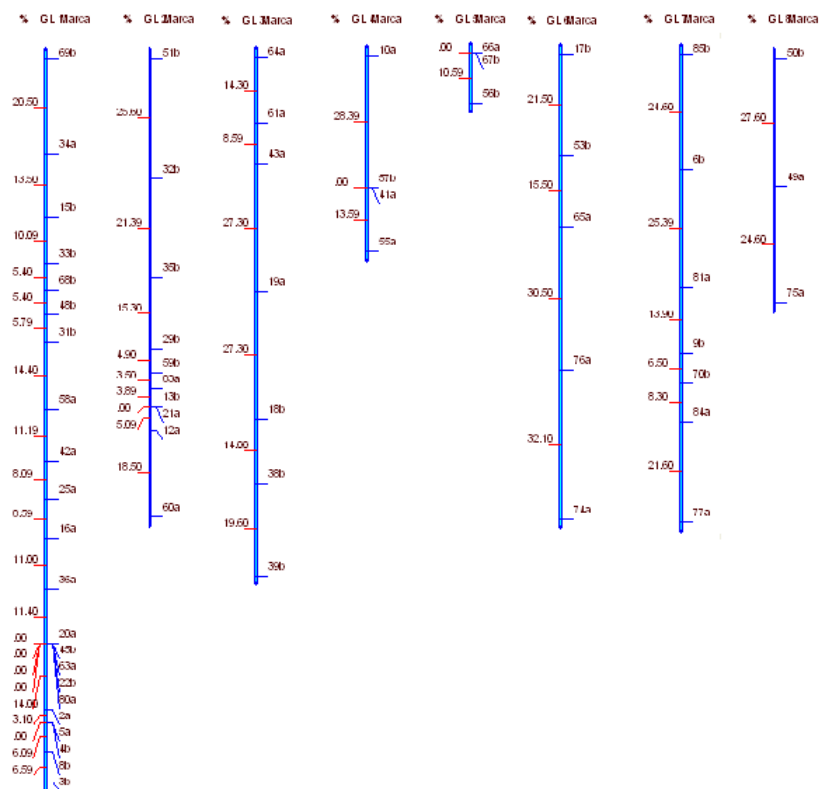


Figura 7 - Mapa de ligação construído com marcadores dominantes, utilizado na identificação de QTLs pelo mapeamento por intervalo simples

Tabela 10 - Marcadores moleculares associados a QTLs para resistência do cafeeiro à ferrugem, identificados por intervalo simples por meio da análise de regressão (LOD>3)

GL	Marcador	Posição cM	LR	LOD	R ²
2	21a	0	25,204	5,472	9,6
3	43a	13,01	24,495	5,318	9,3

GL - grupo de ligação; LR - razão de verossimilhança; LOD - logaritmo da base 10; e R² - coeficiente de determinação da regressão.

Segundo Lander e Botstein (1989), o maior pico apresentado pelo gráfico indica a posição do QTL em cada intervalo significativo. Assim, para a identificação de QTLs pelo Método Baseado em Análise de Regressão, admitiu-se um ponto de corte com valor de LOD superior a 3, verificado pelo maior pico apresentado pelo gráfico da Figura 8. Nessa figura, podem-se observar dois picos apresentados pelo gráfico, sendo considerado apenas o

maior, indicando possível distância do QTL a 0 cM dos marcadores 21a e 13r. Resultado similar a esse foi verificado no marcador 43a (Figura 9), considerando-se também o maior pico, indicando distância a 13,01 cM do QTL.

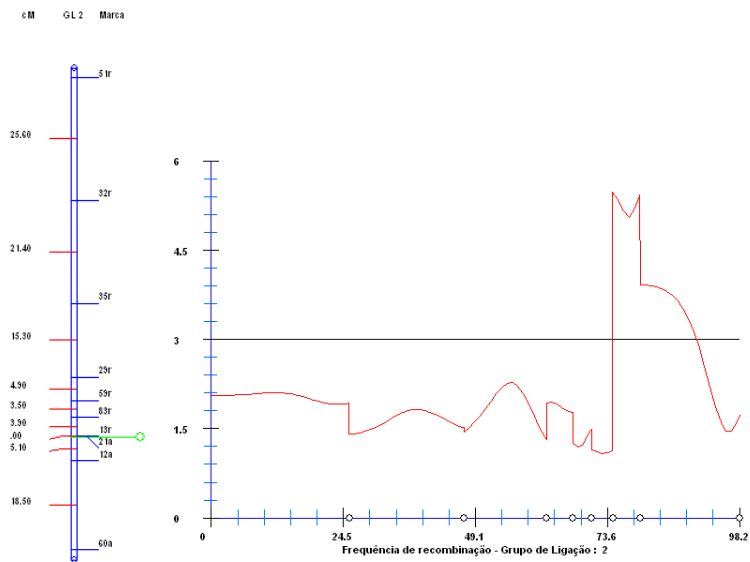


Figura 8 - Figura com dois picos possíveis para identificação de QTLs, no entanto foi considerado o maior pico que indica posição do QTL a 0 cM do marcador 21a.

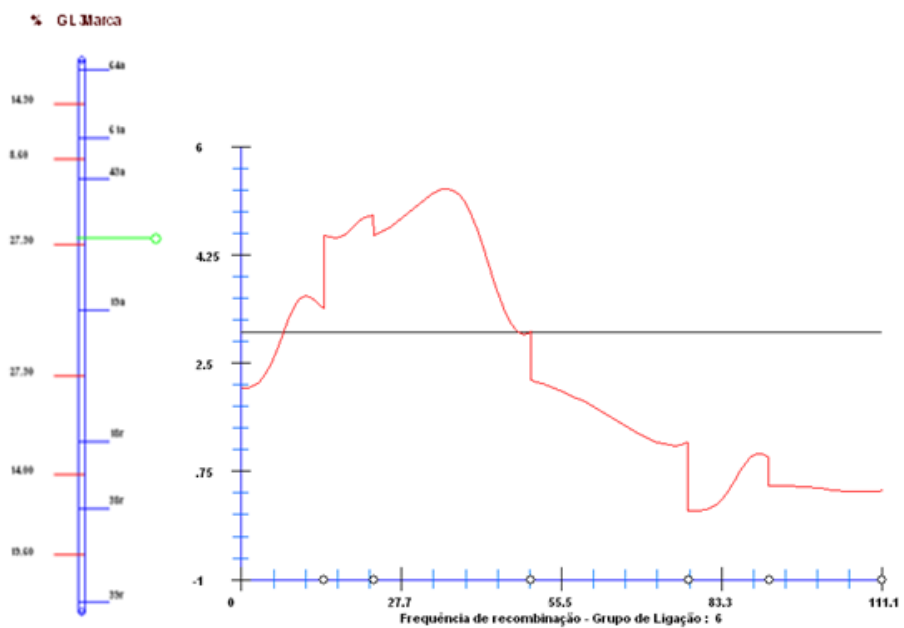


Figura 9 - Figura com dois picos possíveis para identificação de QTLs, em que se considerou o maior, que indica que o QTL está localizado a 13,01 cM do marcador 43a.

Método baseado em máxima verossimilhança

Segundo Cruz e Shuster (2008), a hipótese da presença de um QTL no intervalo é testada pela razão de máxima verossimilhança (LR). Para isso, utilizou-se essa metodologia associada aos valores de LOD para identificar e confirmar os QTLs encontrados na metodologia baseada em análise de regressão. Foi possível identificar um QTL no grupo de ligação 2 (Tabela 11).

Nesse grupo de ligação, foi possível encontrar um QTL a 0 cM dos marcadores 21a e 13r. No grupo de ligação 3, não foi possível identificar o QTL, devido à grande distância entre os marcadores 43a e 19a (acima de 20 cM). Essa região precisa ser mais saturada para que possam ser identificados os marcadores que flanqueiam o QTL por essa metodologia.

Tabela 11 - Marcadores moleculares associados a QTLs para resistência do cafeeiro à ferrugem identificados por intervalo simples, pela análise de máxima verossimilhança (LOD>3)

GL	M1	M2	Posição cM	LR	LOD	gmd	Efeito		d/a
							a	d	
2	21a	13r	0	85,43	18,55	DP	0,264	-0,184	0,696

GL - grupo de ligação; **LR** - razão de verossimilhança; **LOD** - logaritmo da base 10; **gmd**: grau médio de dominância; e DP - dominância parcial.

Pelo método da máxima verossimilhança, foi possível identificar o intervalo correspondente ao QTL localizado no grupo de ligação 2 e seus efeitos. A contribuição dos alelos favoráveis para resistência à ferrugem nesse grupo de ligação foi efetiva. O efeito aditivo (a) foi 0,264, enquanto o de dominância (d), -0,184, indicando que o QTL nesse grupo de ligação tem dominância parcial.

Na Figura 10, pode-se verificar a posição do QTL encontrado no grupo de ligação 2. O maior pico apresentado pelo gráfico dessa figura indica possível posição do marcador 21a a 0 cM do QTL.

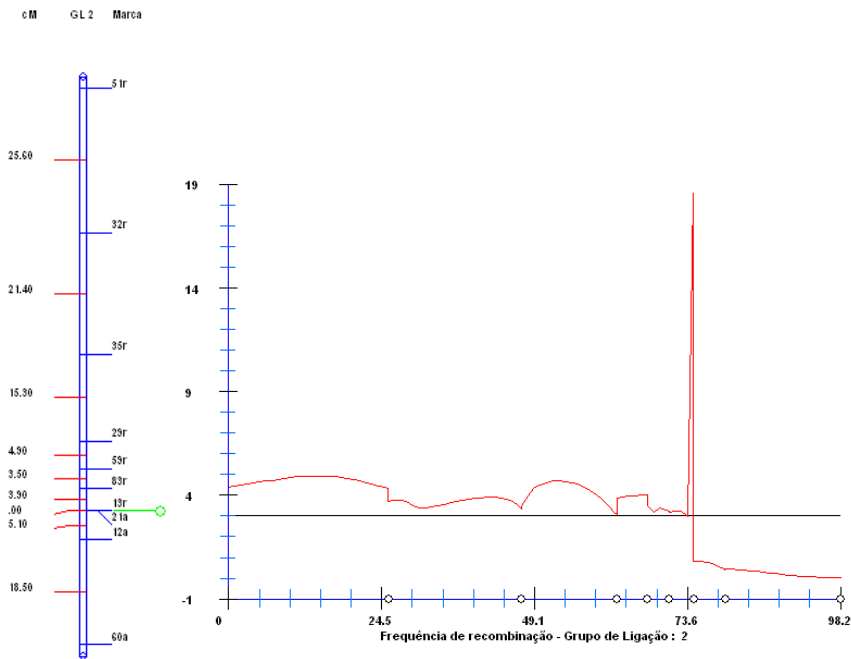


Figura 10 - Figura com picos possíveis para identificação de QTLs, considerando-se o maior, que indica que o QTL está localizado a 0 cM do marcador 21a.

Os dados obtidos por meio de todas as metodologias estatísticas aqui mencionadas permitiram a identificação de dois QTLs associados à resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de *H. vastatrix*. Esses dois QTLs identificados provavelmente confirmam em número e posição que a resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 é governada por dois genes dominantes e independentes, descartando-se a hipótese de três genes (dois dominantes independentes e um recessivo), ou seja, descarta a hipótese da presença do gene recessivo, mostrando, assim, a importância da genômica para a identificação de genes.

Os marcadores associados aos QTLs identificados pelo método da marca simples foram confirmados pelo método de intervalo. No entanto, no método de intervalo o marcador 13r, que não havia sido identificado pela marca simples, foi encontrado associado ao QTL. Esse marcador está em repulsão e, provavelmente, não está associado ao QTL de resistência e, sim, ao seu alelo, mas foi detectado no intervalo por estar no mesmo ou próximo ao loco do marcador 21a (Figura 8).

Cabe salientar que as informações obtidas neste trabalho são inéditas para o cafeeiro, as quais podem ser úteis em programas de melhoramento

baseado em seleção assistida a partir dos marcadores moleculares que flanqueiam os genes/QTLs e para clonagem posicional do gene de resistência à ferrugem. Assim, tais informações deverão fornecer subsídios para futuros trabalhos de melhoramento que visem obter populações mais resistentes e produtivas.

5. CONCLUSÕES

Pelo estudo de herança não foi possível concluir que dois genes dominantes e independentes ou três genes, sendo dois dominantes e um recessivo, conferem resistência ao cafeeiro Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de *H. vastatrix*.

Por meio de diferentes metodologias estatísticas, foi possível detectar dois QTLs associados à resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à raça I de *H. vastatrix*. Um está localizado no grupo de ligação 2 e o outro no grupo de ligação 3 do mapa genético construído. Esses QTLs, provavelmente, correspondem aos dois genes identificados no estudo de herança, descartando-se a hipótese de três genes, ou seja, descarta a presença do gene recessivo conferindo resistência.

Foram detectados cinco marcadores moleculares ligados em aproximação com os dois genes/QTLs caracterizados. No gene/QTL localizado no GL2, foram identificados os marcadores 21 (AFLP E-CTG/M-AAT₆₇₀), 98 (SSR 16₁₄₀) e 12 (AFLP E-CGC/M-ATA₁₄₅), ficando o marcador 21 a 0 cM de distância do gene. O outro gene/QTL, localizado no GL3, está ligado aos marcadores 61 (AFLP E-CCC/M-AGA₂₂₀) e 43 (AFLP E-CGA/M-TCC₈₀₀), de forma que o gene/QTL está localizado a 13,01 cM do marcador 43.

Os marcadores moleculares identificados no trabalho como ligados aos genes/QTLs para resistência à ferrugem podem ser úteis na seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento do cafeeiro. Além disso, eles podem ser utilizados para iniciar o mapeamento de alta resolução nas regiões onde foram detectados os QTLs, visando à futura clonagem desses genes de resistência.

6. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, S. M. **Caracterização de sequências expressas do genoma café potencialmente relacionadas com a resistência a doenças.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

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

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F. (Eds.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas.** Goiânia: FUNAPE, 2000. p. 63-223.

BENTOLILA, S.; HARDY, T.; GUITTON, C.; FREYSSINET, G. Comparative genetic analyses of F2 plants and another culture derived plants of maize. **Genome**, v. 35, p. 575-582, 1992.

BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Tamanho de população ideal para mapeamento genético em famílias de irmãos completos. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 379-385, 2008.

BETTENCOURT, A. J.; LOPES, J.; PALMA, S. Factores genéticos que condicionam a resistência às raças de *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. Dos clones-tipo dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de Híbrido de Timor. **Broteria Genética**, v. 13, n. 80, p. 185-194, 1992.

BETTENCOURT, A. J.; RODRIGUES JR., C. J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R., (Eds.) **Coffee.** London: Elsevier Applied Science, 1988. v.4, p.199-234.

BETTENCOURT, A. J. **Melhoramento genético do cafeeiro: transferência de fatores de resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica***. 1981. 93 f. Tese (Doutorado) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1981.

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

BETTENCOURT, A. J.; LOPES, J. Transferência de fatores de resistência a *Hemileia vastatrix* do Híbrido de Timor para o cultivar Caturra Vermelho de *Coffea arabica*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1976. p. 287-294.

BETTENCOURT, A. J. **Considerações gerais sobre o “Híbrido de Timor”**. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1973. 20 p. (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.

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

BONIERBALE, M. W.; PLAISTED, R. L.; TANKSLEY, S. D. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. **Genetics**, v. 120, p. 1095-1103, 1988.

BURR, B.; BURR, F. A. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. **Trends in Genetics**, v. 7, p. 55-60, 1991.

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.

- BROMAN, K. W. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. **Lab. Animal**, New York, v. 30, n. 7, p. 44-52, 2001.
- BRUNELLI, K. R.; SILVA, H. O.; CAMARGO, L. E. A. Mapeamento de genes de resistência a *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 2134-140, 2002.
- CABRAL, P. G. C.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; LELIS, T. de P.; CAPUCHO, A. S.; CAIXETA, E. T. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian plant disease notes**, v. 4, p. 129-130, 2009.
- CAPUCHO, A. S.; CAIXETA, E. T.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 276-282, 2009.
- CAPUCHO, A. S. **Herança e mapeamento de QTLs da resistência do híbrido de timor à ferrugem do cafeeiro**. 2008. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- CARDOSO, R. M. L. **Novas raças de *Hemileia vastatrix* Berk et Br, no Brasil. Métodos de identificação e detecção de grupos fisiológicos em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor**. 1986. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Viçosa, MG, 1986.
- CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v. 61, p. 89-100, 2002.
- CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C. Café. In: FURLANI, A., M., C.; VIÉGAS, G. P. (Eds.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo**. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, 1993. v. 1, p. 29-76.
- 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.
- CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Eds.). **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1988. v. 4; **Agronomy**, p. 129-165.

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.; SAKIYAMA N. S.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L. Caracterização da resistência genética do Híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro. In: CAGE & SAÚDE (Eds.). SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL E WORKSHOP INTERNACIONAL, 2003, Porto Seguro. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2003. p. 226-447.

CHAVES, G. M.; CRUZ FILHO, J.; CARVALHO, M. G.; MATSUOKA, K.; COELHO, D. J.; SHIMOYA, C. A ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). Revisão de literatura com observações e comentários sobre a enfermidade no Brasil. **Seiva**, Viçosa, MG, v. 30, 1970. 75 p. Edição especial.

COELHO, A. S. G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F. (Eds.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p. 1-36.

CONAB 2009. **Levantamento da produção de café** – Safra 2009/2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 13 maio 2010.

CRUZ, C. D. **Programa QQMOL** – Genética quantitativa e molecular. 2008b. Disponível em: <www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. 568 p.

CRUZ, C. D. **Programa GENES** - Aplicativo computacional em Genética e Estatística Experimental 2008a. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>>.

CRUZ, E. M. **Efeito da saturação e do tamanho de populações F2 e de retrocruzamento sobre a acurácia do mapeamento genético**. 2006. 119 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

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 progênies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 387-393, 2005.

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

FAZUOLI, L. C.; SILVAROLA, M. B.; SALVA, T. J. G. et al. Cultivares de café arábica do IAC: Um patrimônio da cafeicultura brasileira. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 12-15, 2007.

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

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p.

FERREIRA, M. E.; RIMMER, S. R.; WILLIAMS, P. H.; OSBORN, T. C. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled-haploid lines. **Theor. Appl. Genet.**, v. 89, p. 615-621, 1994.

FERREIRA, M. E. **Linkage mapping of molecular markers and loci associated with flower induction and disease resistance in *Brassica napus***. 1993. Tese (Ph. D.) – University of Wisconsin, Madison, WI, USA, 1993.

GALE, M. D.; CHAO, S.; SHARP, P. J. RFLP mapping in wheat-progress and problems. In: GUSTAFSON, J. P. (Ed.). **Gene manipulation in plant improvement**. New York: Plenum Press, 1990. v. 2, p. 353-364.

GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. **Methods. Theor. Appl. Genet.**, v. 46, p. 319-330, 1975.

GOOD-GOD, P. I. V. **Mapeamento genético em famílias de meios-irmãos por simulação computacional**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

HANSEN, B. G.; HALKIER, B. A.; KLIEBENSTEINS, D. J. Identifying the molecular basis of QTLs: e QTLs add a new dimension. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 2, p. 72-77, 2008.

JOSHI, S. P.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Molecular markers in plant genome analysis. **Current Science**, v. 77, n. 2, p. 230-240, 1999.

KIJAS, J. M. H.; THOMAS, M. R.; FOWLER, J. C. S.; ROOSE, M. L. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 701-706, 1997.

KUKHANG, T. D.; MAWARDI, S.; ESKES, A. B. Studies on the inheritance of the S_{H3} resistance factor to coffee leaf rust. In: **Colloque Scientifique International sur Le Café**, ASIC, 1993, Montpellier, França. **Resumos...** Montpellier, 1993. p. 776-778

KY, C. L.; BARRE, P.; LORIEUX, M.; TROUSLOT, P.; AKAFFOU, S.; LOUARN, J.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Inter-specific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp). **Theor. Appl. Gen.**, v. 101, n. 4, p. 669-676, 2000.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Baltimore, v. 121, n. 1, p. 185-199, 1989.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicações de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; PRAKASH, N. S.; TROUSLOT, P.; LORIEUX, M.; CHARRIER, A. Genetic linkage map *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. **Genome**, v. 44, p. 589-596, 2001.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 55, p. 265-344, 1995.

LIU, B. H. **Statistical genomics**. New York: CRC, 1998. 610 p.

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). **Biociência**, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 978 p.

MAIA, T. A. **Análise da estrutura genética da população de *Hemileia vastatrix* com base no marcador AFLP**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

MAYNE, W. W. **Annual report of the coffee scientific officer**. [S.l.]: Mysore Coffee Experimental Station, 1936. 21 p. (Bulletin 14).

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; van OOIJEN, J. W. Linkages analysis in a full-sibs family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. **Genetics Research**, New York, v. 70, p. 237-250, 1997.

MALUF, M. P.; OLIVEIRO, G. F.; FAZUOLI, L. E. Biotecnologia:aporte tecnológico ao melhoramento do cafeeiro no IAC. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, n. 2, 2001.

McCOUCH, S. R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 89-99, 1997.

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.

NAGATA, K.; FUKUTA, Y.; SHIMIZU, H.; YAGI, T.; TERAOKA, T. Quantitative trait loci for sink size and ripening traits in rice (*Oryza sativa* L.). **Breeding Science**, v. 52, p. 259-273, 2002.

NORONHA-WAGNER, M.; BETTENCOURT, A. J. Genetic study of the resistance of *Coffea* sp to leaf rust 1. Identification and behavior of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany**, v. 45, p. 2021-31, 1967.

O'DONOUGHUE, L. S.; KIANIAN, S. F.; RAYAPATI, P. J.; PENNER, G. A.; SORRELLS, M. E.; TANKSLEY, S. D.; PHILLIPS, R. L.; RINES, H. W.; LEE, M.; FEDAK, G.; MOLNAR, S. J.; HOFFMAN, D.; SALAS, C. A.; WU, B.; AUTRIQUE, E.; DEYNZE, V. A molecular linkage map of cultivated oat. **Genome**, v. 38. p. 368-380, 1995.

OLIVEIRA, A. C. B.; SAKIYAMA, N. S.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; RUFINO, R. J. N.; ZAMBOLIM, L. Partial map of *Coffea arabica* L. and recovery of the recurrent parent in backcross progênies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, p 196-203, 2007.

OLIVEIRA, A. C. B.; SAKIYAMA, N. S.; CAIXETA, E. T.; CAPUCHO, A. S.; RUFINO, R. Análise genética da resistência de cafeeiros do Híbrido de Timor à raça II de *Hemileia vastatrix*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 30., 2004, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço, MG, 2004.

PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PÉTIARD, V. Construction of molecular linkage map in coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 41-47, 1996.

PEARL, H. M.; NAGAI, C.; MOORE, P. H.; STEIGER, D. L.; OSGOOD, R. V.; MING, R. Construction of a genetic map for arabica coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 829-835, 2004.

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

RIJO, L. Observações citológicas no cafeeiro Híbrido do Timor. **Portugaliae Acta Biológica**, v. 13, p. 157-168, 1974.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados.** Viçosa, MG: UFV, 2004. 568 p.

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.

SILVA, L. C. **Simulação do tamanho da população e da saturação do genoma para mapeamento genético de RILs.** 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento.** [S.l.]: Fundação MT, 2001. p. 939-965.

TAMAYO, P. J.; VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M.; PEREIRA, A. A. Resistência do Catimor à ferrugem e virulência de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 572-576, 1995.

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 205-233, 1993.

TANKSLEY, S. D.; BERNATZKY, R.; LAPITAN, N. L.; PRINCE, J. P. Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 85, p. 6419-6423, 1998.

TEIXEIRA-CABRAL, T. A.; SAKIYAMA, N.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A.; SHUSTER, I. Single-locus inheritance and partial linkage map of *Coffea arabica* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 416-421, 2004.

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.

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. (Eds.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, MG: DFT/UFV, 2005. p. 53-74.

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.

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

WANG, C.; ZHU, C.; ZHAI, H.; WAN, J. Mapping segregation distortion loci and quantitative trait loci for spikelet sterility in rice (*Oryza sativa* L.). **Genet. Res.**, v. 86, p. 97-106, 2005.

XU, S. Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. **Genetics**, v. 180, p. 2.201-2.208, 2008.

YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 4, p. 657-661, 1999.

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

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Produção Integrada do Cafeeiro: manejo de doenças. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção integrada de café**. Viçosa, MG, 2003. p. 443-508.

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.; 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.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v. 136, n. 4, p. 492-496, 1994.

ZHUANG, J. Y.; FAN, Y.Y.; RAO, Z. M.; WU, J. L.; XIA, Y.W.; ZHENG, K. L. Analysis on additive effects and additiveby-additive epistatic effects of QTLs for yield traits in a recombinant inbred line population of rice. **Theor. Appl. Genet.**, v. 105, n. 8, p. 1.137-1.145, 2002.