

MARCADORES SCARS PARA O GENE DE RESISTÊNCIA A *H. vastatrix* RAÇA IIb SÃO POSICIONADOS SIMULTANEAMENTE DENTRO DE UM ÚNICO CLONE BAC

Valdir Diola²; Eveline Teixeira Caixeta³; Eunize Maciel Zambolin⁴; Ney Susumo Sakiyama⁴; Luiz Felipe Protasio Pereira⁵; Marcelo Ehlers Loureiro⁶

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

²Doutorando, D.Sc., Lab. Fisiologia Molecular de Plantas/CBBII/UFV, valdirdiola@vicoso.ufv.br

³Pesquisadora, D.Sc., Lab. Biotecnologia do Café/BIOAGRO/UFV – EMBRAPA eveline.caixeta@embrapa.br

⁴Pesquisador(a), DSc, Lab. Biotecnologia do Café/BIOAGRO/UFV eunize@ufv.br, sakiyama@ufv.br

⁵Pesquisador, DSc, Lab. Biotecnologia/IAPAR lpereira@iapar.br

⁶Pesquisador, DSc., Lab. Biotecnologia do Café/BIOAGRO/UF, mehlers@ufv.br

RESUMO: O alto custo e inviabilidade econômica do controle químico da ferrugem alaranjada, uma das doenças que mais causa prejuízos econômicos aos cafeicultores, resulta na procura por uma resistência durável como a melhor alternativa para contornar este sério problema econômico da cafeicultura brasileira. Neste trabalho, avaliamos uma população de 224 genótipos segregantes de um cruzamento entre o Híbrido de Timor com Catuai Amarelo (IAC 30), contendo apenas um gene de resistência a raça II-b de *H. vastatrix*. A partir do mapa genético de marcadores AFLP foi construído um mapa de alta resolução com 6 marcadores SCARs delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM e flanqueando bilateralmente o gene de resistência a 0,7 e 0,9 cM. Com os mesmo marcadores identificamos dois clones BAC sobrepostos, contendo ambos os dois marcadores SCARs que flanqueiam o gene, delimitando o mesmo a uma região cromossômica clonada de 130 Kb. Também construímos o contig parcial ordenando 5 clones BAC posicionados por 4 marcadores SCAR com duplos insertos. Estes resultados tornam possível agora, em curto prazo, a clonagem posicional do primeiro gene de resistência do café a ferrugem do cafeeiro.

Palavras-chave: Gene R, mapeamento genético, contig, ferrugem do cafeeiro

SCAR MARKERS FOR GENE OF RESISTANCE TO *H. vastatrix* RAÇA IIb ARE POSITIONED INSIDE A SINGLE BAC CLONE

ABSTRACT: The high cost of fungicides to control coffee rust, the more important disease of this crop, makes the chemical control non viable economically, being plant resistance the major alternative to solve this important economic problem. In this work, we evaluated a population of 224 segregant genotypes from a cross between a Híbrido de Timor clone, a resistant genotype with a single dominant resistance gene to race II-b, with a susceptible Catuai Amarelo (IAC 30). Starting from the genetic map of AFLP markers, a high resolution map was built with 6 SCARs markers delimiting a chromosomal region of 9,45 cM with flanking markers, far about 0.7 and 0.9 cM of the resistance gene. These two markers were physically mapped to two similar BAC clones, restricting the localization of this gene to an 130 Kg genomic region cloned. We also built the partial contig by ordering 5 BAC clones with the others four SCAR markers. This results make possible now, at short term, the positional cloning of the first coffee resistance gene to coffee leaf rust.

Key words: R gene, genetic mapping, contig, coffee rust

INTRODUÇÃO

Estudos clássicos de genética mostraram que a resistência a ferrugem do cafeeiro parece ser determinada por pelo menos nove genes, chamados de S_{H1} a S_{H9} , isoladamente ou em combinação (Bettencourt & Rodrigues 1988). No entanto, poucas pesquisas moleculares sobre estes genes são disponíveis. Num estudo preliminar feito por Caixeta (2003), e por Brito (2007), foi identificada uma fonte de resistência em Híbrido de Timor a um variante da raça II de *H. vastatrix*, determinada por um único gene ainda desconhecido. Sabe-se que as cultivares de *C. arábica*, naturalmente são resistentes a raça II (Bettencourt e Rodrigues, 1988), mas a raça patogênica II-b consegue infectar e completar o ciclo reprodutivo sobre estas plantas. Entretanto, esta raça variante não consegue infectar genótipos de Híbrido de Timor e alguns de seus derivados (Caixeta et al., 2003). A presença de um genótipo, contendo um único gene que ainda consegue conferir resistência a principal raça de ferrugem presente no Brasil, torna abre a possibilidade da clonagem posicional do primeiro gene de resistência a ferrugem do café, o que poderá dar grande contribuição para a elucidação dos processos moleculares da resposta de resistência a *H. vastatrix* em plantas de café, bem como auxiliar na clonagem de outros genes de resistência e permitir, no futuro, uma piramidação destes genes de forma a obter uma resistência mais durável a esta doença.

Longos e exaustivos estudos produziram informações sobre genes de resistência a ferrugem do cafeeiro e uma história longa de sucessos iniciais seguidos por decepções freqüentemente são relatados (Van der Vossen, 2001; Prakash et al. 2004), devido ao surgimento de novas raças virulentas. Fungos biotróficos como *H. vastatrix*, possuem grande variabilidade fenotípica, e atualmente já foram identificadas cerca de 45 raças fisiológicas (Várzea et al., 2002). No Brasil, 13 raças já foram confirmadas, sendo a raça II a predominante em cultivos comerciais. As principais cultivares plantadas, em nível mundial, possuem o fator S_H5 de resistência à ferrugem, mas não de seus novos variantes (Caixeta et al., 2003). A identificação molecular destes fatores de resistência é uma tarefa necessária, mesmo que demande muito tempo e acúmulo de conhecimento, mas gera informações úteis e para aplicação imediata em métodos de melhoramento.

Embora a resistência a ferrugem tenha sido amplamente estudada e documentada, a elaboração de estratégias que envolvam o uso de marcadores moleculares é limitada (Herrera et al., 2009). O emprego das técnicas moleculares e o desenvolvimento de tecnologias eficientes aumentam a velocidade de identificação e isolamento de genes de plantas (Tanksley et al., 1989). Dois estudos voltados a identificação do loco dos genes S_H tem sido elaborado nos últimos anos. O loco S_H3 derivado de introgressão de *C. liberica* em *C. arabica*. foi identificado por Prakash et al. (2004), e estudado por Mahé et al. (2008). Brito (2007), identificou três marcadores AFLP ligados ao mesmo gene do presente estudo, numa população derivada dos mesmos genitores, sendo possivelmente o gene de resistência, herdado do Híbrido de Timor. Esta pesquisa teve sequência e obteve um mapa genético de alta resolução com marcadores AFLP (Loureiro et al., 2008). Mapas genéticos de alta densidade que incluem marcadores de DNA são úteis para análises genômicas (Altshuler et al., 2008), como para identificar o genes de interesse e seus componentes não transcritos.

O presente estudo obteve os marcadores secundários a partir do mapa genético de AFLP, aumentou a aproximação destes, identificou e isolou clones da biblioteca de BAC. Teve como objetivo gerar informações para uso imediato em programas de melhoramento assistido por marcadores moleculares e auxiliar a clonagem posicional do gene de resistência.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material genético e origem dos SCARs

Foi realizada a extração DNA genômico de folhas através do método CTAB (Murray e Thompson, 1980), dos mesmos genótipos da população do mapeamento AFLP (Loureiro et al., 2008). A população compreendeu 224 plantas de geração F_2 derivada de autofecundação de F_1 UFV 421-4 (Híbrido de Timor UFV 427-15 (CIFC 1343-136) genitor resistente X Catuaí Amarelo UFV 2143-236 (IAC 30) suscetível), e encontrava-se implantada no banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG - Brasil). A população de mapeamento UFV 421-4 com segregação de 3 resistentes para 1 suscetível (Caixeta et al., 2003; Brito, 2007; Loureiro et al., 2008), foi usada para o mapeamento dos SCARs. A partir do mapa genético saturado com 25 marcadores de AFLP, foram escolhidos somente os seis mais próximos do gene, que foram transformados em SCARs na seguinte ordem do mapa AFLP: AFLP M18 - 4,7 cM - AFLP M23 -3,7 cM -AFLP M19 - 2,0 cM - Gene R - 2,0 cM - AFLP M20 -3.4- AFLP M1 - 4,9cM - AFLP M24 (Loureiro et al, 2008).

Clonagem e sequenciamento do fragmento polimórfico

Os marcadores foram clonados através da recuperação do fragmento polimórfico do gel de poliácridamida usando um protocolo proposto por Caetano-Anollés e Trigiano (1996), modificado por Sambrook e Russell (2006). Após foi realizada uma PCR usando 5 μ L da solução recuperada para cada conjunto de oligos específicos que deram origem do fragmento amplificado. A PCR foi feita com 32 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 60 s e um ciclo final de 72 °C por 5 min. O volume final da reação foi de 40 μ L, usando, além da suspensão da matriz gélica e os demais reagentes; tampão de reação de PCR 1x, 1,25 mM de $MgCl_2$, 0,15 mM de cada dNTP (*Promega*), 25 ng de cada oligo específico e 2,0 U Taq DNA polimerase (*Phoentria*). O fragmento foi purificado em gel de agarose (1%) e recuperado utilizando o Kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (*GE Healthcare*) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de ligação do fragmento foi feita em vetor de clonagem pGEM®-T (*Promega*) de acordo com as recomendações do fabricante, por um período de 12 horas a 4 °C. A transformação foi realizada com células ultracompetentes *DH5 α* preparadas com o protocolo proposto por Inoue et al. (1990), por meio de choque térmico a 42 °C por 50 seg. A recuperação do DNA plasmidial foi realizada através do método de lise alcalina proposto por Birnboim e Doly (1979). O sequenciamento foi realizado em aparelho sequenciador MegaBACE™ 1000 (*Amersham-Biosciences*) no Laboratório de Genômica do Bioagro, na Universidade Federal de Viçosa em Viçosa-MG utilizando os oligonucleotídeos M13 direto e reverso.

Validação e Análise dos SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions)

Com auxílio do software Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) foi desenhado os seis pares de oligos (Tabela 1). A validação dos SCARs na população de mapeamento foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Param e Micheltore (1993). A amplificação dos SCARs foi realizada usando uma estratégia *touchdown* parcial de 4 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C (-2 °C a cada ciclo) por 30 s e 72 °C por 60 s, seguido de 28

ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 60 s, em um volume final de 20 µL, utilizando 2,0 µL de DNA genômico (100 ng.µL⁻¹), e os demais reagentes: tampão de reação de PCR 1x, 1,25 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (*Promega*), 7 ng de cada oligo (*Bioneer*) e 1,5 U Taq DNA polimerase (*Phonetrria*). O produto destas reações em multiplex (Figura 1) foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% sob 1800 V durante 2,5 h. A revelação empregou o método de coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata (Creste et al., 2001), adaptado por Brito (2007). Após a revelação e a completa secagem do gel, foi realizada a análise visual do polimorfismo, confirmando por densitometria digital pelo software McdiTM - Gel & Blot Analysis System (<http://www.mcid.co.uk/>) considerando intensidade >10 (valores em pixels).

A segregação Mendeliana dos marcadores na população *F*₂ foi testada pela análise do χ^2 para dominância (3:1), usando a planilha do Excel preparada para o “MapDisto Versão 1.7 beta” (<http://mapdisto.free.fr>) (Lorieux, 2007). O mesmo programa foi usado para analisar o grupo de ligação considerando a taxa máxima de recombinação entre o gene e o marcador 30% (r max 0,3) e LOD score mínimo 5,0 (LODmin 5). As frequências de recombinação foi convertida em distâncias centiMorgans (cM) pelo método clássico e a função de mapeamento Kosambi com o método II de seriação e ordenação dos loci por Bootstrap, usando o critério SARF (sum of adjacent recombination fractions) com os dados normalizados pelos LODs.

Isolamento dos clones da biblioteca de BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

A biblioteca de BAC de 56.832 clones contendo fragmentos de DNA genômico de *C. arabica* (HT 421-3) foi replicada a partir da biblioteca de BAC do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR (Londrina-PR). Foram utilizadas 148 placas de 384 poços (*Corning*), cultivando os clones em 80 µL de cada poço com meio BAC enriquecido baseado nas recomendações de Qatibi (1991). As placas foram inoculadas e crescidas por 18 a 22 horas a 37 °C, em seguida, armazenadas a -80 °C. O cultivo dos midipreps (10 mL de meio) ocorreu sob temperatura de 37° C por 18 horas. A extração dos plasmídeos pCC1 BAC Copy Control Hind III (*Epicentrics Byosistems*) foi realizada através do método de lise alcalina (Birnboim e Doly, 1979).

O screening da biblioteca de BAC foi realizado por PCR adaptando o protocolo ao método descrito por Zhu (2002). O programa de PCR e as concentrações de reagentes foram as mesmas da validação dos SCARs, exceto o DNA plasmidial que foi ajustado de acordo com o número de clones no pool de reação. Os oligos utilizados foram os mesmos do mapeamento SCAR em reação mutiplex na primeira etapa em pares individuais nas demais etapas.

O produto da reação de PCR analisado em gel de agarose a 1%, e depois em gel de poliacrilamida a 6%.

A identificação dos clones positivos se baseou na redução de pool de clones:

1ª etapa – pool de meia placa e reação multiplex= 192 clones;

2ª etapa – divisão da meia placa positiva em quatro partes com primers específicos= 48 clones em cada pool;

3ª etapa – pool de 48 clones em 6 colunas verticais na placa, com primers específicos = 8 clones por pool; e,

4ª etapa – isolamento de individual do plasmídeo com primers específicos = 1 clone cada reação.

A primeira etapa foi composta por duas repetições, mais uma repetição para as meias placas com clones positivos. Para as demais etapas, apenas foi feito o rastreamento do clone (uma vez) e uma repetição do pool de amplificação positiva para confirmação.

RESULTADOS

Geração do mapa genético de alta resolução

Foram obtidas as seis sequências dos marcadores AFLP, as quais deram origem aos os *oligos* para os marcadores SCARs (Tabela 1). Foi realizada a validação dos *oligos* SCARs inicialmente nos genitores e nos genótipos dos bulks (Figura 1) e em seguida na população *F*₂ UFV 421-4n.

Tabela 1 Relação dos oligos SCARs obtidos do seqüenciamento dos marcadores mais próximos e flanqueando o loco de resistência.

Marcador AFLP	Tamanho do amplicon (pb)	Oligo Sense Sequência 5'→3'	Oligo reverso Sequência 5'→3'
M 1 EGTA/ETGA	533	CTTGCGGATCTTATCATAAC	TGCTCGACAATTTTCAGCCG
M18 ETGT/EGGG	298	CATCGCCAGGTTTCGTCAC	ATCTTCAATCGGACACAGTG
M19 ETCA/EATG	459	CTCAAAGACAAGTGGTCTCG	CGTTGGTTGCGATGCGAC
M20 ETCA/EAGA	208	GAATACGCGCTACACTATG	CTCTTTTCTATGACGCTCG
M23 ETGT/EACA	264	CAACACTGGTTCGGAGAC	ACTACTGACTTACACCAGG
M24 ETGC/EACA	437	CTCTTTCCGGCTATCAATCC	GTTTCATCTCGACTTCAGCC

Como as reações foram realizadas em PCR utilizando multiplex de oligos, foi necessário o uso de gel de poliacrilamida para melhorar a resolução. Para validar as reações de PCR foi usado o oligo do exon 2 da α -Tubulina para obter o amplicon constitutivo (Figura 1).

A partir dos dados gerados da amplificação em reação de PCR multiplex foi obtido o mapa dos marcadores SCARs, cujo qual, apresenta-se com melhor precisão de informação, reduzindo as distâncias genéticas entre o gene de

resistência em relação ao mapa genético dos marcadores AFLPs. Os algoritmos de mapeamento utilizados foram os mesmos do mapa genético de AFLP e os marcadores SCARs mantiveram o mesmo ordenamento (Figura 2).

Houve uma redução significativa para as distâncias genéticas que compreende a região representada por estes seis marcadores, de 20,6 cM dos marcadores AFLP para 9,45 cM dos SCARs. Os marcadores que flanqueavam o gene delimitavam uma região de 4,0 cM, passou a ser de apenas 1,6 cM (Figura 2). Esta diminuição da distância genética, pode ser devido a redução do tamanho do fragmento do amplicon, que possibilitou identificar genótipos polimórficos positivos para os marcadores anteriormente não detectados pelas técnicas de AFLP e o aumento da especificidade do anelamento do oligo SCAR em relação ao oligo AFLP, o qual apresentava apenas três bases seletivas ou menos.

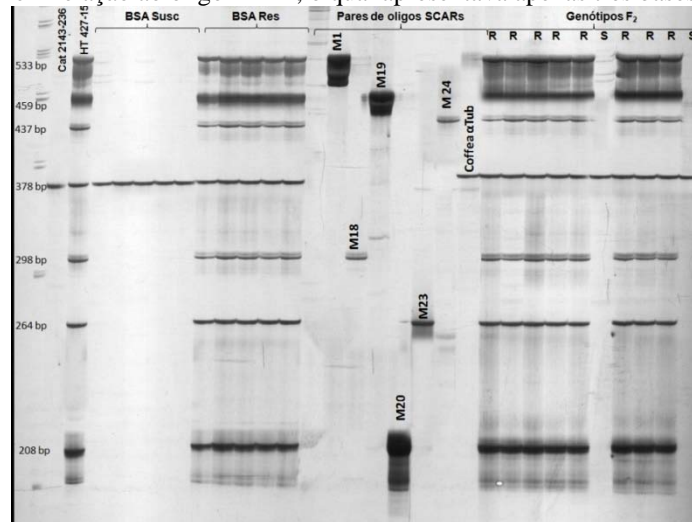


Figura 1 Validação dos marcadores SCARs em reação multiplex. Na figura aparece da esquerda para a direita: o genitor suscetível, seguido do genitor resistente, BSA suscetível (genótipos UFV 421-4-:13,65; 75;201 e 220) e BSA resistente (genótipos UFV 421-4-: 16, 28, 64, 222 e 300). Segue-se a validação da determinação das bandas aos tamanhos relativos dos amplicons correspondentes (reações com pares de oligos simples), do oligo constitutivo do exon 2 da α -Tubulina de café (378 bp), e exemplo da segregação aos demais genótipos da população UFV 421-4-n, caracterizados em suscetíveis (S) e resistentes (R).

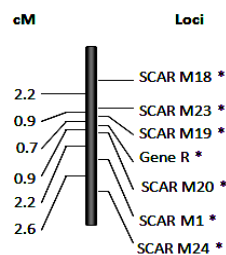


Figura 2 Mapa genético SCAR de alta resolução. Grupo 1 representando a interação dos marcadores e o loco de resistência a infecção da variante da raça II de *H. vastatrix*. (MapDisto, 2007).

* χ^2 Significativo para segregação de 3:1.

Identificação dos clones positivos e ordenação dos contigs

A identificação de clones BAC portadores de marcadores moleculares baseado na técnica de amplificação por PCR foi eficiente em detectar pools ou clones positivos. Inicialmente na primeira fase identificamos 32 clones positivos, dos quais conservamos 24 para as demais etapas. A partir da segunda fase, a visualização dos pools de clones positivos foi realizada em gel de agarose. Na quarta etapa, identificamos 24 clones positivos com a presença de 32 locos com marcadores SCARs (Figura 3a).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mais promissores obtidos por Brito (2007) apesar de serem inéditos, não possibilitavam a aplicação imediata em MAS devido a grande distância genética entre o gene de resistência e os três marcadores encontrados. O presente trabalho oferece informações complementares aos dados preliminares de biologia molecular e facilita o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para estudos posteriores.

Os marcadores AFLP por si só são limitantes na aplicação direta em MAS, por isso foi preciso transformá-los em marcadores derivados, cujo o objetivo foi obter um marcador molecular mais estável e preciso. O *oligo* de AFLP é dependente de restrição enzimática, possível de imperfeições, e de uma curta sequência seletiva para amplificação.

Segundo Param e Michelmore (1993), o desenho de *oligos* mais longos e específicos, superam ambos aspectos negativos da técnica de AFLP, reduzindo pequenos desvios de análise, mas de considerável efeito no resultado final. Observamos que o mapeamento dos SCARs aumentou significativamente a resolução do mapa genético. Este fenômeno pode ser originado pela imperfeita atividade enzimática na restrição do AFLP, alteração dos sítios de restrição em genótipos considerados segregantes ou pela baixa especificidade do oligonucleotídeo utilizado naquela reação. Além da aplicação direta em técnicas moleculares de localização, identificação e estudo do gene de resistência, os marcadores SCARs possuem um potencial ilimitado. Por exemplo, podem ser usados para o monitoramento do gene em programas de melhoramento em cafeeiro ao longo das gerações visando a resistência da raça específica de ferrugem e aplicação imediata em MAS. Pode ainda contribuir efetivamente, aumentando a eficiência e reduzindo o tempo de seleção das novas cultivares.

A primeira etapa do isolamento do gene foi realizada neste estudo, quando da identificação de clones BAC contendo marcadores moleculares de baixa segregação. O ordenamento dos clones BAC contendo dois marcadores permitiu o correto posicionamento baseado segundo a ordem dos marcadores AFLP e SCAR (Figura 3). Os clones 15o18 e 115p12, potencialmente são os mais promissores, pois eles contem ambos marcadores que flanqueiam o gene de resistência numa região delimitada por 1,6 cM (Figura 3b) do mapa genético dos marcadores SCARs.

Por outro lado, combinando o ordenamento dos clones BAC com o mapa genético, demonstra que o gene está posicionado dentro de um espaço físico de aproximadamente 400 kb (Figura 3b, do marcador SCAR 20 ao 18). Os resultados de citometria em *Coffea arabica* realizados por Cros et al (1993) e Bare et al.(1996), indicam a massa do genoma diplóide é de aproximadamente 1,36 pg o que equivale a 1,32 Mbp. Sendo assim, estima-se num computo geral que uma taxa de recombinação a 1% corresponda a um espaço físico de ~250 kb. Nossos resultados mostram que na população de mapeamento, encontramos uma região de aproximadamente 400 kb, representando 4,7 cM, indicando para este loco, a taxa de segregação de ~85 kb a cada cM. O aumento da taxa de segregação em razão do espaço físico do genoma pode indicar que o loco encontra-se em no espaço intergênico (entre o centrômero e o telômero) do cromossomo e, portanto mais passível de sofrer recombinação.

Sabemos que a resistência durável as raças específicas de *H. vastatrix* pode perdurar por apenas algumas décadas (Prakash et al. 2004), mas estes marcadores em conjunto com outros, por meio de técnicas de piramidação de genes em genótipos elites, auxilia na diminuição deste efeito (Rosewarne et al., 2005). Além disso, pode existir semelhança entre este gene de resistência e outros, facilitando o acúmulo de informações moleculares geradas, contribuindo para acelerar e facilitar a identificação de outros genes de resistência em plantas. Consequentemente, o alvo deste estudo traz implicações potenciais para futuras aplicações de estratégias de seleção e melhoramento em café visando a resistência durável e estudos relacionados a identificação, estrutura e função dos genes que codificam para a resistência ao patógeno.

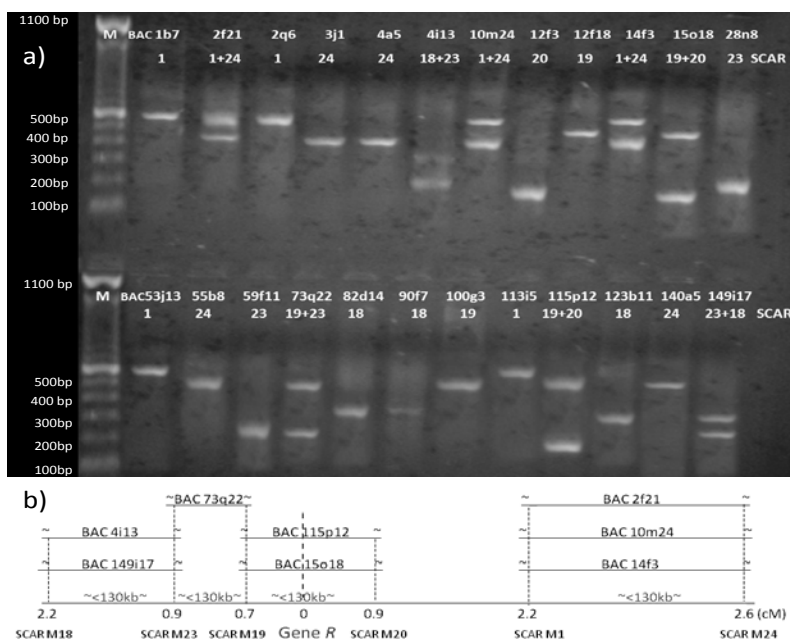


Figura 3 Isolamento dos clones BAC de amplificação positiva para os marcadores SCARs. a) gel de agarose a 1% na confirmação do isolamento dos clones positivos. b) ordenamento dos clones BAC com mais de um marcador identificado, segundo a ordem dos marcadores SCARs sobre o mapa genético SCAR.

Obs: M = marcador de peso molecular.

CONCLUSÕES

Obtivemos um mapa genético de alta resolução com marcadores SCARs mantendo o posicionamento prévio e reduzindo significativamente as distâncias para os seis marcadores, de 20,6 cM para 9,45 cM. Os marcadores que flanqueavam o gene de resistência delimitavam uma região de 4,0 cM, passou a ser de apenas 1.6 cM. Os marcadores SCARs contribuíram para a redução para mais da metade das distâncias genéticas do mapeamento AFLP. A proximidade dos marcadores SCAR deste gene de resistência permite a aplicação imediata em um programa de melhoramento assistido por marcadores genéticos para esta doença.

Obtivemos dois clones BAC, ambos contendo os dois marcadores SCARs que flanqueiam o gene, indicando que o loco de resistência está delimitado a uma região de cerca de 130 kb.

A ordenação de 5 clones BAC posicionados por 4 marcadores SCAR com duplos insertos, permitiu a construção do contig dos clones BAC, compreendendo uma região cromossômica estimada em aproximadamente 4,7 cM e 400 kb. Para esta região específica do genoma de café, cada cM corresponde a ~85 kb.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSHULER, D.; DALY, M.J.; LANDER, E.S. 2008. Genetic Mapping in Human Disease. **Science**, Vol. 322. 5903: 881 - 888
- BARRE, P.H.; NOIROT, M.; LOUARN, J.; DUPERRAY, C.; HAMON, S. 1996. Reliable flow cytometric estimation of nuclear DNA content in coffee trees. **Cytometry**, 24: 32–38
- BETTENCOURT, A.J.; RODRIGUES, Jr.C.J. 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. In: Clarke RJ, Macrae R (Eds) Coffee. Agronomy, vol 4. **Elsevier Applied Science**, London, pp 199–234
- BIRBOIM, H.C.; DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Reserch**. 7:1513-1523
- BRITO, G.G. 2007. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do Híbrido de Timor à *Hemileia vastatrix*. 57 p. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa – MG. 2007.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; TRIGIANO, R.N. 1996. Recovery of DNA Amplification Products from Silver-Stained polyacrylamide Gels. *Methods in Molecular Biology*. Vol 67. In White BA. **PCR Cloning Protocols-From Molecular Cloning to Genetic Engineering**. Humana Press, Totowa. 111-127
- CAIXETA, E.T.; RUFINO, R.J.N.; OLIVEIRA, A.C.B.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L. 2003. Caracterização da resistência genética do híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, (eds): Porto Seguro. Anais. Brasília, DF : Embrapa Café. p. 226. 447pp.
- CRESTE, S. TULMANN-NETO, A. FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Mol Biol Report**, 4:299-306
- CROS, M.C.; GAVALDA, N.; CHABRILLANGE, C.; RÉCALT, C.; DUPERRAY, S.; HAMON, S. 1993. Variations in the total nuclear dna content in african *Coffea* species (*rubiacaceae*). Quinzene colloque scientifique international sur le café. 15^oASIC. Biotechnologies, pp.23-32.
- HERRERA, J.C.; ALVARADO, G.; CORTINA, H.; COMBES M.C.; ROMERO, G.; LASHERMES, P. 2009. Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. **Euphytica**, in press.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. 1990. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. **Gene**. 96:23-28.
- LOUREIRO, M.E.; DIOLA, V.; BRITO, G.G.; GALLINA, A.P.; CAIXETA, E.T.; SAKIYAMA, N.S. 2008. High density genetic mapping of resistencia gene to race II of *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor genotype. 22nd International Conference on Coffeference. Campinas-SP. 2:59.
- LORIEUX, M. 2007. MapDisto Version 1.7 beta for Excel 2007. <http://mapdisto.free.fr/>. acessado em fev. 2009.
- MAHÉ, L.; COMBES, M.C.; VÁRZEA, V.M.P.; GUILHAUMON, C.; LASHERMES, P. 2008. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). **Mol Breeding**. 21:105–113.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Reserch** 8: 4321-4325
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. (1993) Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**. 85:985-993
- PRAKASH, N.S.; MARQUES, D.V.; VARZEA, V.M.P.; SILVA, M.C.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. 2004. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. **Theoretical and Applied Genetics**. 109:1311-1317
- QATIBI, A.I.; BORIES, A.; GARCIA, J.L. 1991. Sulfate Reduction and Anaerobic Glycerol Degradation by a Mixed Microbial Culture. **Current Microbiology** Vol. 22 , 47-52
- ROSEWARNE, G.V.; SINGH, R.P.; HUERTA-ESPINO, J.; WILLIAM, H.M.; BOUCHET, S.; CLOUTIER, S.; MCFADDEN, H.E.; LAGUDAH, E.S. 2005. Leaf tip necrosis, molecular markers and β 1-proteasome subunits

- associated with the slow rusting resistance genes Lr46/Yr29. TAG **Theoretical and Applied Genetics**. vol.112 , p. 500-508
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. 2006. Isolation of DNA Fragments from Polyacrylamide Gels by the Crush and Soak Method. **Cold Spring Harbor Protocols**. pdb.prot2936.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H.; BONIERBALE, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Biotechnology**. 7:257–264.
- VAN DER VOSSSEN, H.A.M. 2001. Coffee breeding practices. In: Clarke RJ,Vitzthum OG (eds) Coffee recent Developments. **Agronomy**, vol 1. pp184-201
- VARZEA, V.M.P.; RODRIGUES, J.R.; SILVA, M.C.; GOUVEIA, M.; MARQUES, D.V.; GUERRA-GUIMARÃES L.; RIBEIRO, A. 2002. Resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. In: Zambolim L (ed.), O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café, pp.297-320.
- ZHU, J. 2002. Use of PCR in Library Screening, vol 192: in Chen, B. and Janes H.W. Methods in Molecular Biology. **PCR Cloning Protocols**. Second edition. Humana Press, Totowa, 37:353-358.