

DÊNIA PIRES DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
PARA SELEÇÃO DE CAFEIROS RESISTENTES À FERRUGEM**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A447d
2015 Almeida, Dênia Pires de, 1988-
Desenvolvimento e utilização de marcadores moleculares
para seleção de cafeeiros resistentes à ferrugem / Dênia Pires de
Almeida. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 42f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Eveline Teixeira Caixeta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.30-42.

1. *Coffea arabica*. 2. Café - Melhoramento genético.
3. Resistência a doença e pragas. 4. *Hemileia vastatrix*.
5. Ferrugem. 6. Marcadores moleculares. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de
Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.732

DÊNIA PIRES DE ALMEIDA


**DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
PARA SELEÇÃO DE CAFEEIROS RESISTENTES À FERRUGEM**

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

APROVADA: 28 de julho de 2015.



Ney Sussumu Sakiyama



Lúcio Mauro Silva Guimarães



Antonio Carlos Baião de Oliveira
(Coorientador)



Eveline Teixeira Caixeta
(Orientadora)

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence os obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
José de Alencar

Dedico primeiramente a Deus, que sempre esteve presente em minha vida, aos meus pais e meus irmãos, e também ao meu noivo pelo amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar presente em minha vida e iluminar meu caminho, dando-me saúde e força para enfrentar os desafios e para tornar possível este sonho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, 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, João e Cida, por sempre me apoiarem, por nunca me deixarem desistir, pelo amor incondicional, pela educação, pela confiança, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos Denise e Rafael, pelo incentivo, carinho, paciência e amizade.

Ao meu noivo Marcelo, pelo amor, pela atenção, pelo incentivo, pela ajuda na realização desse trabalho e pela paciência durante esse tempo.

À doutora Eveline Teixeira Caixeta, não só pela excelente orientação, mas, sobretudo pela amizade, pela confiança e incentivo, pelos sábios ensinamentos responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional e por sempre me atender atenciosamente em sua sala, mesmo ocupada.

Ao Professor Ney Sussumu Sakiyama, pelos valiosos ensinamentos, pelo incentivo, pelos aconselhamentos e disponibilidade de participação na banca.

À doutora Eunize Maciel Zambolim, pela amizade, pela confiança, pelos ensinamentos.

Ao Professor Laércio Zambolim, pelos ensinamentos e confiança.

Ao Professor Cosme, pela orientação, pelo entusiasmo, por sempre estar disponível a me ajudar, pelo exemplo de profissional a ser seguido, pelas valiosas sugestões e ensinamentos, pela paciência e disposição a ajudar na realização deste trabalho.

Ao doutor Antonio Carlos Baião de Oliveira, pela orientação, pelas valiosas sugestões e aconselhamentos para concretização desse trabalho e pela disponibilidade de participação na banca.

Ao doutor Antônio Alves Pereira, pela disponibilidade de participação na banca.

Ao doutor Lúcio Mauro Guimarães, pela disponibilidade de participação na banca.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em especial àqueles que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos amigos do Biocafé (Alexsandra, Bianca, Brenda, Bruna, Emily, Geleta, Letícia, Juan, Karla, Kátia, Rej, Rose, Samila e Tiago) pela amizade, incentivo, descontração nas horas vagas e pelo apoio para a realização deste trabalho.

A Karol e Dani pela amizade ajuda e dedicação na realização desse trabalho.

A doutora Andréa pela disponibilidade de participação na banca, pela amizade e pela ajuda para realização desta pesquisa.

Ao Elyabe pela amizade e pela ajuda para realização desta pesquisa

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

Aos amigos que aqui conquistei, pela amizade e companheirismo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

DÊNIA PIRES DE ALMEIDA, filha de João Pires de Almeida e Maria Aparecida Pinto de Almeida, nasceu no dia 28 de novembro de 1988, em Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino fundamental em 2003, na Escola Estadual José Albino Leal, em Pedra do Anta-MG e o ensino médio em 2006, na Escola Estadual Santa Rita de Cássia, Viçosa-MG.

Em Julho de 2013 diplomou-se em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, sob orientação do professor Ney Sussumu Sakiyama.

Em agosto de 2013, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração Genética Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob orientação da Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pesquisadora da Embrapa Café.

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

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. Revisão de Literatura	3
3.1. Melhoramento do cafeeiro visando resistência a <i>Hemileia vastatrix</i>	3
3.2. Seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento de plantas.....	5
3.3 Marcador molecular SCAR	6
4. Material e Métodos	7
4.1. Material Vegetal e Extração de DNA.....	7
4.2. Multiplicação do isolado de <i>Hemileia vastatrix</i>	9
4.3. Inoculação das plantas	9
4.4. Desenvolvimento dos marcadores SCAR	10
4.5. Validação dos primers SCAR na população F ₂	13
4.6. Similaridade das sequências dos marcadores SCARs com os cromossomos do genoma referência de <i>C. canephora</i> e genes envolvidos nessa região.....	13
4.7. Análises Genético-Estatísticas	14
5. Resultados e Discussão	14
5.1. Obtenção dos marcadores SCAR	14
5.2. Mapeamento do marcador SCAF2	16
5.3. Similaridade das sequências dos marcadores SCAR com os cromossomos do genoma referência de <i>C. canephora</i> e genes envolvidos nessa região.....	17
5.4. Genes encontrados no genoma de referência de <i>C. canephora</i> nas regiões dos SCAR.....	19
5.5. Seleção Assistida usando marcador SCAR e SSR	24
5.6. Avaliação da eficiência da Seleção Assistida.....	27
6. Conclusão.....	30
7. Referências.....	30

RESUMO

ALMEIDA, Dênia Pires de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Desenvolvimento e utilização de marcadores moleculares para seleção de cafeeiros resistentes à ferrugem.** Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta. Coorientadores: Antonio Carlos Baião de Oliveira e Cosme Damião Cruz.

A ferrugem alaranjada causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. é considerada em todo o mundo uma séria doença do cafeeiro que tem causado vários prejuízos para a cafeicultura. O uso de fungicidas é o método mais empregado para o controle da doença, porém sua aplicação deve ser feita de forma racional, para não inviabilizar a cultura e agredir o meio ambiente. Na busca por cultivares resistentes, já foram identificados nove genes dominantes de resistência a *H.vastatrix* presentes em cafeeiros de diferentes espécies. Uma potencial estratégia para introgridir esses genes de resistência no cafeeiro é o uso de marcadores moleculares. Logo, objetivou-se com esse trabalho, converter marcadores AFLPs ligados a locos de resistência do cafeeiro à raça I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* em marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) e avaliar a eficiência do uso desses marcadores e de um microssatélite previamente identificado na Seleção Assistida por Marcadores (SAM). Para isso, quatro combinações de primers AFLPs ligados à resistência do cafeeiro à raça I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* foram clonados e sequenciados. Os marcadores SCAR desenvolvidos foram denominados de SCAFs e, posteriormente, validados nos genitores resistente Híbrido de Timor UFV 443-03; genitor suscetível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) e em 247 indivíduos da população F₂ de mapeamento. Os dados foram codificados e analisados no programa GQMOL. Com as sequências dos SCARs foi feita uma busca local no banco de dados do genoma de referência de *Coffea canephora* utilizando a ferramenta BLAST, e-value de -27. A fim de identificar quais genes estão envolvidos nas regiões dos cromossomos onde os SCARs apresentaram maior similaridade, foi realizada uma busca local utilizando a ferramenta Gbrowse, e-value de -10. Para a realização da SAM foram genotipados o marcador SCAF2 validado e um marcador microssatélite SSR16 em indivíduos das populações F₃ e de retrocruzamentos suscetíveis. Na realização da fenotipagem dos 16 discos de folhas de 1,5 cm de diâmetro de cada planta dos genitores, da geração F₃ e dos retrocruzamentos foram inoculados com uredósporos da raça II. Após as inoculações, os discos foram colocados sobre uma tela de nylon e espuma, saturada com água e acondicionados no interior de um gerbox. Os gerbox contendo os discos de folhas,

foram fechados e mantidos na ausência de luz durante 48 horas, a 22°C e, em seguida, transferidos para uma câmara sob condições controladas de temperatura de 22°C e 12 horas de luz. No momento em que os discos inoculados do genitor suscetível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) iniciou a esporulação, em torno dos 25 dias após a inoculação (dpi), foi iniciada a avaliação de resistência/suscetibilidade. Na validação dos marcadores SCARs apenas o marcador SCAF2 apresentou polimorfismo entre os cafeeiros resistentes e suscetíveis, se comportando como marcador dominante em repulsão. Os outros marcadores SCARs desenvolvidos não apresentaram polimorfismo entre os cafeeiros quando os fragmentos foram analisados em gel de agarose. Logo, somente o marcador SCAF2 foi validado mantendo o mesmo ordenamento no grupo de ligação 2 (GL2) do mapa genético de ligação, ficando ligado a 0 cM do AFLP que lhe deu origem. Na busca local no genoma de *C. canephora* encontrou-se maior similaridade dos marcadores SCAF1, SCAF2 com o cromossomo 0, chamado de ChrUn, e maior similaridade dos marcadores SCAF3 e SCAF4 com o cromossomo 10. Na identificação dos genes, os marcadores SCAF1 e SCAF2 pertencentes ao GL2 do mapa genético apresentaram similaridade com alguns genes que codificam proteínas relacionadas à resistência a patógenos. Na SAM, foi verificado que o uso dos marcadores moleculares permitiu selecionar indivíduos homocigotos dominantes para um dos locos e para os dois locos, sendo mais eficiente que a fenotipagem. Logo, com o desenvolvimento de marcadores SCAR e SSR16 intimamente ligados aos locos de resistência à ferrugem do cafeeiro e seu uso na SAM possibilitaram um avanço nos programas de melhoramento com a seleção precoce de indivíduos e também uma posterior clonagem posicional de genes ligados à resistência a essa doença.

ABSTRACT

ALMEIDA, Dênia Pires de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Development and use of molecular markers for the selection of coffee rust resistance.** Advisor: Eveline Teixeira Caixeta. Co-advisors: Antonio Carlos Baião de Oliveira and Cosme Damião Cruz.

Coffee leaf rust (CLR) caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix* (L.) Berk. & Broome is widely considered as a serious disease causing various damages to coffee production. The use of fungicides is the employed control method, though their application should be made in a rational manner to avoid hampering the culture and the environment. In search for resistant cultivars, nine dominant resistant genes to *H. vastatrix* have been identified in different coffee species. One potential strategy for the introgression of these resistance genes is the use of molecular markers. Therefore, the objective of this work was to convert AFLP markers linked coffee loci resistant to race I, II and pathotype 001 of *H. vastatrix* in SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker and evaluate the efficiency of these markers and a microsatellite marker previously identified in Marker Assisted selection (MAS). For this purpose, four primer combinations of AFLPs linked to resistant genes to race I, II and pathotype 001 of *H. vastatrix* were cloned and sequenced. Developed SCAR markers were named SCAF and later validated in the resistant parent Híbrido de Timor (UFV 443-03); susceptible parent Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) and 247 individuals of the F₂ mapping population. Data were coded and analyzed in GQMOL software. With the sequences of the SCAR, a local search was made in the reference genome of *C. canephora* database using the BLAST tool with e-value of 10⁻²⁷. In order to identify genes in the regions of the chromosome where the SCAR showed greatest similarity, a local search was performed using the tool GBrowse with 10⁻¹⁰ e-value. To perform the MAS, validated SCAF2 and microsatellite SSR16 markers were analysed in individuals of F₃ population and susceptible backcrossing. As part of phenotyping, 16 leaf discs of each parent plant, and the F₃ backcross generation were inoculated with race II uredospores. After inoculation, the discs were placed on a germination box with a nylon mesh and foam, saturated with water. The germination boxes containing the leaf discs were sealed and kept in the dark for 48 hours at 22 °C and then transferred into a chamber under 22 °C and 12 hours of photoperiod. The susceptible parent Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) sporulation started around 25 days after inoculation (dpi), from there began the evaluation of individual from other populations. In the validation of SCAR marker,

only SCAF2 marker showed polymorphism between the resistant and susceptible coffee, behaving as a dominant marker in repulsion. The other developed SCAR markers did not show polymorphism between coffee varieties when the fragments were analyzed on agarose gel. Yet, only the marker SCAF2 was validated keeping the same order in the Linkage Group 2 (GL2) of the genetic linkage map, being linked at 0 cM of AFLP from which it was developed. The local search in the *C. canephora* genome found greater similarity of SCAF1 and SCAF2 markers to chromosome 0, called ChrUn, and greater similarity of SCAF3 and SCAF4 markers to chromosome 10. In identifying genes, SCAF1 and SCAF2 markers belong to GL2 genetic map with some similarity to genes encoding proteins related to resistance to pathogens. In the MAS, it was found that the use of molecular markers allowing the selection of homozygous dominant for one of the loci for the two loci, being more efficient than phenotyping. Therefore, with the development of SCAR and SSR16 markers closely linked to coffee rust resistance loci and their use in the MAS enabled an advance in breeding programs with early selection of individuals and also a subsequent positional cloning of genes linked to resistance to this disease.

1. Introdução

Existem atualmente mais de 100 espécies de café descritas, sendo a de maior importância econômica em todo o mundo, a *Coffea arabica* L. Essa espécie é tetraplóide, predominantemente autógama, enquanto as demais espécies são diplóides, autoincompatíveis e alógamas (FAZUOLI, 2006).

Dentre as doenças que acometem o cafeeiro, em especial *C. arabica*, a ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) é a principal delas e tem causado grandes prejuízos em todas as regiões cafeeiras. O uso de fungicidas é o método mais empregado para o controle da doença, porém, sua aplicação deve ser feita de forma racional para não inviabilizar a cultura e agredir o meio ambiente (ZAMBOLIM & VALE, 1999). Assim, o uso de cultivares resistentes tem se mostrado o método mais indicado para o controle da doença.

Na busca por cultivares resistentes, já foram identificadas algumas fontes de resistência para a ferrugem. Nessas fontes, foram caracterizados, até o momento, pelo menos nove genes dominantes presentes em plantas de café de diferentes espécies (NORONHA-WAGNER & BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT & NORONHA-WAGNER, 1971; BETTENCOURT & RODRIGUES JÚNIOR, 1988). Os genes S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} foram encontrados em *C. arabica*, os S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} em *C. canephora* e S_{H3} em *C. liberica*. Além desses, foram detectados, pelo menos, mais dois genes de resistência ainda não caracterizados, que, isoladamente ou associados aos genes S_{H1} a S_{H9} , condicionam resistência a mais de 45 raças fisiológicas de ferrugem (VÁRZEA & MARQUES et al., 2005).

Nos programas de melhoramento, o que se busca é introgridir esses genes de resistência em cafeeiro que possui outras características de interesse agrônomo, como alta produtividade, vigor, uniformidade de maturação, resistência a outras doenças e pragas e qualidade de grão e de bebida. A transferência de alelos de resistência para o cafeeiro pode ser facilitada pelo uso de marcadores moleculares que estão localizados próximos aos genes de resistência. O mapeamento genético consiste em uma das estratégias mais eficazes para a realização de estudos avançados de genética, permitindo o entendimento da herança, a identificação e o isolamento de genes ou locos de interesse (ROOSE et al., 2000; EIBACH et al., 2015; YUAN et al., 2015).

Diferentes mapas genéticos estão sendo construídos para as distintas espécies de cafeeiros. Para *C. canephora*, já existe mapa genético saturado (DENOEUDE et al.,

2014), enquanto para *C. arabica*, ainda não foi desenvolvido um mapa genético completo, pois o baixo polimorfismo e a natureza poliplóide dessa espécie têm dificultado a obtenção de mapas saturados (PESTANA et al., 2015). No entanto, devido a sua grande importância econômica, vários grupos têm buscado desenvolver mapas genéticos para essa espécie, obtendo-se vários mapas parciais usando diferentes tipos de marcadores moleculares (PEARL et al., 2004; TEIXEIRA-CABRAL et al., 2004; PRAKASH et al. 2004; OLIVEIRA et al., 2007; PRIOLLI et al., 2008; ROMERO et al., 2014; PESTANA et al., 2015). Esses mapas genéticos fornecem informações importantes sobre o genoma do cafeeiro e a organização dos cromossomos. Particularmente, eles são úteis para a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de interesse econômico e que podem ser usados na Seleção Assistida por Marcadores (SAM).

A maioria dos mapas genéticos desenvolvidos para *C. arabica* contem marcadores aleatórios, multilocos do tipo RAPD ou AFLP ligados aos genes de interesse (NOIR et al., 2003; PRAKASH et al., 2004; GICHURU et al., 2008; BRITO et al., 2010; ROMERO et al., 2014; PESTANA et al. 2015).

PESTANA et al. (2015) desenvolveram para *C. arabica* um mapa genético de ligação, composto por 111 marcadores (RAPD, AFLP, SSR e primer-específico - CARF 005), distribuídos em 12 grupos de ligação, cobrindo 976,8 cM do genoma. Neste mapa, foram identificadas duas regiões nos grupos de ligações 2 e 10 que correspondem a dois locos associados à resistência do cafeeiro ao patótipo 001, às raças I e II de *H. vastatrix*. Portanto, a identificação desses dois locos por meio de marcadores moleculares permitirá a introgressão desses locos em cultivares de interesse nos programas de melhoramento que visam à obtenção de cafeeiro com resistência durável a *H. vastatrix*. No entanto, os marcadores associados e que flanqueiam essas regiões responsáveis pela resistência, no mapa de ligação, são do tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism), com exceção de um único marcador microssatélite. Marcadores AFLP por serem dominantes, laboriosos e de difícil avaliação não são adequados para uso em grandes populações como na SAM em populações de melhoramento genético (LOPES et al., 2002). Para superar este problema, é desejável converter os marcadores AFLP em marcadores de loco-específico baseados em PCR, tais como CAP (Cleaved Amplified Polymorphic Site) e SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (LEHMENSIEK et al., 2001; PRAKASH et al., 2005; ZACCARO et al., 2007; DIOLA et al., 2011; SHUDO et al., 2013; CHENG et al., 2015; ZHANG et al., 2015; DEVRAN et al., 2015).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) a partir de marcas AFLP ligadas a locos de resistência à *H. vastatrix*, visando à seleção assistida de cafeeiros de *C. arabica*.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver marcadores SCAR a partir de marcadores AFLP ligadas a dois locos de resistência as raças I, II e ao patótipo 001 do cafeeiro à ferrugem;
- Caracterizar os marcadores SCARs e validar em população de melhoramento;
- Testar a eficiência dos marcadores SCAR e SSR para a Seleção Assistida por Marcadores Moleculares.

3. Revisão de Literatura

3.1. Melhoramento do cafeeiro visando resistência a *Hemileia vastatrix*

Em 1861 foi constatada pela primeira vez, em cafeeiros silvestres, a ferrugem alaranjada do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) na região do Lago Vitória, no Quênia (CHAVES et al, 1970). Após esse período, o patógeno disseminou-se por todos os países produtores de café da África, Ásia e Oceania. A ferrugem foi detectada pela primeira vez no Brasil em 1970, na Bahia. Em apenas dois anos, a ferrugem foi disseminada para as principais regiões cafeeiras do Brasil (GODOY et al., 1997).

A ferrugem causa a queda precoce das folhas e a consequente seca dos ramos produtivos, antes da época de florescimento do cafeeiro, refletindo negativamente sobre o desenvolvimento dos botões florais, vingamento da florada, desenvolvimento dos frutos reduzindo a produção de café nas safras seguintes que pode causar prejuízos de 35 a 40 % na produtividade (ZAMBOLIM et al., 1997; GARÇON et al., 2004). Uma alternativa para minimizar os prejuízos causados pela ferrugem do cafeeiro seria a utilização de cultivares resistentes. Sendo assim, vários programas de melhoramentos genéticos em todo mundo estão voltados ao estudo da resistência do cafeeiro à *H. vastatrix*, como o Centro Nacional de Pesquisa Cafeeira (CENICAFÉ) na Colômbia, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Oeiras, Portugal e

Departamento de melhoramento de plantas-Instituto de pesquisa de café no Kenya, na África. No Brasil, tem se destacado o Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), o Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), a Embrapa, a Universidade Federal de Lavras (UFLA), a Universidade Federal de Viçosa (UFV), a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), entre outras instituições (SERA et al., 2010; TOYOTA, 2014; LIGABO et al., 2015; GUERRA-GUIMARÃES et al., 2015; AVELINO et al., 2015).

Um dos principais programas de melhoramento do cafeeiro visando a resistência à ferrugem é o desenvolvido pela EPAMIG/ UFV/ UFLA/ Embrapa Café. O programa teve início em 1970/71, pelo Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFV com o objetivo específico de auxiliar na obtenção de variedades resistentes à ferrugem, doença que estava chegando ao país e já assustava todos os cafeicultores. Para isso, foi introduzido, na época, grande parte dos acessos do Híbrido de Timor existente no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Portugal, uma vasta coleção de germoplasma de café resistente a *H. vastatrix*, originados do cruzamento de *C. arabica* com híbridos de Timor (CIFC 832/1 e CIFC 832/2). Os acessos de Híbrido de Timor, introduzidos apresentavam além da resistência a *H. vastatrix*, outras características de interesse agrônômico. Além desses acessos, houve, também, a introdução do clone CIFC 4106 originado de propagação vegetativa do cafeeiro considerado como o Híbrido Timor original. Através material genético recebido pelo CIFC, com os registros CIFC 2234 e CIFC 2235, selecionados na Tanzânia, com a designação VCE 1587, foram originadas as introduções UFV 342, UFV 376, UFV 377 e UFV 378. Sendo a introdução UFV 376 selecionada do cafeeiro IAA808/5, e a UFV 377 e a UFV 378, dos cafeeiros IAA 491-I, originada do acesso CIFC 832/1. As introduções UFV 379, UFV 380, UFV 381, UFV383 e UFV 401 são provenientes dos cafeeiros IAA 845/5, IAA 845/8, IAA 845/19, IAA 845/20, IAA 845/21 e IAA 845/17, respectivamente, que se originaram do acesso CIFC 2252. A introdução UFV 407 originou-se da progênie do cafeeiro CIFC 1343/234, e a UFV 410 da progênie do acesso CIFC 1343/212. (PEREIRA et al., 2008).

A partir da associação do programa UFV à EPAMIG, foram lançadas várias cultivares de café resistentes à ferrugem utilizando-se como fonte de resistência o germoplasma Híbrido de Timor (OLIVEIRA & PEREIRA, 2008). Apesar dos esforços dos vários programas de melhoramento e das diferentes cultivares resistentes e tolerantes terem sido lançadas, o contínuo aparecimento de novas raças fisiológicas do fungo causador da ferrugem, ocasionando a suplantação da resistência desses cultivares.

(BETTENCOURT & NORONHA-WAGNER, 1971; VARZEA et al., 2002). A baixa durabilidade da resistência das cultivares é resultado da grande variabilidade e evolução de novas raças virulentas do patógeno, onde as condições climáticas são favoráveis à doença. Já foram constatadas, até o momento, mais de 45 raças fisiológicas diferentes de *H. vastatrix* com a capacidade de infectar diferentes genótipos em vários países produtores de café (RODRIGUES JR et al., 1993; PRAKASH et al., 2005). Dessa forma, nos programas de melhoramento dessa espécie, a estratégia utilizada é a introgressão dos genes de resistência das outras espécies, por meio de cruzamentos com híbridos interespecíficos como os híbridos naturais denominados de Híbridos de Timor.

Como fontes de resistência a *H. vastatrix*, nove genes dominantes (S_{H1} a S_{H9}), simples ou associados, foram identificados condicionando a resistência de cafeeiros a *H. vastatrix*. Os genes S_{H1} , S_{H2} , S_{H3} , S_{H4} e S_{H5} , foram caracterizados em *C. arabica* provenientes da Etiópia (BETTENCOURT & NORONHA-WAGNER, 1971; NORONHA-WAGNER & BETTENCOURT, 1967). O gene S_{H3} é derivado de *C. liberica* e os genes S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} de *C. canephora* (BETTENCOURT et al., 1992; BETTENCOURT et al., 1980; BETTENCOURT, 1973).

A transferência de genes desejáveis de *C. canephora* para *C. arabica* por meio de cruzamentos interespecíficos é uma das estratégias de sucesso adotada por muitos melhoristas (HERRERA et al., 2002; NOIR et al., 2003; GICHURU et al., 2008; PESTANA et al., 2015). No caso da introgressão de genes de uma espécie para outra, marcadores moleculares vêm sendo utilizados em atividades de seleção assistida, permitindo rastrear precocemente parte de genomas ou genes de interesse, reduzindo o tempo necessário para a obtenção de genótipos elite (MANDOULAKANI et al., 2015). Por serem ferramentas úteis para detectar variações no genoma, os marcadores moleculares aumentam o poder da análise genética das plantas (CAIXETA et al., 2009). Dessa forma, os marcadores moleculares passaram a representar complementos importantes para os programas de melhoramento por facilitarem a localização e mapeamento de genes e QTL, a clonagem de genes com base em mapas genéticos, além de auxiliar na seleção de genótipos superiores por meio de SAM (Seleção Assistida por Marcadores).

3.2. Seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento de plantas

Uma área de maior impacto dos marcadores moleculares na identificação de genótipos superiores em populações segregantes é a seleção assistida (OLIVEIRA et al.,

2011; ASHRAF et al., 2014; YOHANNES et al., 2015). Por meio dessa tecnologia, pode-se incrementar a eficiência no melhoramento de plantas, pois menor número de progênies por combinação é necessário, bem como menor número de gerações para a estabilização dos genótipos (POLAND et al., 2015; URRUTIA et al., 2015).

Os marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente e são transmitidos por segregação Mendeliana, isso permite que com a seleção assistida elimine alguns aspectos indesejáveis da seleção puramente fenotípica, melhorando a eficiência do processo e a seleção possa ser feita precocemente, diminuindo os custos de um processo de seleção fenotípica (YANIV et al., 2015).

Alguns estudos envolvendo marcadores ligados a genes que conferem resistência a doenças mostraram que uma vez que os marcadores foram desenvolvidos para SAM, o custo é menor que os métodos convencionais (YU et al., 2000). O uso de SAM tem sido priorizado também quando a avaliação fenotípica é demorada ou difícil de ser realizada, (YU et al., 2000; DREHER et al., 2003).

Em café, poucos trabalhos foram realizados utilizando a estratégia de SAM. O primeiro trabalho que obteve sucesso sobre a aplicação da SAM e piramidação de genes de resistência à ferrugem em *C. arabica* foi realizado por PRAKASH et al. (2011). Neste trabalho foram validadas duas sequências, caracterizadas de marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), que estão estreitamente ligados ao gene S_{H3} , um dos genes altamente eficazes para a resistência à ferrugem do cafeeiro. Também foi realizada a seleção assistida piramidando esse gene com outros genes de resistência à ferrugem em *C. arabica*

A SAM também foi realizada por ALKIMIM (2013), onde foram validados marcadores intimamente ligados a dois genes maiores (S_{H3} e $S_{H?}$) que conferem resistência à ferrugem do cafeeiro. Os marcadores validados foram utilizados para amplificar o DNA de 160 cafeeiros introduzidos no Brasil como fonte de resistência à ferrugem, com potencial de serem portadores do gene S_{H3} . Também foram identificados cafeeiros que, além de possuírem o gene S_{H3} em homozigose, apresentaram o gene $S_{H?}$ proveniente do Híbrido de Timor.

3.3 Marcador molecular SCAR

Marcadores SCAR são amplificados com primers específicos, desenvolvidos com base em sequências já mapeadas ou caracterizadas (PARAN & MICHELMORE, 1993). Muitos desses primers são obtidos da conversão de marcadores RAPD ou AFLP

em SCAR (LEHMENSIEK et al., 2001; DIOLA et al., 2011; CHENG et al., 2015; LIU et al., 2015). O marcador AFLP é muito utilizado para análise de diversidade genética, construção de mapas genéticos e locos de características quantitativas (QTL) (GERBER et al., 2000; LIMA et al., 2002; PIRONDI et al., 2015; YANG et al., 2015). Para os ensaios de locos individuais, marcadores AFLP são menos adequados, como por exemplo, em estudos de frequência alélica, seleção assistida por marcadores ou clonagem baseada em mapa genético (LIUZ. et al., 1998). Embora marcadores AFLP possam ser usados para essas aplicações, muitos marcadores AFLP são multilocos e de difícil avaliação, muito caros e trabalhosos para grande número de amostras (LOPES. et al., 2002). Devido a isso, há uma forte necessidade de converter marcadores AFLP em marcadores específicos, como marcadores SCAR, pois estas técnicas de marcadores são fáceis de usar, menos trabalhoso e barato para ensaios de locos simples que apresentam locos únicos geneticamente definidos, identificados pela amplificação por PCR do DNA genômico, com pares de primers com grande especificidade de pareamento com o DNA (AGARWAL et., 2008)

Em café, foram identificados por PRAKASH et al. (2004) 21 marcadores de DNA do tipo AFLP ligados ao gene S_{H3} , que confere resistência durável à ferrugem do cafeeiro derivado da introgressão de *C. liberica* em *C. arabica*. Desses marcadores AFLP, quatro foram transformados em SCAR e, juntamente com outros três marcadores SCAR provenientes de extremidade de BAC e três SSR, formaram dois pequenos grupos de ligação (5,7 cM e 5,9 cM) contendo o gene de resistência S_{H3} (MAHÉ et al., 2008).

Foram desenvolvidos por DIOLA et al. (2011) seis marcadores SCAR delimitando uma região cromossômica do gene $S_H?$, gene este presente em um acesso de Híbrido de Timor (UFV427-15), que confere resistência a outras raças de *H. vastatrix*.

4. Material e Métodos

4.1. Material Vegetal e Extração de DNA

A confirmação de homozigose dos genes de resistência a *H. vastatrix*, foi feita com as plantas originadas da autofecundação do Híbrido de Timor UFV 443-03. Esse Híbrido de Timor UFV 443-03 foi usado como genitor masculino no cruzamento controlado com a cultivar suscetível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57). Uma planta da geração F_1 , registrada como H 511-1, foi submetida à autofecundação

controlada, para obtenção da geração segregante F_2 (PESTANA et al, 2015). Para avaliar a eficiência dos marcadores na SAM foram realizadas autofecundações controladas de duas plantas F_2 resistentes à ferrugem (plantas 15 e 35), formando duas populações F_3 . Foram obtidas, também, duas populações do segundo retrocruzamentos suscetível, cruzando as plantas resistentes do RCS_1 47 e 108 com a cultivar suscetível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57), conforme esquematizado na Figura 1. Dessa forma, foram obtidas as seguintes populações F_3 -C15 (oriunda da planta 15), com 25 indivíduos; F_3 -C35 (oriunda da planta 35), com 36 indivíduos; RCS -POP5 (oriunda da planta 47), com 93 indivíduos; e RCS - C4U (oriunda da planta 108), com 54 indivíduos. Os cruzamentos foram realizados no Campo de Seleção de Híbridos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG.

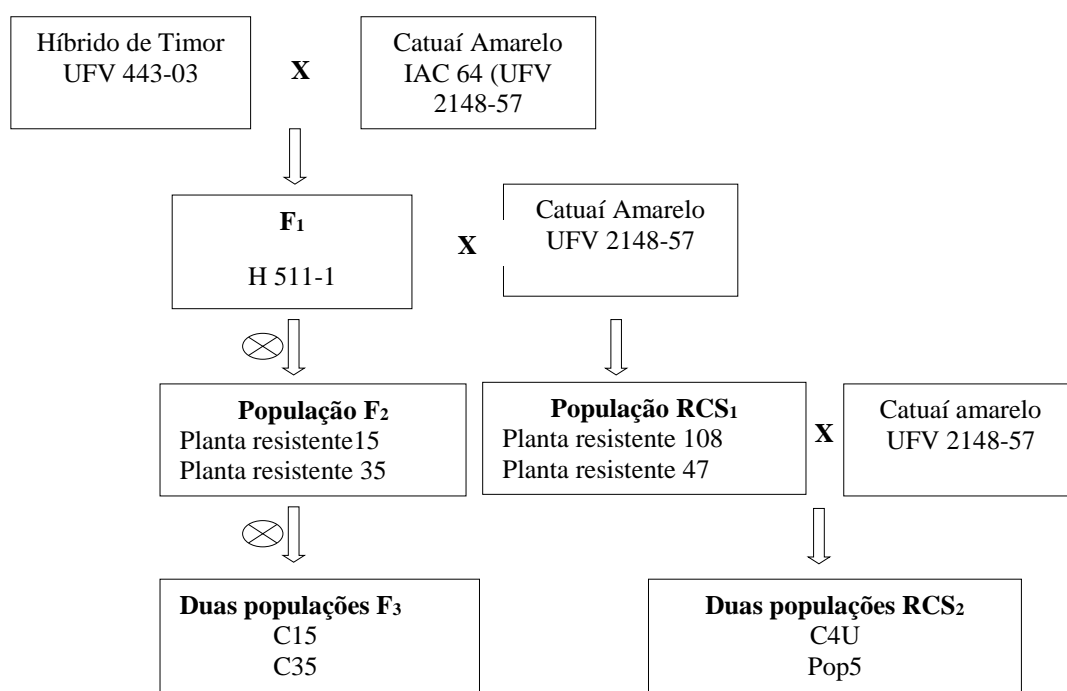


Figura1. Representação dos cruzamentos realizados para obtenção das populações de autofecundações e retrocruzamentos suscetíveis.

Os cruzamentos para a obtenção da geração F_1 foram realizados por PEREIRA (1995). O Híbrido de Timor UFV 443-03, o genótipo Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) e o híbrido F_1 encontram-se no Campo de Seleção de Híbridos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

O DNA genômico dos genitores e das populações F_2 , F_3 e RCS foi extraído de folhas jovens e completamente desenvolvidas, seguindo a metodologia descrita por

DINIZ et al. (2005). A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose (1%) e sua quantificação foi realizada em Nano Drop 2000. As amostras de DNA foram padronizadas em 25 ng/ μ L e armazenadas a -20° C até o momento das análises.

4.2. Multiplicação do isolado de *Hemileia vastatrix*

A fenotipagem das populações foi realizada com a raça II de *H. vastatrix*, pertencente à micoteca do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé/UFV) e mantida por inoculações periódicas em mudas da cv. Catuaí Vermelho UFV 2144. A multiplicação do fungo foi realizada de acordo com a metodologia descrita por ZAMBOLIM & CHAVES (1974). Para isso, com um pincel os uredósporos foram depositados na face abaxial de folhas jovens completamente desenvolvidas do cafeeiro cv. Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV 2144). Em seguida, as folhas foram aspergidas com água destilada até a obtenção de um leve molhamento superficial. As plantas foram mantidas no escuro, a 22°C por 48 horas e, em seguida, transferidas para uma câmara de crescimento, com temperatura de 22°C e fotoperíodo de 12 horas. Após abundante esporulação, foram coletados os uredósporos e acondicionados em cápsulas de gelatina as quais foram colocadas dentro de um dessecador com solução de ácido sulfúrico (densidade de 1,8 e concentração 32,6%) na parte inferior, de modo a manter a umidade relativa em torno de 50%, no ambiente interno. O dessecador foi mantido em refrigerador a 4°C. No momento de preparo do inóculo, a viabilidade dos uredósporos de *H. vastatrix* foi avaliada pelo teste de germinação em meio Agar água 2%, usando o método descrito por ZAMBOLIM & CHAVES (1974). Somente os uredósporos com viabilidade superior a 30% foram considerados adequados para os testes de inoculação.

4.3. Inoculação das plantas

Para a avaliação da eficiência dos marcadores SCAR, a confirmação da resistência e suscetibilidade das plantas foi realizada por meio da inoculação das plantas com uredósporos da raça II, sob condições controladas, usando uredósporos da raça II de *H. vastatrix* em discos de folhas, com três repetições.

Folhas dos genitores (resistente e suscetível) e das plantas das populações F₃ e RCS₂ foram coletadas. Para cada genótipo foram cortados 16 discos de folhas, de 1,5 cm de diâmetro, que constituíram as unidades amostrais. Os uredósporos do patógeno foram inoculados em cada disco na face abaxial, com auxílio de um pincel. Após as inoculações, os discos foram colocados sobre uma tela de nylon e espuma, saturada com água e acondicionados no interior de um gerbox. Os gerbox contendo os discos de

folhas foram fechados e mantidos na ausência de luz durante 48 horas a 22°C e, em seguida, transferidas para uma câmara sob condições controladas de temperatura e luminosidade (22°C, 12 horas de luz). Os discos foram limpos com o auxílio de algodão 48 horas após a inoculação.

No momento em que o genitor suscetível iniciou a esporulação, em torno dos 25 dias após a inoculação (d.p.i.), foi iniciada a avaliação de resistência/suscetibilidade. A avaliação seguiu escala de TAMAYO et al. (1995), que se baseia na ausência ou presença de uredósporos. De acordo com essa escala, são consideradas plantas resistentes, aquelas que recebem 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). Logo, as plantas que obtiverem notas de 1 a 3 (ausência de esporulação) foram consideradas resistentes e aquelas que obtiveram notas de 4 a 6 (presença de esporulação), suscetíveis. Foram realizadas três repetições, coletadas e inoculadas em três épocas distintas, sendo a primeira repetição em junho de 2014, a segunda repetição em fevereiro de 2015 e a terceira repetição em junho de 2015.

4.4. Desenvolvimento dos marcadores SCAR

As amostras de DNA dos cafeeiros Híbrido de Timor UFV 443-03 e Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) foram amplificadas com as quatro combinações de primers AFLP que geraram bandas ligadas aos locos de resistência a *H. vastatrix*, conforme protocolo descrito por PESTANA et al. 2015. Esses cafeeiros foram escolhidos por serem os parentais da população que deu origem ao mapa construído por PESTANA et al. (2015), no qual os locos associados à resistência à *H. vastatrix* foram localizados.

As combinações de AFLP usadas foram ECTG/MAAT1, ECTT/MTGC3, ECGA/MTCC4, ECGT/MATC2. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante (6%), corado com prata.

As bandas polimórficas e mapeadas próximo aos locos de interesse foram recuperadas dos géis de poliacrilamida usando o protocolo descrito por CAETANO-ANOLLÉS E TRIGIANO (1996), com as seguintes modificações. A região desejada no gel foi demarcada e cortada, reidratada com 30 µL de tampão TE 1x. O gel hidratado foi macerado em 80 µL de tampão TE 1x em um microtubo eppendorf de 0,6 ml e

centrifugado a 12.000 g por 5 min. Foram usados 5 μ L da solução para realizar o PCR com o par de primers específicos que deram origem ao fragmento amplificado. Na PCR foi realizada 32 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 60s e um ciclo final de 72 °C por 5 min. O volume final da reação foi de 40 μ L, usando os reagentes: solução com o gel, tampão de reação de PCR 1x, 1,25 mM de MgCL, 0,15 mM de cada dNTP (Promega), 25 ng de cada primer específico e 2,0 U Taq DNA polimerase (Phoneutra).

O produto da amplificação foi aplicado em gel de agarose (1%) e realizada a eletroforese em tampão TBE 1x a uma voltagem de 70 V por 40 minutos e depois corado em brometo de etídio (10 mg.mL⁻¹) a 0,002 %. A banda foi cortada e eluída do gel utilizando o Kit Wisard[®] SV Gel and PCR Clean- Up System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. O fragmento purificado foi quantificado em Nano Drop 2000 e armazenado a -20 °C.

Após purificação, a ligação do fragmento de interesse foi feita em vetor de clonagem pGEM-T (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi realizada em volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L de 2X Rapid Ligation Buffer, 3 U de T4 DNA ligase, 10 ng de fragmento genômico, 50 ng de plasmídeo pGEM-T (relação plasmídeo/vetor de 3/1). A reação permaneceu por uma hora em temperatura ambiente e overnight a 4° C, e então, armazenada a -20°C até o momento de uso.

Para a preparação das células ultracompetentes, foi seguido o protocolo descrito por INOUE et al. (1990), utilizando a linhagem DH5 α de E coli. Inicialmente, 50 μ L da solução estoque de bactérias (glicerol 15%) foram plaqueada sem meio LB + Agar (1%) e crescidas por 12-16 horas a 37 °C. Após esse período coletou-se 10 a 12 colônias de crescimento radial maior de 1 mm e cultivadas em 250 mL de meio SOB (extrato de levedura 5%, bacto-triptona 2%, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl e 10 mM de MgSO₄), sob agitação a 19 °C até atingir OD 600nm (Densidade óptica). As culturas foram colocadas em gelo por 10 minutos, centrifugadas a 4000 xg por 10 min a 4°C, ressuspensas em 80 mL de meio TB (Tampão MÊS 10 mM, CaCl 15mM, KCl 250 mM e MnCl₂ 55 mM), mantidas em gelo por 10 min e centrifugadas a 4000 xg por 10 min a 4° C. Em seguida, as culturas foram ressuspensas em 20 mL de meio TB e 1,4 mL de DMSO, aliquotadas em volumes de 100 μ L, congeladas com nitrogênio líquido e estocadas em ultrafreezer a -80 °C.

As células foram testadas utilizando vetores fechados e vazios (vetor controle do kit pGEM- T- Promega). Sendo aceitos índices de transformantes $>1 \times 10^8$ cfu μg^{-1} de DNA (conforme orientação do fabricante).

A realização da transformação foi de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK e RUSSEL (1989). As células foram descongeladas em gelo e a reação de ligação adicionada ao tubo com as células ultracompetentes. Após 30 min, foi realizada a transformação por meio de choque térmico a 42 °C durante 45 segundos e no gelo por 2 min. Foi acrescentado 800 μL de meio LB Broth (Sigma) líquido sem ampicilina, sendo incubadas a 37 °C sob agitação 150 rpm por 1,0 hora. Após a agitação, 100 μL do meio foi plaqueado com alça de Drigasliki em placas contendo 20 ml de meio LB contendo ampicilina 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 0,5 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalatosideo=indutor do operonLac de E.coli) e X-GAL 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (5-bromo-4-cloro-3indolil- β -D-galatosideo). Após 16 horas a 37° C, foram selecionadas as colônias brancas portadoras de plasmídeos com inserto, isoladas e com desenvolvimento acima de 1 mm de diâmetro cultivadas em 3 ml de meio LB+ ampicilina a 37° C durante 24 horas sob agitação de 150 rpm.

O DNA plasmidial das colônias selecionadas foi extraído com o kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi sequenciado em sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) no laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa. Após o sequenciamento, as sequências de baixa qualidade foram retiradas e formadas sequências consenso utilizando o programa Sequencer 4.10.1 (Gene Codes Corporation-USA). As sequências do vetor e dos adaptadores empregados na clonagem foram identificadas utilizando o programama VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>) e, posteriormente, removidas em documento word, restando somente as sequências de DNA correspondentes aos insertos de café. A partir dessa sequência foi realizado o desenho dos primers foward e reverse, utilizando o programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), seguindo os seguintes critérios: 1) tamanho do primer variou de 18 a 30, com tamanho ótimo de 20 nucleotídeos; 2) %CG variou de 45 a 55%; 3) Tm (Melting Temperature) variou entre 55 e 65, com valor ótimo de 60°C.

Os nomes de cada SCAR foram derivados da junção de SCAR com AFLP, seguidas da numeração da ordem nos grupos de ligação dos fragmentos do AFLP que deram origem aos SCAR e F ou R representando Foward ou Reverse. Como exemplo, a

combinação de primers AFLP: ECTT-MTGC3, é o terceiro no grupo ligação 2, logo o SCAR desenvolvido foi denominado SCAF2 F e SCAF2 R.

4.5. Validação dos primers SCAR na população F₂

A validação inicial do marcador SCAR foi realizada por meio da sua localização no mapa de ligação. Dessa forma, o SCAR foi analisado na população de mapeamento, que corresponde a 247 indivíduos F₂ provenientes do cruzamento do genitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03 e do genitor susceptível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57). O protocolo utilizado foi o de PARAN & MICHELMORE (1993), modificado por DIOLA (2009). Para tal procedimento, uma PCR foi efetuada utilizando como reagentes 2,0 µL do DNA, numa concentração de 25 ng/µL, 2 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP (Promega), 2 mM de MgCl, 1,0 U Taq DNA polimerase (Invitrogen) e tampão de reação de PCR 1X, para um volume final de 20 µL. Os termocicladores utilizados foram o PTC-200 (MJ Research) e o Veriti (Applied Biosystems) programados para 94°C por 1min e 32 ciclos de 94 °C 30 s, 65 °C 30 s e 72 °C 1 min. O produto obtido foi visualizado em gel de agarose a 1,2%.

Após a genotipagem do marcador SCAR na população F₂, os dados foram codificados e analisados no programa GQMOL (CRUZ 2008). Os grupos de ligação foram formados e ordenados utilizando-se LOD score mínimo de 3,0 e máxima recombinação de 30%. As frequências de recombinação estimadas foram convertidas em distância genética (centi Morgans – cM).

4.6. Similaridade das sequências dos marcadores SCARs com os cromossomos do genoma referência de *C. canephora* e genes envolvidos nessa região

As sequências de cada SCAR foram utilizadas para se fazer uma busca local no site Coffe Genome Hub (<http://coffee-genome.org/coffeacanephora>), onde foi utilizada ferramenta BLAST. Os critérios utilizados na busca local foram: programa Blastn com e-value de -27. Utilizou-se 20 alinhamentos e foi comparada a sequência de cada SCAR com as sequências de cada pseudocromossomo base da espécie *C. canephora*.

Com o intuito de se identificar quais genes estão envolvidos nas regiões cromossômicas, utilizando o programa BLAST foi feita uma busca local com a sequência da região onde cada SCAR se localizou nos cromossomos, obtidas pelo resultado da análise Gbrowse com sequências de genes de *C. canephora*, seguindo os seguintes critérios: e-value de -10, programa: Blastn, database: Gene Sequences,

números de alinhamentos igual a 20 com as sequências das regiões de cada SCAR nos cromossomos correspondentes.

4.7. Análises Genético-Estatísticas

Com a finalidade de testar a eficiência dos marcadores SCAR desenvolvidos e o SSR na SAM, foi comparada a eficiência da genotipagem com a fenotipagem (resistência/suscetibilidade) dos cafeeiros. Foram analisadas plantas da população F₃ e dos retrocruzamentos suscetíveis, provenientes do cruzamento da fonte de resistência Híbrido de Timor UFV443-03 e da cultivar suscetível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57).

5. Resultados e Discussão

5.1. Obtenção dos marcadores SCAR

Os quatro fragmentos correspondentes aos marcadores mais próximos que flanqueiam os dois locos de resistência foram clonados e sequenciados. A partir das sequências foram obtidos os primers para os marcadores SCAR (Tabela1).

Tabela1. Combinação de primers AFLP ligado ao loco de resistência e seus respectivos SCAR.

Marcador AFLP	GL ^a	Ligação ^b	Tamanho AFLP (pb) ^c	Marcador SCAR	Tamanho SCAR (pb)
ECTG-MAAT1	2	acoplado	670	SCAF1	108
ECTT-MTGC3	2	repulsão	600	SCAF2	272
ECGA-MTCC4	10	acoplado	800	SCAF3	361
ECGT-MATC2	10	acoplado	545	SCAF4	340

^a GL- grupo de ligação do mapa genético de ligação de PESTANA et al. 2015; ^b Ligação do marcador ao loco de resistência, acoplado = ligação ao alelo de resistência; repulsão = ligação ao alelo de suscetibilidade; ^c Tamanho do fragmento amplificado pelo marcador AFLP; ^d Tamanho do fragmento amplificado pelo marcador SCAR.

Os primers foram inicialmente analisados nos genitores e em genótipos da população F₂, suscetíveis e resistentes (Figura 2). Apenas o marcador SCAF2 apresentou polimorfismo entre os cafeeiros resistentes e suscetíveis (Figura 2b). Esse

marcador SCAR se comportou como um marcador dominante em repulsão, estando presente apenas nos cafeeiros suscetíveis. Esse mesmo comportamento foi observado com o marcador AFLP que o originou (Tabela 1).

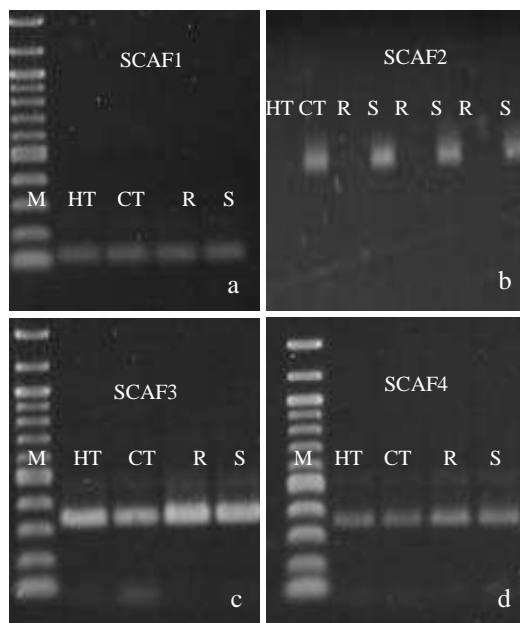


Figura 2. Produtos de amplificação dos DNAs de cafeeiros com os marcadores SCAR (SCAF1, SCAF2, SCAF3, SCAF4) M: Marcador de peso molecular 100 pb; HT: genitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03; CT: genitor susceptível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57); R: Cafeeiro resistente a raça II de *H.vastatrix*; S: Cafeeiro suscetível a raça II de *H.vastatrix*.

Os outros marcadores SCAR desenvolvidos não apresentaram polimorfismo entre os cafeeiros, quando os fragmentos foram analisados em gel de agarose (Figura 2 a, c, d). Eles foram testados também em gel de poliacrilamida, que apresenta maior resolução, no entanto, continuaram sendo monomórficos. Esse resultado demonstra que o polimorfismo encontrado entre os cafeeiros resistentes e suscetíveis encontrado nos marcadores AFLP não puderam ser observados por meio da amplificação pelo primer SCAR desenvolvido, para esses três marcadores.

A não transferência do polimorfismo identificado no AFLP para sequências específicas de PCR tem sido relatado e explicado na literatura. O polimorfismo encontrado com o marcador AFLP pode ser resultante de diferenças nos sítios de restrição das enzimas, portanto, não serão detectados com os marcadores loco específicos baseados em PCR (BRUGMANS et al., 2003). Em outros casos, a baixa

taxa de sucesso de conversão de marcadores AFLP é consequência do pequeno tamanho do fragmento amplificado (NEGI et al., 2000; HORN et al., 2003).

Além das causas citadas na literatura, a não detecção do polimorfismo do AFLP quando convertido para SCAR pode ser resultante de os primers desenhados não serem capazes de detectar pequenos polimorfismos como SNPs nos fragmentos amplificados. Nesse caso, após a amplificação dos cafeeiros resistentes e suscetíveis com o SCAR, esses podem ser sequenciados, comparados e analisados quanto a presença de sítio de restrição e SNP presentes ao longo do fragmento. Caso apresentem diferenças de presença de sítios de restrição, eles podem ser transformados em marcadores CAP (Cleavage Amplified Polymorphic Sequence). Este método permite identificar indivíduos heterozigotos, se comportando como marcador codominante. Se os SNPs identificados não resultarem em diferenças em sítios de restrição, os marcadores serão do tipo SNP.

5.2. Mapeamento do marcador SCAF2

Visando validar e localizar o marcador SCAF2 no mapa de ligação construído por PESTANA et al. (2015), este foi analisado em toda população de mapeamento. Os genitores resistente e suscetível e os 247 indivíduos da população F₂ foram amplificados com o marcador (Figura 3).

Os algoritmos de mapeamento utilizados foram os mesmos dos marcadores AFLP. O marcador SCAF2 manteve o mesmo ordenamento, ficando ligado a 0 cM do AFLP ECTT/MTGC3, que o originou (Figura 4).

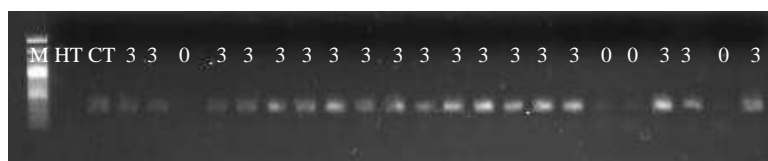


Figura 3. Amplificação do marcador SCAF2 em indivíduos da população F₂ (511-1). M= Marcador de pesomolecular 100 pb; HT= genitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03; CT= genitor susceptível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57), 3= Indivíduos da população F₂ com presença do alelo recessivo (Rr e rr) e 0= Indivíduos da população F₂ com ausência do alelo recessivo (RR)

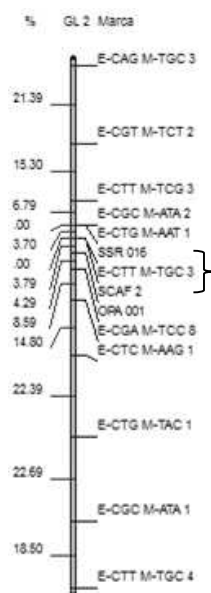


Figura 4. Grupo de Ligação 2 do Mapa de ligação para *C. arabica* contendo o marcador SCAF2. À direita da barra estão os nomes dos marcadores moleculares e a esquerda as distâncias em cM. } indica a combinação de primers AFLP- ECTT/MTGC3 e o SCAR correspondente, o SCAF2.

5.3. Similaridade das sequências dos marcadores SCAR com os cromossomos do genoma referência de *C. canephora* e genes envolvidos nessa região

Todas as quatro sequências obtidas dos fragmentos provenientes dos marcadores SCAR associados aos dois locos de resistência foram analisados no genoma de referência de *C. canephora*. O objetivo foi verificar se esses importantes locos de resistência à ferrugem identificados em *C. arabica* também são encontrados em *C. canephora* e se forem, se poderia ser analisado o seu mapa físico.

O genoma de *C. canephora* foi sequenciado pelo consórcio internacional composto por 11 países – Brasil, França, Itália, Canadá, Alemanha, China, Espanha, Indonésia, Austrália, Índia e Estados Unidos, sendo disponibilizado um genoma de referência com 710 Mb, onde foram preditos cerca de 25 mil genes. Para o sequenciamento do genoma de *C. canephora* foram utilizados marcadores âncoras Simple Sequence Repeat (SSR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and SNP (including RADseq) mapeados em quatro mapas genéticos de ligação de café incluindo o mapa consenso de alta resolução de *C. canephora*. 349 scaffolds foram ancorados em 11 pseudocromossomos e enquanto que 12.996 scaffolds (total de 204

Mb) permanecem não mapeados no genoma atual, sendo agrupados em um pseudocromossomo chamado de ChrUn. (DENOEUDE et al., 2014)

Com isso foi realizada uma busca local com cada sequência dos fragmentos obtido com os SCARs. Todos os fragmentos foram encontrados no genoma de referência. Os resultados de maior similaridade podem ser observados na Tabela 2. A similaridade de sequência entre as duas espécies pode ser explicada pela proximidade genética entre elas. Pois *C. arabica* é oriunda da hibridização entre *C. canephora* e *C. eugenioides* (LASHERMES et al., 1997; MAURIN et al., 2007).

Tabela 2. BLAST dos SCAR com sequências dos cromossomos de *Coffea canephora*.

SCAR	Cromossomo C.canephora	Tamanho SCAR ^a	Identidade	Similaridade (%)	E-value	Gaps (%)
SCAF1	0	371	100/109	91	0.0	1
SCAF2	0	340	111/116	95	7e-47	0
SCAF3	10	469	452/469	96	0.0	0
SCAF4	10	512	461/480	96	0.0	0

^aTamanho do fragmento amplificado pelo marcador AFLP que deu origem ao SCAR em pares de base

Os dois marcadores AFLP que correspondem aos marcadores SCAR SCAF1 e SCAF2 foram localizados no grupo de ligação 2 do mapa genético de PESTANA et al. 2015 (Tabela 1). Esses marcadores SCAR obtiveram maior similaridade com sequências localizadas no mesmo cromossomo, ou seja, no cromossomo 0 chamado de ChrUN do genoma de referência. Na Figura 5 foi feita uma representação da correspondência do mapa genético e físico para essa região. Os marcadores SCAR localizados no grupo de ligação 10 do mapa genético, apresentaram maior similaridade com as sequências do cromossomo 10 de *C. canephora* (Figura 6). Esses resultados comprovam a ligação física entre os marcadores moleculares localizados no mapa genético.

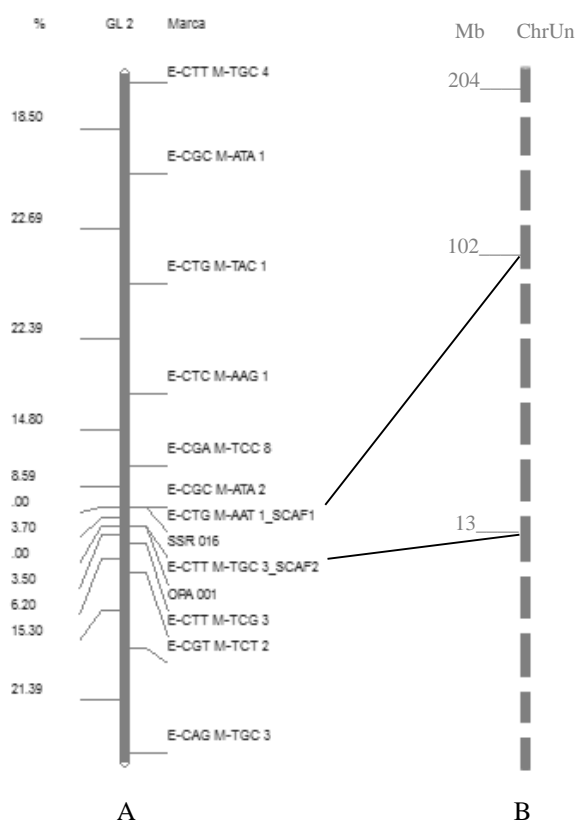


Figura 5. A: Representação do Grupo de Ligação 2 do mapa genético de ligação da população H511-1. À direita da barra estão os nomes dos marcadores moleculares e a esquerda as distâncias em cM. B: Representação da posição dos SCAR no cromossomo da espécie *C. canephora*. À esquerda estão as distâncias em Mb.

5.4. Genes encontrados no genoma de referência de *C. canephora* nas regiões dos SCAR

A análise da região cromossômica de *C. canephora* onde os SCAR apresentaram similaridade foi realizada meio da ferramenta GBrowse, com o intuito de identificar quais genes estão presentes nessa região. Foram identificados genes anotados no genoma de referência de *C. canephora* apenas nas regiões que apresentaram similaridade com os marcadores SCAF1 e SCAF2 (Tabela 3). As demais regiões não correspondem a regiões genômicas de *C. canephora*. DENOEUDE et al. (2014) encontraram um conjunto de dez genes de resistência com domínios NBS no ChrUn.

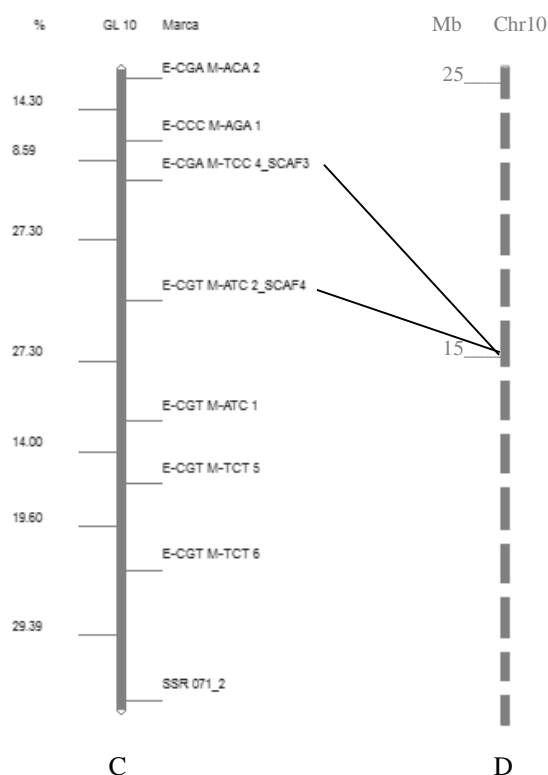


Figura 6. C: Representação do Grupo de Ligação 10 do mapa genético de ligação da população H511-1 à direita da barra estão os nomes dos marcadores moleculares e a esquerda as distâncias em cM. D: Representação da posição dos SCARs no cromossomo 10 da espécie *C. canephora*. À esquerda estão as distâncias em Mb.

Os marcadores SCAF1 e SCAF2 pertencem ao GL2 do mapa genético e apresentam similaridade com alguns genes que codificam proteínas relacionadas a resistência a patógenos (Tabela 3). Na região do marcador SCAF1, foram encontrados similaridade com diferentes genes, sendo o de maior importância para estudo de interação patógeno-hospedeiro o que codifica a proteína Purple acid phosphatase (PAP) relacionada à defesa contra patógenos (JAMET et al., 2008).

RAVICHANDRAN et al. (2013) demonstraram que uma proteína denominada de PAP5 desencadeia um sistema imune a doenças patogênicas, sendo necessária para manter a resistência basal contra *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis*. Mais recentemente, GERRA-GUIMARÃES et al. (2015) verificaram a existência dessa mesma família de proteína no patossistema café *H.vastatrix*. Esses autores descobriram sete superfamílias de proteínas identificadas nas folhas de café, totalizando 29 superfamílias de proteína. As novas proteínas identificadas são proteínas, principalmente, fosfatases e oxi-redutases, destacando a existência de um importante mecanismo de defesa constitutiva em *C. arabica* contra patógenos. Dentre elas foi detectada a proteína PAP exclusivamente na amostra resistente.

Tabela 3. BLAST região de cada SCAR com genes de *C.canephora*

Locos SCAF1	Ident (%)	e-value	TrEMBL Homologs	Organismo	Ident (%)	Swiss Prot Homolgs	Organismo	Ident (%)
Cc00-g08000	94	0	Hypothetical protein	-	-	-	-	-
Cc00-g08450	93	2e-50	Hypothetical protein	-	-	-	-	-
Cc00-g08010	91	5e-20	Hypothetical protein	-	-	-	-	-
Cc00-g07780	89	1e-91	Purple acid Phosphate	Ricinus communis	75,66	Purple acid phosphatase 25	Arabidopsis thaliana	70,20
Cc00-g14900	88	1e-26	SNF2 and helicase domain containing protein	Arabidopsis thaliana	44,60	Zinc finger Ran-binding domain-containing protein	Homo sapiens	30,66
Cc00-g25980	87	3e-58	Transducin/WD40 domain containing protein	Arabidopsis thaliana	52,08	Chromatin assembly factor 1 subunit B	Mus Musculus	33,67
Cc00-g08650	86	2e-26	Uncharacterized Protein	Glycine Max	87,07	Syntaxin-22	Arabidopsis thaliana	78,33
Cc00-g12600	85	8e-22	Probable Ornithine Aminotransferase	Nicotiana tabacum	80,60	Probable ornithine Aminotransferase	Dictyostelium discoideum	55,91
Cc00-g21620	84	3e-12	Putative Uncharacterized Protein	Arabidopsis lyratasub sp. Lyrata	44,19	Putative ABC transporter A family member 2	Arabidopsis thaliana	44,61

Tabela 3- cont

Locos SCAF2	Ident (%)	e-value	TrEMBL Homologs	Organismo	Ident (%)	Swiss Prot Homologs	Organismo	Ident (%)
Cc00-g28790	93	0	Isoflavone reductase Like protein	Coffea arábica	67,24	Isoflavone Reductase homolog	Arabidopsis thaliana	58,71
Cc00-g16530	90	5e-23	Probable acyl Activating enzyme 14	Cannabis Sativa	70,09	Probable acyl activating enzyme18	Arabidopsis thaliana	69,17
Cc00-g12930	89	4e-76	Receptor like Protein kinase	Medicago truncatula	42,87	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR	Arabidopsis thaliana	37,65
Cc00-g14070	87	2e-16	Putative Uncharacterized Protein	Vitis vinífera	41,09	Putative Receptor-like protein kinase 2	Arabidopsis thaliana	37,41
Cc00-g16560	86	3e-15	Putative Uncharacterized Protein	Vitis vinífera	44,80	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	Arabidopsis thaliana	43,83
Cc00-g03710	81	1e-20	Leucoanthocyanidi ndi oxygenase, putative	Ricinus Communis	47,13	Protein SRG1	Arabidopsis thaliana	43,65

O SCAF2 está em região onde se encontra o gene IRL que codifica a proteína Isoflavone reductase-like. Apesar de os isoflavonóides serem considerados compostos exclusivos de leguminosas (PANIZZI, 1996; DETTENBORN, 2009), as IFRs pertencem a uma grande família proteica que inclui proteínas semelhantes a IFR (IR-Like; IRL), as quais tem significativa identidade de sequência com as IFRs de leguminosas, tendo sido identificadas em várias espécies de plantas não relacionadas diretamente.

Como exemplo o gene IRL já foi encontrado nos frutos de toranja (*Citrus paradisi*). Esse gene é estimulado pela irradiação ultravioleta ao mesmo tempo em que induz resistência ao *Penicillium digitatum* (LERS et al., 1998)

HUA et al. (2013) encontraram um novo gene que regula a mudança de lignina e afeta também o acúmulo de flavonóides em *Ginkgo biloba* L, designado de IRL1 que codifica a proteína GbIRL1. Essa proteína pode ser a enzima limitante da velocidade na via de biossíntese dos flavonóides em folhas de *Ginkgo*. Segundo os autores, a proteína é expressa constitutivamente no caule e raízes, especialmente nos tecidos onde a planta é atacada por praga e doenças fúngicas.

Em *C. arabica* também já foi mencionada a presença de proteínas do tipo IRL. Onde foi identificado um gene chamado CaIRL que codifica um putativo isoflavona proteína reductase-like (IRL), esse gene foi validado e realizados estudos de expressão demonstrando que CaIRL é expresso exclusivamente em folhas de café e o seu nível de transcrição está significativamente aumentada em resposta à infecção fúngica e lesão mecânica. Sendo provável que participe de uma etapa comum aos diferentes mecanismos de defesa da planta (SEVERINO, 2008; BRANDALISE et al., 2009).

GONZÁLEZ DE COLMENARES et al. (1998) demonstraram que variedades de café suscetíveis (*C. arabica*) ao fungo *H. vastatrix* contem baixos níveis de proantocianidinas nas suas folhas, quando comparados com espécies resistentes (*C. canephora*), e que as proantocianidinas extraídas dessas folhas inibem a germinação in vitro de uredósporos da raça II de *H. vastatrix*. As proantocianidinas, também conhecidas com o nome de procianidinas, são compostas que fazem parte do grupo dos flavonóides existentes nas plantas. Logo o marcador SCAF2 estar relacionado com esses compostos comprova a forte ligação desse marcador a resistência à *H. vastatrix*, principalmente a raça II, que foi o objetivo desse trabalho.

Outra proteína encontrada, também pertencente ao grupo dos flavonoides, é a Leuco anthocyanidin dioxigenase que está envolvida na biossíntese de antocianina que é uma classe de flavonóides (BRAHAMS et al., 2003; WU et al., 2015). Estudos

anteriores demonstraram que os flavonóides estão associados com a adaptação de plantas ao estresse (WINKEL-SHIRLEY et al., 2002; PONS et al., 2014)

Além do gene IRL, também foi encontrada similaridade do marcador SCAF2 pela análise de SwissProt Homologs (<http://coffee-genome.org/coffeacaneophora>), com o gene EFR que codifica a proteína LRR receptor-like serine/threonine-proteinkinase EFR relacionada ao organismo *Arabidopsis thaliana*. Proteínas com esse domínio têm, em geral, função de receptor de reconhecimento de padrões (PPR) que determina a percepção específica do fator de alongamento Tu (EF-Tu), um elicitador potente da resposta de defesa para padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs).

Segundo PARNISKE et al. (1997), o domínio LRR pode facilitar a interação da proteína R com o seu fator Avr (elicitador) relacionado e pode fornecer diferentes especificidades de reconhecimento para fatores Avr alterados. De fato, em vários sistemas planta-patógeno, a variação da sequência na região LRR tem mostrado ser responsável por diferentes especificidades de reconhecimento ou de resistência. (CÉSARI et al., 2014; LEE et al., 2014; PADMAN ABHAN et al., 2014; STEIN BRENNER et al., 2015; FAWKE et al., 2015).

5.5. Seleção Assistida usando marcador SCAR e SSR

O marcador SCAR validado até o momento, o SCAF2, foi analisado nas populações de melhoramento (F_3 e RCS_2), visando avaliar seu potencial no uso para SAM. Além do marcador SCAR, foi utilizado um marcador microssatélite, SSR16, previamente identificado por PESTANA et al. (2015), localizado no grupo de ligação 2 do mapa genético também associado ao loco de resistência.

Os resultados obtidos com o SCAF2 e o SSR16 estão apresentados na Tabela 4. Como esse SCAR se comporta como um marcador dominante e está ligado em repulsão, ele marca o alelo r, portanto, são identificados na população os indivíduos que têm rr e rR. O padrão do marcador obtido na população F_3 está ilustrado na Figura 7 e da população de RCS_2 , na Figura 8.

Tabela4. Segregação aproximada obtida com a genotipagem usando o marcador SCAF2 e SSR16, nas populações de melhoramento F₃ e RCS₂.

Marcador SCAF2								
Genótipos	Pop.	Segreg	Pop.	Segreg	Pop.	Segreg	Pop.	Segreg
	F ₃		F ₃		RCS		RCS	
	C15		C35		C4U		POP5	
RR	9	1	8	1	-	-	-	-
Rr e rr	16	3	28	3	54	4	93	4
Total	25	4	36	4	54	4	93	4

Marcador SSR16								
Genótipos	Pop.	Segreg	Pop.	Segreg	Pop.	Segreg	Pop.	Segreg
	F ₃		F ₃		RCS		RCS	
	C15		C35		C4U		POP5	
RR	8	1	7	1	-	-	-	-
Rr	10	2	19	2	29	2	49	2
Rr	7	1	10	1	25	2	44	2
Total	25	4	36	4	54	4	93	4



Figura 7. Padrão da amplificação do marcador SCAF2 em indivíduos da população F₃. M= Marcador de pesomolecular 100 pb. HT= genitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03, CT= genitor susceptível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57), 3= Indivíduos da população F₃ com presença do alelo recessivo (Rr e rr) e 0= Indivíduos da população F₃ com ausência do alelo recessivo (RR).

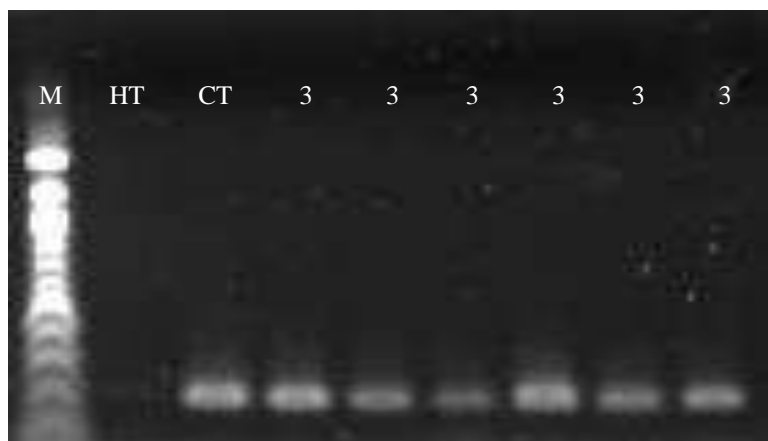


Figura 8. Padrão da amplificação do marcador SCAF2 em indivíduos da população RCS₂. M= Marcador de pesomolecular 100 pb. HT= genitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03, CT= genitor susceptível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57), todos apresentaram 3= Indivíduos da população RCS₂ com presença do alelo recessivo (Rr e rr).

Usando o marcador SCAF2 na população F₃-C15, observaram-se nove indivíduos sem a marca e 16 contendo a marca. Como esse marcador é dominante e está ligado em repulsão com o gene de resistência dominante, ele marca o alelo r. Portanto, os genótipos identificados com o marcador foram 9 RR e 16 r, estes dados confirmam a segregação aproximada de 1RR : 3 r (Tabela 4). Os 9 indivíduos serão, portanto, resistentes homozigotos. Os demais 16 cafeeiros poderão ser resistentes se forem heterozigotos (Rr) ou suscetíveis se forem homozigotos (rr). Para haver maior eficiência na incorporação e condução dos genes de resistência nos programa de melhoramento deve-se selecionar preferencialmente os genótipos resistentes homozigotos, esse marcador atendeu perfeitamente esse requisito, nesse loco. O mesmo foi observado na população F₃-C35, segregação aproximada de 1RR : 3 r (Tabela 4). Nas populações RCS₂ todos os indivíduos amplificaram o fragmento do marcador SCAF2, podendo, portanto ser Rr ou rr. Para essa população não foi possível selecionar indivíduos resistentes, por se tratar de um marcador dominante em repulsão. (Tabela 4).

O marcador SSR16, por ser codominante permitiu identificar os indivíduos homozigotos e heterozigotos resistentes (Figura 9 e 10). Nas populações F₃-C15, observou-se sete indivíduos RR, 11 Rr e sete rr, já na população F₃-C35 observou-se oito indivíduos RR, 18 Rr e 10 rr. Nas populações de RCS₂ pode-se distinguir os heterozigotos dos homozigotos recessivos, logo para a população RCS₂-C4U obteve-se 29 indivíduos Rr e 25 rr, na população RCS₂-POP5 observou-se 49 indivíduos Rr e 44 rr (Tabela4).

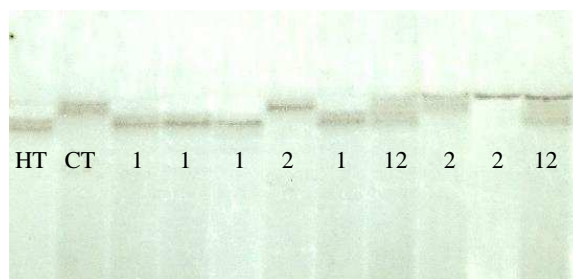


Figura 9. Padrão das bandas dos indivíduos de população F₃. HT: genitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03; CT= genitor susceptível Catuaí Amarelo IAC64 (UFV 2148-57); 1: indivíduos homozigotos dominantes; 2: indivíduo homozigoto recessivo e 12: indivíduos heterozigotos.

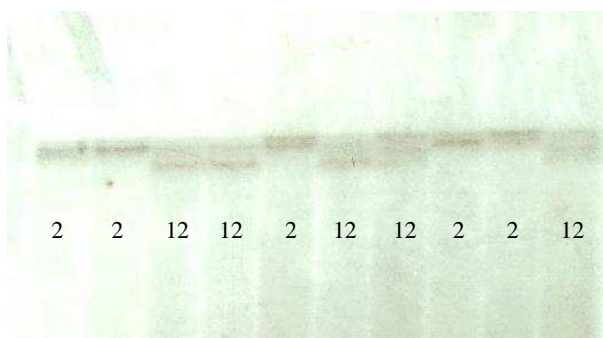


Figura 10. Padrão das bandas dos indivíduos de RCS₂. 2: indivíduo homozigoto recessivo e 12: indivíduo heterozigoto.

Com base na genotipagem utilizando os dois marcadores podemos selecionar indivíduos homozigotos resistentes para dar continuidade às etapas de melhoramento acelerando a obtenção de cultivares resistentes.

Na população F₃ foi possível selecionar indivíduos homozigotos resistentes com base nos dois marcadores, atingindo o principal objetivo de um programa de melhoramento C15-1, C15-2, C15-3, C15-18, C15-22, C15-25, C15-26, C15-30, C35-37, C35-52, C35-54, C35-65, C35-68, C35-70.

5.6. Avaliação da eficiência da Seleção Assistida

Como resultado da fenotipagem com a raça II de *H. vastatrix*, observou-se que todos os indivíduos da população F₃-C15 apresentaram-se resistentes, enquanto que na população F₃-C35 houve 30 resistentes para 6 suscetíveis. Na população RCS-C4U observou-se 36 indivíduos resistentes e 18 suscetíveis. Na população RCS-POP5 observou-se 62 resistentes e 31 suscetíveis. (Tabela 5).

Tabela 5. Segregação da fenotipagem das populações F₃ e RCS₂ com uredósporos da raça II

	Pop.	Segreg	Pop.	Segreg	Pop.	Segreg	Pop.	Segreg
	F ₃		F ₃		RCS		RCS	
	C15		C35		C4U		POP5	
Resistente	25	4	30	3	36	3	62	3
Suscetível	-	-	6	1	18	1	31	1
Total	25	4	36	4	54	4	93	4

Como demonstrado na Figura 1, para o avanço da geração de melhoramento, foram selecionados dois indivíduos fenotipicamente resistentes da população F₂, obtendo-se as populações F₃, C15 e C35, e outros dois da RCS₁ para a formação das populações RCS₂, POP5 e C4U. Como a resistência do cafeeiro à raça II de *H. vastatrix* é condicionada por dois locos dominantes independentes (PESTANA et al., 2015) e os indivíduos resistentes foram selecionados com base em dados fenotípicos para o avanço de geração, não se sabe quais os genótipos eles possuem. Ter um alelo dominante em um dos dois locos é suficiente para que o indivíduo seja resistente e, portanto, selecionado para avançar geração. Os possíveis genótipos dos indivíduos resistentes na geração F₂ e na geração de RCS₁, com sua respectiva progênie, estão representados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Genótipos oriundos da autofecundação de indivíduos resistentes F₂ correspondentes as plantas resistentes selecionadas para formar a população F₃ em estudo.

F ₂ resistentes							
AaBB	AaBb	AABB	AABb	AAbb	Aabb	aaBB	aaBb
F ₃							
1AABB	9A-B-	1AABB	1AABB	1AAbb	1AAbb	1aaBB	1aaBB
2AaBB	3A-bb		2AABb		2Aabb		2aaBb
1aaBB	3aaB-		1AAbb		1aabb		1aabb
	1aabb						

Tabela 7. Genótipos oriundos do retrocruzamento de indivíduos resistentes F_2 com genitor susceptível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) para formar a população RCS_2 em estudo.

RCS_1 resistentes		
AaBb	Aabb	aaBb
RCS_2		
1AaBb	1Aabb	1aaBb
1Aabb	1 aabb	1aabb
1aaBb		
1aabb		

De acordo com a Tabela 4, com a genotipagem do marcador SCAF2 e SSR16 na população F_3 -C15, obteve-se segregação de 1RR: 3r_ e 1RR: 2 Rr: 1rr respectivamente. Enquanto que, na fenotipagem, todos os indivíduos apresentaram-se resistentes (tabela6). Para se inferir qual é o genótipo do indivíduo 15 da população F_2 que deu origem a essa população, e assim se conhecer os genótipos dos indivíduos F_3 -C15 para os dois locos, foi comparada a segregação observada na tabela 4 com os resultados da fenotipagem obtida na tabela 5 com os possíveis genótipos da tabela 6. Com isso, pode-se concluir que o genótipo do indivíduo 15, selecionado para o desenvolvimento da população F_3 -C15, é AABb ou AaBB, dependendo de qual loco o marcador está associado. Logo, todos os indivíduos dessa população selecionados com base nos marcadores SCAF2 e SSR16 são homozigotos dominantes para os dois locos, o que mostra a alta eficiência desses marcadores em relação à fenotipagem, e sua utilização na piramidação de genes.

Para a população F_3 -C35, para se inferir os genótipos dos indivíduos que deram origem às populações, realizam-se as mesmas comparações, ou seja, das segregações da genotipagem com a fenotipagem e com os possíveis genótipos. Com isso, podemos afirmar que o indivíduo 35 que originou a população F_3 -C35 apresenta genótipo Aabb ou aaBb. Logo, os indivíduos selecionados com base nos marcadores SCAF2 e SSR16 são homozigotos dominantes para um dos locos.

Comparando a tabela 4 e 7 pode-se inferir que o genótipo dos indivíduos 47 e 108 de RCS_1 que originaram as populações RCS_2 possuem genótipo AaBb. Portanto, não foi possível selecionar indivíduos homozigotos dominantes.

Notou-se uma maior eficiência na utilização de marcas associadas à

característica, que a realização da fenotipagem, além de ser mais trabalhosa e se gastar muito tempo e custos, há necessidade da presença da doença. Os marcadores foram mais eficientes, pois, através deles, podem-se selecionar indivíduos homocigotos para um loco ou ainda para os dois locos, o que na fenotipagem não é possível se distinguir. Tais cafeeiros podem ser recomendados nos programas de melhoramento como continuação das etapas de melhoramento, acelerando a obtenção de cultivares resistentes, diminuindo custos e tempo com a realização da fenotipagem.

6. Conclusão

O desenvolvimento desses quatro marcadores SCARs fortemente ligados a locos de resistência à ferrugem do cafeeiro permitem associar mapa genético de *C. arabica* com mapa físico de *C. canephora*. Esses marcadores SCARs e SSR previamente identificado foram eficientes na seleção assistida de 14 cafeeiros resistentes à raça II de *Hemileia vastatrix*, possibilitando um avanço nos programas de melhoramento do cafeeiro visando resistência a essa doença. O processo de seleção de genótipos resistentes pelas técnicas convencionais é relativamente demorado, laborioso e dependente de condições ambientais adequadas, portanto a seleção assistida por marcadores permitiu caracterizar e selecionar genótipos resistentes, economizando tempo e recurso para o desenvolvimento de novas cultivares superiores.

7. Referências

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; & PADH, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant cell reports**, v.27, n.4, p.617-631.

ALKIMIM, E.R. **Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência múltipla à ferrugem e à antracnose dos frutos do cafeeiro**. 2013.40p. Dissertação (mestrado em genética e melhoramento)- Universidade Federal de Viçosa, 2013.

ASHRAF, M.; & FOOLAD, M. R. (2013). Crop breeding for salt tolerance in the era of molecular markers and marker-assisted selection. **Plant Breeding**, v.132, n.1, p.10-20.

AVELINO, J et al. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. **Food Security**, v. 7, n. 2, p. 303-321.

BETTENCOURT, A.J. **Considerações gerais sobre o 'Híbrido dee Timor'**. Instituto Agrônômico de Campinas, Circular n.3, p.20. 1973.

BETTENCOURT, A.J.; LOPES, J. & PALMA, S. (1992). 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 XIII**, v.13, n.LXXX, p.185-194.

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

BETTENCOURT, A.J.; NORONHA-WAGNER, M. & LOPES, J.(1980). Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. **Broteria Genética XIII**, v.1, n.LXXVI, p.53-58.

BETTENCOURT, A.J.; RODRIGUES, C.J Jr (1988) Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. **Coffee Agron**, v.4, p.199-234.

BRAHAMS, S.; LEE E.; WALKER A.R.; TANNER G.J.; LARKIN P.J.; ASHTON A.R.(2003). The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. **The Plant J**, v.35, n.5, p.624-36.

BRANDALISE, M et al.(2009). The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves. **Plantcellreports**, v. 28, n. 11, p. 1699-1708.

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

BRUGMANS, B.; VAN DER HULST R.G.M.; VISSER R.G.F.; LINDHOUT P.; VAN ECK H.J (2003) A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. **Nucleic Acids Res**, v.31, n.10, p.55.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; TRIGIANO R.N. (1996). **Recovery of DNA Amplification Products from Silver-Stained polyacrylamide Gels. Methods in Molecular Biology**. In White BA, PCR Cloning Protocols-From Molecular Cloning to Genetic Engineering, Humana Press, Totowa, v. 67: p. 111-127.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA A.C.B.; BRITO G.G (2009) **Tipos de marcadores moleculares**. In: Borém A, Caixeta ET (eds) Marcadores moleculares, 2nd edn. Folha de Viçosa, Viçosa, MG. p 11–93

CÉSARI, S.; KANZAKI, H., FUJIWARA, T.; BERNOUX, M., CHALVON, V.; KAWANO, Y.; & KROJ, T. (2014). The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. **The EMBO journal**, v.33, n.17, p. 1941-1959.

CHAVES, G.M. et al. 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.

CHENG, J.; LONG, Y.; KHAN, A.; WEI, C.; FU, S.; & FU, J. (2015). Development and significance of RAPD-SCAR markers for the identification of *Litchi chinensis* Sonn: by improved RAPD amplification and molecular cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.18, n.1, p. 35-39.

COFFEE GENOME HUB, disponível em: <<http://coffee-genome.org/coffeacanephora>> acesso em 27 de maio de 2015.

CRUZ, C. D. Programa para análises de dados moleculares e quantitativos-GQMOL. **Viçosa: UFV, 2008.**

DENOEUDE, F.; CARRETERO-PAULET, L.; DEREEPER, A.; DROC, G., GUYOT, R.; PIETRELLA, M.; & ARGOUT, X. (2014). The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, n.6201, p.1181-1184.

DETTENBORN, G.R. **Investigação de isoflavonas em espécies de leguminosas nativas do sul do Brasil, com ênfase em *Trifolium rio grandense* Burkart.** 2009.123p. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DEVTRAN, Z et al.(2015). Development of molecular markers tightly linked to Pvr4 gene in pepper using next-generation sequencing. **Molecular Breeding**, v. 35, n. 4, p. 1-9.

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

DIOLA, V. **Resistência à ferrugem do cafeeiro: mapeamento genético, físico e análise da expressão gênica em resposta a infecção de *H. vastatrix*.** 2009. 90p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009.

DIOLA, V. et al. (2011). High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. **Tree Genetics & Genomes**, v. 7, n.6, p. 1199-1208.

DREHER, K. et al. (2003). Money matters (I): costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. **Molecular Breeding**. v. 11, n. 3, p. 221-234.

EIBACH, R.; ZYPRIAN, E.; WELTER, L.; & TOPFER, R. (2015). The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. **VITIS-Journal of Grapevine Research**, v.46, n.3, p.120.

FAWKE, S.; DOUMANE, M.; & SCHORNACK, S. (2015). Oomycete Interactions with Plants: Infection Strategies and Resistance Principles. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.79, n.3, p.263-280.

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.

GARÇON, C. L.; ZAMBOLIM, L.; MIZUBUTI, E. S.; VALE, F. D.; & COSTA, H. (2004). Controle da ferrugem do cafeeiro com base no valor de severidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.5, p.486-549.

GERBER, S. et al. (2000). Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Molecular Ecology**, v.9, p.1037-1048.

GICHURU, E. K. et al. (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, v. 57, n. 6, p. 1117-1124.

GODOY, C. V.; BERGAMIN, F.A.; SALGADO, C. L. **Doenças do cafeeiro**. In: Manual de fitopatologia. v. 2, p. 184-200, 1997.

GONZÁLEZ DE COLMENARES, N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R.; ALDANA, J.O. et al. (1998). Isolation, characterization and determination of biological activity of coffee proanthocyanidins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, p. 368-372.

GUERRA-GUIMARÃES, L.G et al. (2015). Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 478.

HERRERA, J. C. et al. (2002). Gene introgression into *Coffea arabica* by way of triploid hybrids (*C. arabica* × *C. canephora*). **Heredity**, v. 89, n. 6, p. 488-494.

HORN, R; KUSTERER, B; LAZARESCU, E; PRUFE, M; FRIEDT, W (2003). Molecular mapping of the Rf1 gene restoring pollen fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Theoretical and applied genetics**, v.106, p.599–606.

HUA, C et al. (2013). Expression patterns of an isoflavone reductase-like gene and its possible roles in secondary metabolism in *Ginkgo biloba*. **Plant cell reports**, v. 32, n. 5, p. 637-650.

INOUE, H.; NOJIMAMA, H.; OKAYAMA, H. High.(1990). Efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96: p. 23-28.

JAMET, E.; ALBENNE, C.; BOUDART, G.; IRSHAD, M.; CANUT, H.; AND PONT-LEZICA, R. (2008). Recent advances in plant cell wall proteomics. **Proteomics**, v.8, p. 893–908.

LASHERMES, P et al. (1997). Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 6-7, p. 947-955.

LEE, H. A.; KIM, S. Y.; OH, S. K.; YEOM, S. I.; KIM, S. B.; KIM, M. S.; & CHOI, D. (2014). Multiple recognition of RXLR effectors is associated with nonhost resistance of pepper against *Phytophthora infestans*. **New Phytologist**, v.203, n.3, p.926-938.

LEHMENSIEK, A et al.(2001). Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, n. 5, p. 797-803.

LEERS, A et al. (1998). The expression of a grapefruit gene encoding an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation. **Plant molecular biology**, v.36, n.6, p. 847-856.

LIGABO, S. G et al. (2015). Status of Coffee Leaf Rust resistance on Kenyan commercial resistant cultivars. **British Microbiology Research Journal**, v. 8, n. 6, p. 655-662.

LIMA, M.L.A et al. (2002). Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p.30-38.

LIU, S. W.; LI, K.; YANG, S. L.; TIAN, S. F.; & HE, L. (2015). Development of a SCAR (Sequence-characterised amplified region) marker for acid resistance-related gene in *Lactobacillus plantarum*. **Extremophiles**, v.19, n.2, p.355-361.

LIU Z. et al. (1998). Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*) and their F1, F2 and backcross hybrids. **Molecular Genetics and Genomics**, v.258, n.3, p.260–268.

LOPES, M.S. et al. (2002). Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biociência**, v.5, n.29, p.56-60.

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.). **Molecular Breeding**, v.21, n.1, p.105–113.

MANDOULAKANI, B. A.; YANIV, E.; KALENDAR, R.; RAATS, D.; BARIANA, H. S.; BIHAMTA, M. R., & SCHULMAN, A. H. (2015). Development of IRAP-and REMAP-derived SCAR markers for marker-assisted selection of the stripe rust resistance gene Yr15 derived from wild emmer wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n.2, p.211-219.

MAURIN, O.; DAVIS, A.P.; CHESTER, M.; MVUNGI, E.F.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y.; FAY, M.F. 2007. Towards a phylog-eny for *Coffea* (Rubiaceae): identifying well-supported line ages based on nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, v.100, n.7, p.1565–1583.

NEGI, M.S.; DEVIC, M.; DELSENY, M.; LAKSHMIKUMARAN, M. (2000). Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n.1-2, p.146-152

NOIR, S et al. (2003). Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, v. 52, n. 1, p. 97-103.

NORONHA-WAGNER, M.; BETTENCOURT, A.J. (1967) Genetic study of resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. I. Identifi cation and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany**, v.45, n.11, p.2021-2031.

OLIVEIRA, A. C. B.; SAKIYAMA, N. S.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; JOSÉ, R.; RUFINO, N.; & ZAMBOLIM, L.(2007). Partial map of *Coffea arabica* L. and recovery of the recurrent parent in backcross progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, n.2, p. 196-203.

OLIVEIRA, A.C.B & PEREIRA, A.A. cultivares de café portadoras de fatores de resistência à ferrugem indicadas para plantio em minas gerais. **Circular Técnica**, Belo Horizonte, 2008.

OLIVEIRA, A. C. B.; PEREIRA, A. A.; SILVA, F. L. D.; Rezende, J. C. D.; Botelho, C. E.; & Carvalho, G. R. (2011). Prediction of genetic gains from selection in *Arabica* coffee progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.11, n.2, p.106-113.

PADMANABHAN, M. S.; & DINESH-KUMAR, S. P. (2014). The conformational and subcellular compartmental dance of plant NLRs during viral recognition and defense signaling. *Current opinion in microbiology*. **Elsevier**, v.20, p. 55-61.

PANIZZI, M.C.C. (1996) Avaliação de cultivares de soja quanto aos teores de isoflavonóides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 691-698.

PARNISKE, M.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; GOLSTEIN, C.; THOMAS, C.M.; JONES, D.A.; HARRISON, K.; WULFF, B.B.H.; JONES, J.D.G.(1997). Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. **Plant cell reports**, v.91, n.6, p.821-832.

PARAN, I. & MICHELMORE, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, n.8, p.985-993.

PEARL, H.M. et al. (2004). Construction of a genetic map for arabica coffee. **Theoretical and applied Genetics** v. 108, n. 5, p. 829-835.

PEREIRA, A.A. **Herança da resistência a Hemileia vastatrix Berk. et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor**. 1995.66p. Tese (doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Viçosa, 1995.

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

PESTANA, K. N.; CAPUCHO, A. S.; CAIXETA, E. T.; DE ALMEIDA, D. P.; ZAMBOLIM, E. M.; CRUZ, C. D.; & SAKIYAMA, N. S. (2015). Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to Hemileia vastatrix in Híbrido de Timor UFV 443-03. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, n.4, p.1-13.

PIRONDI, A.; VELA-CORCÍA, D.; DONDINI, L.; BRUNELLI, A.; PÉREZ-GARCÍA, A.; & COLLINA, M. (2015). Genetic diversity analysis of the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera xanthii* suggests a clonal population structure. **Fungal Biology**. V.119, n.9, p. 791-801.

POLAND, J. (2015). Breeding-assisted genomics. Current opinion in plant biology, **Elsevier**, v.24, p. 119-124.

PONS, C.; MARTÍ, C.; FORMENT, J.; CRISOSTO, C.H.; DANDEKAR, A.M.; GRANELL, A. A.(2014) Bulk Segregant Gene Expression Analysis of a Peach Population Reveals Components of the Underlying Mechanism of the Fruit Cold Response. **PLoS ONE**, v.9, n.3, e90706.

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**, v.109, n.6, p.1311-1317.

PRAKASH, N. S.; GANESH, D. & BHAT, S.S. **Population dynamics of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. Br.) and recent advances in rust research in India. In: Durable resistance to coffee leaf rust**, L. Zambolim, E. M. Zambolim, V. M. P. Varzea (eds.). UFV, Vicososa, Brasil, p. 411-442, 2005.

PRAKASH, N. S. et al. (2011). Marker assisted selection and breeding for leaf rust resistance in coffee (*Coffea arabica* L.) - some recent leads. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)**, v. 71, n. 2, p. 185-189.

PRIMER 3, disponível em: <<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>>, acesso em 20 de fevereiro.

PRIOLLI, R. H.G et al.(2008) Caffeine inheritance in interspecific hybrids of *Coffea arabica* x *Coffea canephora* (Gentianales, Rubiaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 498-504.

RAVICHANDRAN, S.; STONE, S. L.; BENKEL, B.; AND PRITHIVIRAJ, B.(2013) Purple acid phosphatase5 is required for maintaining basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biol**, v.13, n.1, p. 107.

RODRIGUES Jr, C. J.; VARZEA, V. M.; GODINHO, I. L.; PALMA S. and RATO R. C. (1993). **New physiological races of *Hemileia vastatrix***. In: Proceedings of the 15th ASIC colloquium (Montpellier), ASIC, Paris, France, p. 318-321.

ROMERO, G et al (2014) Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timor hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). **Plant Breeding**, v. 133, n. 1, p. 121-129.

ROOSE, M.L.; FANG, D.; CHENG, F.S.; TAYYAR, R.I.; FEDERICI, C.T. & KUPPER, R.S. (2000). Mapping the Citrus genome. **Acta Horticulturae**, v. 535, p.25-32.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; & MANIATIS, T. (1989). **Molecular cloning**. New York: Cold spring harbor laboratory press, vol. 2, pp. 14-9.

SERA, G.H. et al.(2010) Seleção para a resistência à ferrugem em progênie das cultivares de café IPR 99 e IPR 107. **Bragantia**, v.69, n.3, p.547-553.

SEVERINO, F.E. **Isolamento e caracterização de um gene que codifica uma isofalvona redutase like de café (*Coffea arábica* L.) e análise de sua região promotora**. 2008. 94p. Dissertação (mestrado em em Ciências Biológicas, área de Concentração: Genética)- Universidade Estadual Paulista - Botucatu (SP)-2008

SHUDO, A et al.(2013) Development of CAPS markers and their application in breeding for mango, *Mangifera indica* L. **Euphytica**, v. 190, n. 3, p. 345-355.

STEINBRENNER, A. D.; GORITSCHNIG, S.; & STASKAWICZ, B. J. (2015). Recognition and Activation Domains Contribute to Allele-Specific Responses of an Arabidopsis NLR Receptor to an Oomycete Effector Protein. **PLoS pathogens**, v.11, n.2, e1004665.

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

TEIXEIRA-CABRAL, T .A et al. (2004) Single-locus inheritance and partial linkage map of *Coffea arabica* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 416-421.

TOYOTA, M. **Indutores de resistência e os eventos bioquímicos de defesa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix***. 2014.94p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras-2014

URRUTIA, M.; BONET, J.; ARÚS, P.; & MONFORT, A. (2015). A near-isogenic line (NIL) collection in diploid strawberry and its use in the genetic analysis of morphologic, phenotypic and nutritional characters. **Theoretical and Applied Genetics**, v.128, p.1-15.

VÁRZEA, V.M.P.; RODRIGUES JR, C.J.; SILVA, M.C.M.L.; GOUVEIA, M.; MARQUES, D.V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: UFV, 2002. p.297-320.

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

VECSCREEN: Screen a Sequence for Vector Contamination, disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>> acesso em 18 de fevereiro de 2015.

WINKEL-SHIRLEY B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*, **Elsevier**, v.5, n.3, p. 218–23.

WU, Z. G.; JIANG, W.; MANTRI, N.; BAO, X. Q.; CHEN, S. L.; & TAO, Z. M. (2015). Transcriptome analysis reveals flavonoid biosynthesis regulation and simple sequence repeats in yam (*Dioscorea alata* L.) tubers. **BMC genomics**, v.16, n.1, p.346.

YANG, X.; ZHOU, X.; WANG, X., LI, Z.; ZHANG, Y.; LIU, H.; & MA, Z. (2015). Mapping QTL for cotton fiber quality traits using simple sequence repeat markers, conserved intron-scanning primers, and transcript-derived fragments. **Euphytica**, v.201, n.2, p.215-230.

YANIV, E.; RAATS, D.; RONIN, Y.; KOROL, A. B.; GRAMA, A.; BARIANA, H.; & FAHIMA, T. (2015). Evaluation of marker-assisted selection for the stripe rust resistance gene Yr15, introgressed from wild emmer wheat. **Molecular Breeding**, v. 35, n.1, p.1-12.

YOHANNES, T.; Tesfamichael, A.; Kiambi, D.; Folkertsma, R.; Hash, C. T.; Ngugi, K.; & de Villiers, S. (2015). Marker-assisted introgression improves Striga resistance in an Eritrean Farmer-Preferred Sorghum Variety. **Field Crops Research**, v.173, p. 22-29.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V. (2000) Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. **Plant breeding**, v. 119, n.5, p. 411-415.

YUAN, Y.; MIAO, J.; TAO, Y.; JI, C., DU, P.; WANG, J.; & LIANG, G. (2015). Identification and fine mapping of qPH6, a novel major quantitative trait locus for plant height in rice. **Molecular Breeding**, v.35, n.1, p.1-11.

ZACCARO, R.P et al. (2007) Use of molecular marker SCAR in the identification of Fusariumsubglutinans, causal agent of mango malformation. **Revista brasileira de fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 563-570.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. Controle integrado das doenças de hortaliças. In: **Controle integrado das doenças de hortaliças**. 1997.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. (1974.) Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de Hemileia vastatrix Berk. et Br. e Uromyces phaseolityca Arth. **Experientiae**, v.17, p.151-184.

ZAMBOLIM L.; VALE F.X.R.; PEREIRA A.A.; CHAVES G.M (1999) Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: Zambolim L (ed). **Produção de café com qualidade**. UFV, Viçosa, p.134–215.

ZHANG, P.; ZHOU, H.; LAN, C.; LI, Z.;& LIU, D. (2015). An AFLP marker linked to the leaf rust resistance gene LrBi16 and test of allelism with Lr14a on chromosome arm 7BL. **The Crop Journal**, v.3, n.2, p.152-156.