



CLÁUDIO OGOSHI

**INFECTIVIDADE DE COLLETOTRICHUM E
RESISTÊNCIA DO CAFEIRO À MANCHA
MANTEIGOSA**

LAVRAS – MG

2014

CLÁUDIO OGOSHI

**INFECTIVIDADE DE COLLETOTRICHUM E RESISTÊNCIA DO
CAFEEIRO À MANCHA MANTEIGOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Mario Sobral de Abreu

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Ogoshi, Cláudio.

Infectividade de *Colletotrichum* e resistência do cafeeiro à
mancha manteigosa / Cláudio Ogoshi. – Lavras : UFLA, 2014.
111 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: Mário Sobral de Abreu.
Bibliografia.

1. *Coffea arabica* L. 2. Antracnose. 3. Projeto Genoma Café. 4.
Banco de germoplasma. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 633.7394

CLÁUDIO OGOSHI

**INFECTIVIDADE DE COLLETOTRICHUM E RESISTÊNCIA DO
CAFEIEIRO À MANCHA MANTEIGOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA
Dr. Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros	UFLA
Dr. Samuel Pereira de Carvalho	UFLA
Dra. Sônia Maria de Lima Salgado	EPAMIG

Dr. Mario Sobral de Abreu
Orientador

LAVRAS – MG

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me ajudado a entender que os estudos seriam a forma mais adequada para eu seguir meu caminho e retribuir os esforços que meus pais fizeram por mim. Agradeço imensamente a eles por tanta luta e sofrimento para que eu chegasse até aqui.

À minha esposa Rosana, pelo companheirismo e pelo apoio durante os momentos mais difíceis do doutorado e por ter me dado a coisa mais valiosa desse mundo que é a nossa filha Helena. À minha irmã Iêda e sobrinha Rafaella.

À minha sogra, pela imensa ajuda nos cuidados com minha filha. À toda minha família, pelo apoio.

Ao meu orientador e amigo, Dr. Mario Sobral de Abreu, pela compreensão, ajuda, motivação e confiança.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo à pesquisa por meio da concessão das bolsas de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto.

Aos professores, Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, Dr. Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros e Dr. Samuel Pereira de Carvalho e a pesquisadora Dra. Sônia Maria de Lima Salgado, pela disposição e colaboração para o melhoramento do meu trabalho.

Aos demais Professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pelos ensinamentos durante a pós-graduação.

A todos os meus amigos e funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela grande colaboração.

RESUMO GERAL

Objetivou-se, neste trabalho, verificar a viabilidade e suscetibilidade de mudas de cafeeiro, obtidas de plantas com mancha manteigosa (GOPD), a *Colletotrichum* sp; analisar a reação de acesso de cafeeiros ao patógeno e identificar possíveis marcadores moleculares envolvidos na interação *Colletotrichum* x Cafeeiro. Na primeira parte deste trabalho, frutos foram colhidos de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa e a sementeira realizada em bandejas, contendo substrato esterilizado. No primeiro ensaio, avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas e de mudas e plântulas viáveis. No segundo ensaio, dez cultivares comerciais e uma cultivar originada de plantas com mancha manteigosa foram inoculadas para a avaliação da severidade da antracnose. Já na segunda parte deste trabalho, 30 acessos de cafeeiro foram inoculados com *Colletotrichum* sp. Avaliou-se a severidade da doença, obtendo-se o Índice de Intensidade de Doenças (IID), sendo os genótipos classificados como: Resistente, Moderadamente Resistente, Moderadamente Suscetível e Suscetível. Além disso, avaliou-se o progresso da doença para obter a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Realizou-se o teste de correlação de Pearson para as duas variáveis. Na última e terceira parte deste trabalho, utilizaram-se 24 acessos de cafeeiro já classificados à reação ao *Colletotrichum*, obtidos na segunda parte. Realizou-se a extração do DNA das folhas para a realização da reação de PCR na qual se utilizaram 59 pares de *primers* já publicados na literatura derivadas do projeto genoma café. Não houve diferença quanto à germinação das sementes. Porém, a viabilidade das plântulas e das mudas foi reduzida nas GOPDs. Essas apresentaram sintomas da mancha manteigosa, necrose nas folhas e nos hipocótilos, murcha e morte. A cultivar Catuaí Vermelho (GOPD) foi altamente suscetível à antracnose, apresentando a maior AACPD. Apenas dois acessos apresentaram-se como resistentes, o MG1062 (Iapar 59) e o MG0245 (Obatã Tardio). Como moderadamente resistentes, houve 11 acessos como o MG0225 (Iapar 59 polispermia) e o MG1043 (Sarchimor UFV 349-28). Foram classificados nove acessos como moderadamente suscetíveis, sendo a maioria Híbridos de Timor. Os acessos suscetíveis foram oito, destacando-se os genótipos provenientes de Mundo Novo. Houve uma alta correlação (0,937) entre a AACPD e o IID, podendo-se optar por uma das duas variáveis para avaliação da resistência. Dentre os *primers* que foram testados visando à obtenção de marcadores moleculares, 43 foram amplificados. Desses, doze foram monomórficos. No presente trabalho não se encontraram *primers* polimórficos.

Palavras-Chave: Sintomatologia. Projeto genoma café. *Coffea arabica* L. Resistência genética. Antracnose. Marcadores moleculares.

GENERAL ABSTRACT

The goals of this research were to verify the susceptibility of coffee seedlings from infected plants with blister spot to *Colletotrichum* sp; analyzing the reaction of coffee's access to the pathogen and identify potential molecular markers involved in the *Colletotrichum* x Coffee interaction. In the first part of this study, fruits were harvested from plants with and without symptoms of blister spot and they were sowed in trays containing sterilized substrate. In the first trial, we evaluated the percentage of germinated seeds and viable seedlings. In the second one, ten commercial cultivars and one cultivar obtained from plants with blister spot symptoms, were inoculated and assessed for the severity of *Colletotrichum* sp. In the second part of this study, 30 accessions of coffee were inoculated with *Colletotrichum* sp. The disease severity was evaluated and it resulted in the Intensity Index of Diseases (IID), where with the genotypes were classified as resistant, moderately resistant, moderately susceptible and susceptible. Furthermore, we estimated the disease progress by the Area Under Disease Progress Curve (AUDPC). We conducted Pearson correlation test for both variables, IID and AUDPC. In the third and last part of this work, we used 24 accessions of coffee previously ranked regarding the reaction to *Colletotrichum*, as showed in the second part. We carried out DNA extraction from leaves to do the PCR reactions and we used 59 pairs of primers already published in the literature derived from the coffee genome project. There was no difference in seed germination, however, the viability of seedlings were reduced in GOPDs. These showed symptoms of blister spot, necrosis in leaves and hypocotyls, wilting and death. The Catuaí Vermelho (GOPD) was highly susceptible to anthracnose, it presented the greatest AUDPC. Only two accessions were classified as resistant, MG1062 (Iapar 59) and MG0245 (Obatã Tardio). As moderately resistant, there were 11 accessions like MG0225 (Iapar 59 poliespermia) and MG1043 (Sarchimor UFV 349-28). Nine accessions were classified as moderately susceptible and most of them were relative to Timor hybrid. The susceptible accessions were eight, highlighting genotypes from Mundo Novo. There was a high correlation (0.937) between AUDPC and IID, and it allows us to opt for one of them to assessment the resistance. Considering the primers were tested aiming to obtain molecular markers, 43 were amplified and twelve of them showed monomorphic patterns. In the present study, we did not find polymorphic primers which could classify the accessions in different categories

Keywords: Symptoms. Coffee genome project. *Coffea arabica* L. Genetic resistance. Anthracnose. Molecular markers.

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Principais sintomas de mancha manteigosa, observados nas plântulas e mudas de cafeeiro que foram originados de sementes provenientes de plantas com sintomas da doença.....45
- Figura 2 Isolamento, identificação e teste de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* sp., obtidos de plantas originadas de sementes de plantas com mancha manteigosa47
- Figura 3 Sintomas de antracnose apresentados por alguma cultivares de cafeeiro em resposta a inoculação com *Colletotrichum* spp. isolado de plantas com sintomas da mancha manteigosa50

CAPÍTULO 3

ANEXO A

- Figura 1 Sintomas de necrose nos diferentes acessos inoculados com *Colletotrichum* sp. aos 20 dias após a inoculação84
- Figura 2 Sintomas de necrose nos diferentes acessos inoculados com *Colletotrichum* sp. aos 20 dias após a inoculação85

CAPÍTULO 4

ANEXO A

- Figura 1 Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados dos genótipos de cafeeiro resistentes (A e B); moderadamente resistentes (C-M); moderadamente suscetíveis (N-R) e suscetíveis (S-W) pelos iniciadores: (A) CARF 003, (B) CARF 020, (C) 005 e (D) CARF 006 107

Figura 2 Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados dos genótipos de cafeeiro resistentes (A e B); moderadamente resistentes (C-M); moderadamente suscetíveis (N-R) e suscetíveis (S-W) pelos iniciadores: (A) CARF 025, (B) CARF 056, (C) 042 e (D) CARF 012 108

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1 Descrição das Bibliotecas de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) do Projeto Brasileiro do Genoma Café (VIEIRA et al., 2006).....24

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Critérios de avaliação do espectro de reação ao *Colletotrichum* spp., em folhas de café.....41
- Tabela 2 Percentual (%) de Germinação de sementes, viabilidade de plântulas e de mudas provenientes de sementes de plantas, com presença e ausência de sintomas da mancha manteigosa.....43
- Tabela 3 Área Abaixo da Curva de Progresso da Antracnose (AACPD) das 11 cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) inoculadas com *Colletotrichum* sp.....49

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Identificação dos acessos do Banco de Germoplasma de Café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Patrocínio, Minas Gerais, designação e detalhamento da localização dos respectivos genótipos64
- Tabela 2 Critérios de avaliação do espectro de reação a *Colletotrichum* spp., em folhas de café.....67
- Tabela 3 Classificação dos genótipos inoculados com *Colletotrichum* spp.....70

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Identificação dos acessos utilizados para a extração do DNA e aplicados na reação de PCR junto com os <i>primers</i> desenhados por Alvarenga et al. (2011), para a verificação da amplificação dos fragmentos em gel de eletroforese.....	91
Tabela 2	Produtos da amplificação de 59 pares de <i>primers</i> (CARFs) obtidos a partir de sequências expressas tipo EST-PCR para 24 acessos. (A e B)= Acessos resistentes; (C-M)= moderadamente resistentes; (N-R) moderadamente suscetíveis e (S-W) suscetíveis	96

ANEXO A

Tabela 3	Iniciadores obtidos a partir das sequências ESTs mineradas do Projeto Genoma Café (Alvarenga et al. 2011).....	109
----------	--	-----

SUMÁRIO

CAPITULO 1 Introdução Geral.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 <i>Colletotrichum</i> spp. em cafeeiro.....	16
2.2 Cultivares de cafeeiro resistentes a <i>Colletotrichum</i> spp.....	18
2.3 Marcadores moleculares no melhoramento de plantas.....	20
2.4 Banco de germoplasma de café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- EPAMIG.....	22
2.5 Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBG-C).....	23
REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO 2 Viabilidade e suscetibilidade de mudas de cafeeiro, oriundas de sementes de plantas com mancha manteigosa, ao <i>Colletotrichum</i> spp.....	33
1 INTRODUÇÃO.....	35
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Experimento I- Germinação de sementes e viabilidade das plântulas e mudas, oriundas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa.....	37
2.2 Experimento II- Suscetibilidade de mudas, oriundas de sementes de plantas com mancha manteigosa, a <i>Colletotrichum</i> spp.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1 Experimento I- Germinação de sementes e viabilidade das plântulas e mudas formadas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa.....	43
3.2 Experimento II- Suscetibilidade de mudas, oriundas de sementes de plantas com mancha manteigosa, ao <i>Colletotrichum</i> sp.....	48
4 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
CAPÍTULO 3 Reação de acessos de cafeeiro a <i>Colletotrichum</i> spp..	58
1 INTRODUÇÃO.....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1 Obtenção do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp.....	62
2.2 Obtenção dos acessos de café.....	62
2.3 Preparo das mudas para a inoculação.....	66
3 RESULTADOS.....	69
4 DISCUSSÃO.....	73
5 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	80

CAPÍTULO 4 Identificação de marcadores moleculares	
	envolvidos na interação <i>Colletotrichum</i> x cafeeiro 86
1	INTRODUÇÃO 88
2	MATERIAL E MÉTODOS 90
2.1	OBTENÇÃO DOS ACESSOS DE CAFEEIRO 90
2.2	EXTRAÇÃO DO DNA 92
3	RESULTADOS 95
4	DISCUSSÃO 100
5	CONCLUSÃO 103
	REFERÊNCIAS 104

CAPITULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é de extrema importância para a economia brasileira, tendo o agronegócio grande representatividade no PIB e nas exportações totais do país. Nesse cenário, a cafeicultura tem se destacado, pois o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, sendo uma das principais atividades agrícolas do País, especialmente pela geração de emprego e renda em municípios interioranos dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Bahia, Rondônia, Rio de Janeiro entre outros.

O grande desafio atual para a cafeicultura brasileira é a produção de um produto diferenciado, visto que o mercado nacional e internacional aumentou as exigências quanto à qualidade do café. Entretanto, diversos fatores vêm aumentando esse desafio, como por exemplo, o ataque de pragas e doenças.

Dentre as doenças têm destaque aquelas de enfermidades fúngicas, as quais ocorrem desde o viveiro até o campo de produção. Entre essas destacam-se a ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*); antracnoses (*Colletotrichum* spp.); cercosporiose (*Cercospora coffeicola*); mancha de phoma (*Phoma* spp.), entre outras.

No Brasil, as lavouras vêm sendo acometidas por doenças causadas por *Colletotrichum* spp., como por exemplo, as antracnoses em folhas e frutos, mancha manteigosa e a seca de ponteiros. Dentre essas, a mais grave é a mancha manteigosa, pois os cafeeiros doentes têm sua produção totalmente afetada, o que pode ser observado pela morte de hipocótilos, mumificação e abscisão de folhas e frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos (FERREIRA et al., 2010).

A etiologia da doença tem sido atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, encontrado em todos os órgãos do cafeeiro com sintoma foliares da doença (FERREIRA et al., 2009; LINS; ABREU; ALVES, 2007; OROZCO, 2003; PEREIRA et al., 2009). Além disso, há relatos de que as plântulas oriundas de sementes colhidas de plantas com sintomas foliares da mancha manteigosa são mais suscetíveis à predisposição da doença e que a mesma pode ser transmitida via sementes infectadas (FERREIRA et al., 2010; MAIA et al., 2013; OROZCO, 2003).

São poucos os trabalhos encontrados na literatura com o patossistema *Colletotrichum* - cafeeiro no Brasil, com isso, pouco se conhece sobre os danos reais que esse patógeno provoca na cafeicultura e conseqüentemente quais seriam as formas de manejo mais adequado. Sera et al. (2005b) mencionam que o controle químico, embora pareça ser eficiente para o manejo da antracnose, é pouco utilizado no Brasil, pois, os períodos críticos de controle são da floração até o estágio de fruto expandido, aumentando o custo de produção pois não coincide com o controle de outras doenças como a ferrugem alaranjada.

Outro problema com o controle químico é que o processo produtivo agrícola sofre pressão da sociedade pela produção de alimentos de forma sustentável e sem resíduos de produtos químicos. Com isso, existe uma busca contínua por alternativas que sejam capazes de auxiliar no controle de doenças, mas que não representem risco ao homem e ao meio ambiente. Nesse contexto, o uso de cultivares resistentes é a alternativa preferencial por ser o método de menor custo, mais fácil, mais eficaz e mais seguro para o manejo das doenças.

Entretanto, são escassas as informações sobre cultivares portadoras de mecanismos de resistência eficientes a *Colletotrichum* spp. no Brasil e quais os possíveis genes envolvidos na interação desse patógeno com o cafeeiro. Trabalhos que visam selecionar germoplasmas de cafeeiro resistentes ao patógeno são de grande importância, pois constituem a primeira etapa a ser

realizada em um programa de melhoramento genético, visando resistência às doenças.

Objetivou-se, neste trabalho: verificar a viabilidade e suscetibilidade de mudas de cafeeiro, obtidas de plantas com mancha manteigosa, a *Colletotrichum* spp; analisar a reação de acesso de cafeeiros ao patógeno e identificar possíveis marcadores moleculares envolvidos na interação *Colletotrichum* x Cafeeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Colletotrichum* spp. em cafeeiro

A primeira descrição de *Colletotrichum* em cafeeiro foi feita por Noack, em 1901, referente a um isolado do Brasil, denominado de *Colleotrichum coffeanum*. No Kenya, em 1926, foi relatada a variante “virulans” de *Colletotrichum* em café, associada a “*Coffee Berry Disease*” (MCDONALD, 1926).

Vários autores relatam que espécies de *Colletotrichum* spp. ocorrem como saprófitas e parasitas, em todas as regiões do mundo produtoras de café. Os principais sintomas observados estão associados à antracnose, seca de ponteiro, queima dos frutos, mancha manteigosa e à doença da baga do café: *Coffee Berry Disease (Colletotrichum Kahawae)*. No Quênia e em outros países da África, essa doença é o principal fator limitante à produção dos cafeeiros, podendo levar a uma redução na produtividade entre 50 a 80 % (SILVA et al., 2012). O fungo infecta frutos verdes, em todos os estádios de desenvolvimento, os quais podem cair prematuramente ou permanecerem mumificados na planta (CHEN, 2002).

No Brasil, as lesões mais críticas e prejudiciais para o cafeeiro são aquelas nas quais o fungo (*Colletotrichum* spp.) incide sobre as gemas, flores e chumbinho, provocando a morte e queda, bem como, o enegrecimento e morte dos ramos (PARADELA FILHO et al., 2001). Esses autores relataram que, espécies de *Colletotrichum* encontram-se presentes em, praticamente todas as plantas de café, ocorrendo sob três diferentes formas: patogênica, que se desenvolve em condições de alta umidade e temperaturas amenas; pouco agressiva, considerada sua forma normal para sobrevivência na planta; e a forma

saprofítica, na qual podem ser desenvolvidas estruturas que podem ser importantes fontes de inóculo, para disseminação do patógeno.

Espécies de *Colletotrichum*, colonizando os tecidos de cafeeiros no Brasil, são consideradas de importância secundária por alguns pesquisadores, porém, a ocorrência de danos ocasionados por essa espécie na cultura do café, em Minas Gerais, está aumentando com o passar dos anos, fato que se torna preocupante, visto que é o estado maior produtor da cultura no País. Ferreira, Abreu e Pereira (2005), avaliaram a incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de cafeeiro, em diferentes estádios fisiológicos e relataram que a incidência não diferiu entre os estádios de formação do fruto que, na média, atingiu 86% de colonização, com 90,5% no estágio chumbinho e 82,0% no estádios verde-cana. Esses resultados evidenciaram a presença de colonização endofítica desse fungo, fato que pode vir a ser um problema sério para a cultura do café.

A interação entre *Colletotrichum* spp. e plântulas de cafeeiro é muito variável, dependendo sobretudo da suscetibilidade do hospedeiro, da variabilidade genética dos isolados e do período necessário para a expressão dos sintomas após inoculação (FERREIRA et al., 2004). A doença mais estudada até o presente momento, causada pelo complexo *Colletotrichum*, é a mancha manteigosa. A primeira descrição dessa enfermidade foi feita na Costa Rica, acreditando ser uma doença de natureza virótica (WELLMAN, 1957). Em 1972, a etiologia da doença foi elucidada como sendo de origem fúngica, cujo patógeno era *Colletotrichum* spp. (VARGAS; GONZALES, 1972). Esses autores iniciaram o estudo da doença, mas como não conseguiram reproduzir os sintomas inoculando o patógeno, sugeriram que, provavelmente, essa doença poderia ser condicionada por um caráter genético, o qual refletia na suscetibilidade da planta.

No Brasil, a doença foi descrita primeiramente no estado de São Paulo (BITANCOURT, 1958) e, posteriormente, foram relatados novos focos, em

outros estados brasileiros. No Espírito Santo foi detectada a doença em *Coffea canephora* (MANSK; MATIELLO, 1977) e em Minas Gerais, no ano de 1999, foi constatada perda total da produção, em uma lavoura no município de Cristais (OROZCO, 2003). Dias (2002) verificou que o isolado proveniente da mancha manteigosa foi patogênico em hipocótilos e constatou que o agente causal da mancha manteigosa era *Colletotrichum gloeosporioides*. Com isso, a etiologia da doença tem sido confirmada e atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, encontrado em todos os órgãos do cafeeiro com sintoma foliares da doença (FERREIRA et al., 2009; LINS et al., 2007; OROZCO, 2003; PEREIRA et al., 2009). Diversos autores mencionam sintomas iniciais da mancha manteigosa surgindo em folhas novas, com o aparecimento de mancha de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro. Em estágios avançados, as manchas apresentam coloração verde-pálida a amarela e bordas irregulares. Por fim, as manchas coalescem, determinando queda prematura das folhas (MANSK; MATIELLO, 1977; VARGAS; GONZÁLES, 1972; WELLMAN, 1957). Ataques intensos são observados em folhas e ramos novos de plantas adultas, ocorrendo necrose e seca de ramos na parte apical, podendo levar à morte das plantas de forma descendente (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009).

2.2 Cultivares de cafeeiro resistentes a *Colletotrichum* spp.

Grande parte dos trabalhos relacionados à resistência do cafeeiro a *Colletotrichum* spp. têm sido realizados em países onde a CBD ocorre visando resistência ao *Colletotrichum Kahawae*. A rápida expansão do CBD na África Oriental fez com que países, como o Quênia e a Tanzânia, desenvolvessem programas de hibridação para a obtenção de progênies, que combinassem bons

rendimentos com a resistência ao CBD e à ferrugem alaranjada (SILVA et al., 2006).

Segundo Sera et al. (2008), muitos trabalhos relatam a ocorrência da resistência parcial ao *Colletotrichum kahawae*, entretanto pouco se sabe sobre a resistência ao *Colletotrichum* spp. no Brasil. O mesmo autor encontrou diferentes níveis de resistência parcial à necrose dos frutos associada à presença de *Colletotrichum* spp., em avaliações de campo, nas cultivares e seleções de *Coffea arabica*. Sera et al. (2005a) avaliaram a correlação entre a ocorrência de *Colletotrichum* spp e outras características agronômicas, em cafeeiro no estado do Paraná e encontraram a correlação positiva com a maturação dos frutos, pois cafeeiros mais precoces tiveram a maior incidência do patógeno. Além disso, a ocorrência do fungo também foi positiva com relação à característica de porte da planta; esse fato pode estar relacionado com o vento, pois o mesmo ocasiona mais ferimentos em cafeeiros de porte maior, facilitando a infecção do patógeno (PARADELA FILHO et al., 2001).

Dorizzotto (1993), através de testes em plântulas e em frutos verdes destacados encontrou suscetibilidade a um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides*, em progênies de Catimor, Sarchimor, Cavimor e na cultivar Mundo Novo 379-19. Orozco (2003) constatou, em testes de resistência para frutos verdes, que as cultivares Mundo Novo IAC 319-19, Rubi MG 1192, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Acaiá Cerrado MG 1474 e Katipó, apresentaram maior número de frutos necrosados que as cultivares Apoatã, Icatu IAC 382, Catucaí Vermelho e Tupi IAC 1669-33.

A grande preocupação até o momento é que, no Brasil, 95% da área cultivada com café arábica é composta por cultivares de germoplasma de Catuaí e Mundo Novo, representando um grande problema, já que essas duas cultivares, aparentemente, não são resistentes a *Colletotrichum* sp., podendo ter severas perdas de produção na cafeicultura brasileira (SERA et al., 2008).

Marques (2009), estudou a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum*, em frutos verdes de cafeeiro, relatando a variabilidade na reprodução dos sintomas de antracnose, entre as diferentes cultivares de cafeeiros utilizadas, onde a cultivar IAPAR 59 mostrou maior resistência dentre as utilizadas. Sera et al. (2005b), estudaram a resistência de cultivares de *Coffea arabica* L. a *Colletotrichum* spp. em campo, e encontraram diferentes níveis de resistência parcial à necrose de frutos associada à presença do patógeno, variando desde altamente suscetível até moderadamente resistentes. Esses autores concluíram que está ocorrendo segregação para a resistência à necrose de frutos, dentro das cultivares e seleções dos germoplasmas Sarchimor, Catucaí, Icatu e Catuaí.

2.3 Marcadores moleculares no melhoramento de plantas

Marcadores de DNA (moleculares) são aqueles que revelam diferenças, em alguns sítios no DNA. São os marcadores mais utilizados devido à sua abundância, pois surgem de diferentes tipos de mutações no DNA, como substituição, inclusão ou exclusão de bases e erros na replicação (COLLARD et al., 2005). Ao contrário dos marcadores morfológicos e bioquímicos, os marcadores moleculares não são afetados por fatores ambientais e pelo estágio de desenvolvimento da planta (WINTER; KAHL, 1995). De acordo com Milach (1998), marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. A grande vantagem desses marcadores, como a maior rapidez na obtenção dos resultados e a maior confiabilidade dos dados, fez com que os mesmos se tornassem uma ferramenta importante no melhoramento genético de plantas (ALVARENGA, 2007).

A utilização de marcadores moleculares vêm auxiliando em várias etapas do melhoramento, dentre elas: na conservação de bancos de

germoplasmas; caracterização de germoplasmas para identificar genes envolvidos em processos específicos e determinar a variabilidade genética disponível; escolha de genitores para cruzamentos e formação de populações; planejamento da estratégia de melhoramento; certificação de cruzamentos e seleção assistida por marcadores moleculares (MILACH, 1998).

Marcadores de DNA, quando conseguem revelar diferenças entre indivíduos da mesma ou de diferentes espécies são chamados de marcadores polimórficos, enquanto que os marcadores que não conseguem discriminar diferenças entre os genótipos são chamados de marcadores monomórficos (COLLARD et al., 2005).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, de acordo com a metodologia para identificá-los: hibridização ou amplificação do DNA, via PCR (ALVARENGA, 2007). Dentre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação de DNA incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) ou ASA (*Amplified Specific Amplicon*); Microsatelite (ou SSR- *Simple Sequence Repeats*); e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (MILACH, 1998).

O sequenciamento do DNA facilitou o desenvolvimento e a identificação de alguns tipos de marcadores moleculares os quais incluem marcadores *Expressed Sequence Tag-Polymerase Chain Reaction* (EST-PCR). Essas sequências representam uma fonte valiosa para o desenvolvimento de marcadores moleculares, pois são derivados de regiões transcritas do genoma (PASHLEY et al., 2006). Várias são as vantagens na utilização desses marcadores em estudos genéticos, pois eles marcam genes expressos, sendo

particularmente úteis para o mapeamento de QTLs (ALVARENGA, 2007). Segundo Rowland et al. (2003), se um marcador EST-PCR é encontrado ligado a um QTL é possível que o gene, a partir do qual o marcador EST-PCR foi derivado, controle a característica em questão.

2.4 Banco de germoplasma de café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- EPAMIG

Os bancos ativos de germoplasmas são importantes fontes para o melhoramento genético do cafeeiro, pois preservam variedades selvagens, antigas ou espécies aparentadas que apresentam genes para características agronomicamente desejáveis, como por exemplo, resistência à pragas e doenças (GUEDES, 2013).

O banco de germoplasma de café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) está instalado na Fazenda Experimental da EPAMIG, em Patrocínio-MG, região do Alto Paranaíba. Os materiais genéticos, incluídos no banco de germoplasma, foram coletados pelo pesquisador Dr. Antônio Alves Pereira, em regiões cafeeiras do Brasil e diversas instituições de pesquisas nacionais e internacionais, selecionando sempre os genótipos que apresentavam variabilidade genética de interesse (GUEDES, 2013).

A coleta dos recursos genéticos do respectivo banco de germoplasma foi realizada na forma de sementes, colhendo-se em plantas individuais ou em várias plantas da população, de modo a representar a variabilidade genética do material que estava sendo coletado. As sementes foram coletadas em plantas com idades variadas, merecendo destaque especial para as seleções de Bourbon, e a idade das plantas variou de 2,5 a mais de 150 anos. O espaçamento entre plantas é de 3,5 x 0,8 e o número de plantas por acesso varia de 16 a 20, divididas em duas repetições. A primeira repetição de cada lote foi plantada,

seguindo a ordem numérica de registro dos acessos e, na segunda repetição, os acessos foram casualizados entre si.

Neste banco de germoplasma estão conservados diversos genótipos da espécie *Coffea arabica* formado, basicamente, pelas linhagens da maioria das cultivares comerciais (EIRA et al., 2007). O banco possui exemplares das cultivares mais antigas como, por exemplo, a Típica, Bourbon Vermelho, Bourbon Amarelo, Caturra Vermelho, Caturra Amarelo, Sumatra, Amarelo de Botucatu, Maragogipe, Villa Sarchi, San Ramon, Pacas, São Bernardo, bem como maior número de seleções de Híbrido de Timor, existentes no Brasil e progênies promissoras das diversas populações denominadas genericamente de Catimor, Sarchimor, Cavimor, Cachimor, Catindu e outras seleções portadoras dos fatores de resistência à ferrugem SH1, SH2, SH3 e SH4 simples ou associados (EIRA et al., 2007).

2.5 Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC)

O projeto Brasileiro do Genoma Café foi formulado em 2002, por iniciativa do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), coordenado pela Embrapa Café, e auxiliado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Um dos principais objetivos do projeto foi criar ferramentas úteis e importantes para a descoberta de novos genes e análise da evolução do genoma do café. Para isso, foram sequenciados 214.964 clones escolhidos de 37 bibliotecas de cDNA de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* (Tabela 1), resultando em 130.792, 12.381 e 10.566 sequências de cada espécie, respectivamente, após processo de triagem. Os ESTs foram agrupados em 17.982 *contigs* e em 32.155 *singletons*, resultando na

identificação de mais de 30 mil unigenes (sequências que representam um único gene) diferentes (ALVARENGA, 2007; VIEIRA et al., 2006).

Os resultados de anotação das sequências foram armazenados em duas plataformas de bioinformática. A primeira foi desenvolvida pelo Laboratório de Genômica e Expressão- LGE e a outra plataforma foi criada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen (ALVARENGA, 2007; VIEIRA et al., 2006).

Tabela 1 Descrição das Bibliotecas de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) do Projeto Brasileiro do Genoma Café (VIEIRA et al., 2006)

Bibliotecas	Tecidos/Estádios de desenvolvimento	Numero de reads
AR1, LP1	Plântulas e Folhas tratadas com ácido araquidônico	5664
BP1	Células em suspensão tratadas com Acibenzolar-S-Metyl	12379
CB1	Células em suspensão tratadas com Acibenzolar-S-Metyl e brassinosteróides	10311
CL2	Hipocótilos tratados com Acibenzolar-S-Metyl	11615
CS1	Células em suspensão tratadas com NaCl	10803
EA1, IA1, IA2	Calos embriogênicos	9191
EB1	Embrião de frutos imaturos	192
EC1	Calos embriogênicos de <i>Coffea canephora</i>	8050
EM1, SI3	Embrião de sementes germinando	9201
FB1, FB2, FB4	Botão floral em diferentes estádios de desenvolvimento	23036
FR1, FR2	Botão floral + Chumbinho + Frutos em diferentes estádios	14779
FR4	Frutos (<i>Coffea racemosa</i>)	796
FV2	Frutos nos estádios 1, 2 e 3 (<i>Coffea racemosa</i>)	7195
CA1, IC1, PC1	Calos não embriogênicos com e sem 2,4 D	12135
LV4, LV5	Folhas novas de ramos ortotrópicos	15067
LV8, LV9	Folhas maduras de ramos plagiotropicos	11864
NS1	Raízes infectadas com nematóides	569

“Tabela 1, conclusão”

Bibliotecas	Tecidos/Estádios de desenvolvimento	Numero de reads
PA1	Calos primários embriogênicos	2483
RM1	Folhas infectadas com ferrugem e bicho mineiro	5567
RT3	Raízes	560
RT5	Raízes com Acibenzolar-S-Metyl	2311
RT8	Raiz e células em suspensão na presença de alumínio	9119
RX1	Ramos infectados com <i>Xylella</i>	9563
SH1	Folhas de plantas com estresse hídrico (<i>Coffea canephora</i>)	7368
SH2	Estresse hídrico no campo (pool de tecidos)	6824
SS1	Condições normais - irrigado (pool de tecidos)	702

O sequenciamento em larga escala de cDNA, para produzir *Expressed Sequence Tags* (ESTs) e comparando-se as sequencias resultadas, com outras bases de dados públicas, esse sequenciamento tem se tornado um método rápido e de custo efetivo para a geração de dados sobre a capacidade de codificação do genoma e para identificação de novos genes potenciais (VIEIRA et al., 2006). As informações geradas pelo sequenciamento desses genomas têm facilitado e acelerado a identificação de genes responsáveis por características agrônômicas desejáveis.

Esta informação básica fornece um recurso valioso para estudos da biologia e fisiologia do café que poderá resultar no isolamento e caracterização de genes agrônômicos importantes para o melhoramento genético de *Coffea*. Os genes identificados poderão ser úteis para acelerar a escolha de variedades resistentes mais produtivas, tolerantes à seca e resistentes ao ataque de pragas e doenças (VIEIRA et al., 2006).

Alvarenga et al. (2010) realizaram a identificação de sequências expressas do genoma do café, potencialmente associadas com resistência à

doenças, por meio de análise *in silico*, a partir das informações geradas pelo Projeto Brasileiro do Genoma Café. Os autores encontraram 11.300 ESTs, com alto nível de similaridade, com proteínas relacionadas ao processo de defesa do cafeeiro à doenças e pragas.

Com o objetivo de identificar as sequências envolvidas na resistência do cafeeiro à ferrugem e , a partir dessas obter marcadores moleculares EST-PCR, Alvarenga et al. (2011), utilizaram as sequências encontradas por Alvarenga et al. (2010) e também realizaram uma nova mineração dos dados, utilizando duas estratégias de mineração: *Eletronic Northern* e Sequências Publicadas por meio da plataforma de bioinformática do LGE.

Na estratégia *Eletronic Northern*, todas as 214.964 ESTs, provenientes das 37 bibliotecas de cDNA (Tabela 1) foram agrupadas e os clusters (*contigs* e *singlets*) formados. Nessa estratégia, foram selecionados para análise apenas os clusters constituídos por, pelo menos, uma EST da biblioteca RM1, pois é uma fonte potencial de sequências envolvidas no processo de resistência da planta contra as doenças, visto que é uma biblioteca de folhas de *Coffea arábica*, infectadas com bicho mineiro e ferrugem (VIEIRA et al., 2006).

Já para a estratégia sequências publicadas, realizou-se a busca por similaridade entre as sequencias, já disponíveis em bancos de dados públicos, que codificam genes de cafeeiros relacionados à resistência a patógenos, depositadas pelos autores Chen et al. (2003), Fernandez et al. (2004), Ganesh et al. (2006) e Lin et al. (2005), com as do PBGC. As ESTs encontradas no PBGC foram submetidas a uma comparação com o banco de dados NR (*non redundant*) do NCBI, por meio do programa BlastX, para verificar a anotação.

As sequências mineradas foram analisadas para identificar aquelas que apresentam maior possibilidade de estarem envolvidas na defesa do cafeeiro às doenças. Essa análise foi baseada na anotação de cada sequência, observando-se o organismo homólogo, a função potencial da sequência, o *e-value* menor ou

igual a 10^{-20} , o score maior ou igual a 100 e, para os *contigs*, a presença de ESTs, provenientes da biblioteca RM1 (ALVARENGA et al., 2011).

Com essas duas estratégias de mineração dos dados, os autores identificaram 2.272 sequências relacionadas à defesa do cafeeiro a doenças e junto com as 11.300 sequências, obtidas por Alvarenga et al. (2010), selecionaram 62 com maior possibilidade de estarem envolvidas na resistência do cafeeiro a patógenos e desenharam os iniciadores que as amplificaram. Após a análise da estabilidade dos iniciadores, sintetizaram-se 59 pares de *primers* que foram denominados de CARF 001 a CARF 059.

Diante disto, os autores testaram os mesmos em cafeeiros suscetíveis e resistentes à ferrugem alaranjada do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), onde somente o marcador CARF 005 resultou em fragmentos polimórficos detectáveis diretamente em gel de agarose, sendo capazes de diferenciar os cafeeiros analisados, em suscetíveis e resistentes a *Hemileia vastatrix*.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, S. M. **Caracterização de seqüências expressas do genoma café potencialmente relacionadas com a resistência a doenças**. 2007. 107 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.
- ALVARENGA, S. M et al. *In Silico* identification of coffee genome expressed sequences potentially associated with resistance to diseases. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 4, p. 795-806, Apr. 2010.
- ALVARENGA, S. M. et al. Marcadores moleculares derivados de seqüências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência a ferrugem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 890-898, ago. 2011.
- BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 191-201, out. 1958.
- CHEN, Z. J. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee berries**. 2002. 163 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2002.
- CHEN, Z. J. et al. Heat shock-induced susceptibility of green coffee leaves and berries to *Colletotrichum gloeosporioides* and its association to PR and hsp70 gene expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 63, n. 4, p. 181-190, 2003.
- COLLARD, B. C. Y. et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, Wageningen, v. 142, n. 1/2, p. 169-196, Jan. 2005.
- DIAS, M. D. **Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* L.** 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- DORIZZOTTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* spp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais**. 1993. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

EIRA, M. T. S. et al. Bancos de germoplasma de café no Brasil: base do melhoramento para produtividade e qualidade. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2007. p. 1-4.

FERNANDEZ, D. et al. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 6, p. 527-536, 2004.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes estádios fisiológicos e tecidos do fruto maduro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 4, p. 880-885, jul./ago. 2005.

FERREIRA, J. B. et al. Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeeiros e com sintomas da mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 956-964, jul./ago. 2009.

FERREIRA, J. B. et al. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 10., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: NECAF, 2004. 1 CD-ROM.

FERREIRA, J. B. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev. 2010.

GANESH, D. et al. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, Shannon, v. 170, n. 6, p. 1045-1051, June 2006.

GUEDES, J. M. **Caracterização de acessos de Bourbon e identificação de coleção nuclear do banco de germoplasma de café de Minas Gerais**. 2013. 85 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

LIN, C. et al. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 1, p. 114-130, 2005.

LINS, S. R. O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 488-495, 2007.

MAIA, F. G. M. et al. Comportamento de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em mudas micropropagadas de café. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 6, p. 1896-1904, nov./dez. 2013.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café “Conilon” (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Anais...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.

MARQUES, V. V. **Patogenicidade e variabilidade genética de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 114 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

MCDONALD, J. A preliminary account of a disease of green coffee berries in Kenya colony. **Transactions of the British Mycological Society**, Manchester, v. 11, n. 1, p. 145-154, Aug. 1926.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141 p.

OROZCO, E. F. M. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PARADELA FILHO, O. et al. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: IAC, 2001. 11 p. (Boletim Técnico IAC, 191).

PASHLEY, C. H. et al. Est databases as a source for molecular markers: lessons from helianthus. **Journal of Heredity**, Cary, v. 97, n. 4, p. 381-388, 2006.

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides*: cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, out. 2009.

ROWLAND, L. J. et al. Development of EST- PCR markers for DNA fingerprinting and genetic relationship studies in blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, n. 5, p. 682-690, Sept. 2003.

SERA, G. H. et al. Correlação entre a necrose de frutos associada ao *Colletotrichum* spp. com as características frutos por nó e produtividade entre genótipos de café arábica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 48-54, jan./fev. 2008.

SERA, G. H. et al. Correlação entre a ocorrência de *Colletotrichum* spp. e outras características agronômicas em cafeeiros. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 435-440, 2005a.

SERA, G. H. et al. Resistência de campo ao *Colletotrichum* spp. entre genótipos de café (*Coffea arabica* L.). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2005b. 1 CD-ROM.

SILVA, D. N. et al. Host-jump drives rapid and recent ecological speciation of the emergent fungal pathogen *Colletotrichum kahawae*. **Molecular Ecology**, Weinheim, v. 21, n. 11, p. 2655-2670, June 2012.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 119-147, Jan./Mar. 2006.

VARGAS, G. E.; GONZALEZ, U. L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San José, v. 22, n. 2, p. 129-135, abr./jun. 1972.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

WELLMAN, F. L. Blister spot of arabica coffee from virus in Costa Rica.
Turrialba, San José, v. 7, n. 4, p. 115-116, Oct./Dec. 1957.

CAPÍTULO 2 Viabilidade e suscetibilidade de mudas de cafeeiro, oriundas de sementes de plantas com mancha manteigosa, ao *Colletotrichum* spp.

RESUMO

Objetivou-se verificar a germinação das sementes e a porcentagem de plântulas e mudas viáveis oriundas de plantas com sintomas da mancha manteigosa (Genótipo Originado de Plantas Doentes- GOPD); caracterizar os diferentes sintomas observados; relacionar os sintomas com o complexo *Colletotrichum* spp. e verificar a suscetibilidade das GOPDs, em comparação com dez cultivares comerciais de cafeeiro quando inoculadas com o patógeno. No primeiro experimento, frutos foram colhidos de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa da cultivar Catuaí Vermelho e a semeadura realizada em bandejas de isopor contendo substrato esterilizado. Avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas e de plântulas viáveis. Essas foram transplantadas para a avaliação da porcentagem de mudas viáveis. Realizou-se o isolamento e a identificação do patógeno. No segundo experimento, utilizaram-se dez cultivares comerciais e uma cultivar originada de plantas com mancha manteigosa. Mudas no estágio “orelha de onça” foram inoculadas para a avaliação da severidade da antracnose. Não houve diferença estatística quanto à germinação das sementes. Porém, a viabilidade das plântulas e das mudas foi reduzida nas GOPDs. Essas apresentaram sintomas da mancha manteigosa, necrose nas folhas e nos hipocótilos, murcha e morte. Nas lesões necrosadas, observou-se esporulação característica de *Colletotrichum* spp. A cultivar Catuaí Vermelho (GOPD) foi altamente suscetível à antracnose nas folhas cotiledonares apresentando a maior AACPD, em relação aos outros genótipos testados. Este trabalho foi o primeiro a relatar os diferentes sintomas apresentados pelos GOPDs e mostrou que os mesmos apresentam um fator de suscetibilidade à predisposição da doença.

Palavras-chave: Antracnose. *Coffea arabica* L. Resistência. Sementes.

ABSTRACT

This work aimed to verify the germination of seeds and percentage of viable seedlings from coffee plants with symptoms of blister spot (Originated from symptomatic plants GOPD); characterizing the different symptoms observed and relates them with the *Colletotrichum* spp complex; and to compare the GOPD's susceptibility with ten commercial coffee cultivars when they were inoculated with the pathogen. In the first experiment, fruits were harvested from Catuai Vermelho IAC 144 plants with and without symptoms of blister spot, they were sowed in trays containing sterilized substrate. After germinated they were assessed to germination percentage and normal seedlings. The normal seedlings were transplanted to estimate the percentage of viable seedlings. We carried out the isolation and identification of the pathogen. In the second experiment we used ten commercial cultivars and one cultivar originated from plants with blister spot. Seedlings at the "orelha de onça" stage were inoculated to assess the severity. There was no difference in seed germination, however, the viability of seedlings were reduced in GOPDs. Those plants showed blister spot symptoms, necrosis in leaves and hypocotyls, wilting and death. In the necrotic lesions was observed sporulation what indicates *Colletotrichum* spp symptoms. The Catuaí Vermelho (GOPD) was highly susceptible to anthracnose in cotyledons, presenting the highest AUDPC compared to the other genotypes tested. This work was the first to report different symptoms presented by GOPDs and showed that they have a factor of susceptibility to disease predisposition.

Keywords : Anthracnose . *Coffea arabica* L. Resistance. Seeds.

1 INTRODUÇÃO

O café é uma importante bebida valorizada e apreciada, por isso, destaca-se como uma das principais *commodities* agrícolas do mundo. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial, com uma produção estimada entre 46,53 e 50,15 milhões de sacas (60 kg) beneficiado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014). O estado de Minas Gerais é responsável por mais da metade da produção nacional de café o que faz da cafeicultura a principal fonte de renda para diversos municípios.

Historicamente, problemas fitossanitários prejudicam a cultura do cafeeiro e dentre esses destacam-se as enfermidades fúngicas, as quais ocorrem desde o viveiro até o campo de produção: ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*); cercosporiose (*Cercospora coffeicola*); mancha de phoma (*Phoma* spp.); e Complexo *Colletotrichum*: *Coffee Berry Disease* (CBD), antracnoses e a mancha manteigosa. Até o presente momento, estudos têm mostrado que a doença CBD não está presente no Brasil, sendo restrita ao continente africano (BRIDGE et al., 2008; MIRANDA, 2003; NGUYEN et al., 2009). Essa é uma doença altamente prejudicial ao cafeeiro chegando a causar perdas de até 80%, quando medidas adequadas de manejo não são aplicadas (SILVA et al., 2012).

No Brasil, os relatos das doenças do complexo *Colletotrichum* estão associados à antracnose em ramos, frutos e folhas e a mancha manteigosa. Essa é uma doença altamente prejudicial ao cafeeiro que passa a ter sua produção totalmente afetada, o que pode ser observado pela morte de hipocótilos, mumificação e abscisão de folhas e frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos. A etiologia da doença tem sido atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, encontrado em todos os órgãos do cafeeiro com sintoma foliares da doença (FERREIRA et al., 2009; LINS; ABREU; ALVES, 2007; MIRANDA, 2003; PEREIRA et al., 2009). Diversos autores mencionam

que os sintomas iniciais da mancha manteigosa surgem em folhas novas, com o aparecimento de mancha de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro. Em estágios avançados, as manchas apresentam coloração verde-pálida a amarela e bordas irregulares. Por fim, as manchas coalescem, determinando queda prematura das folhas (FERREIRA, 2006; MANSK; MATIELLO, 1977; VARGAS; GONZÁLES, 1972). Ataques intensos são observados em folhas e ramos novos de plantas adultas, ocorrendo necrose e seca de ramos na parte apical, podendo levar à morte das plantas de forma descendente (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009).

Há relatos de que as plântulas oriundas de sementes colhidas de plantas com sintomas foliares da mancha manteigosa são mais suscetíveis à predisposição da doença e que a mesma pode ser transmitida via sementes infectadas (FERREIRA et al., 2010; MAIA et al., 2013; MIRANDA, 2003).

Sendo assim, objetivou-se, neste trabalho: verificar a germinação das sementes e a porcentagem de plântulas e mudas viáveis, oriundas de plantas com sintomas foliares da mancha manteigosa (Genótipos Originados de Plantas Doentes- GOPD); caracterizar os diferentes sintomas observados; relacionar os sintomas com o patógeno *Colletotrichum* spp. e verificar a suscetibilidade das GOPDs, em comparação com dez cultivares comerciais de cafeeiro ,quando inoculadas com o patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento I- Germinação de sementes e viabilidade das plântulas e mudas, oriundas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa.

Coleta dos frutos, obtenção das sementes e produção das mudas.

Os frutos foram colhidos no estádio cereja de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144, produzidas na safra de 2011/2012, na Fazenda da Laje, localizada no município de Paraguaçu, Minas Gerais.

Realizou-se o despulpamento dos frutos para a obtenção das sementes que foram desmuciladas por fermentação em água, durante 24 horas. Após a retirada da mucilagem, as mesmas foram lavadas em água corrente e colocadas à sombra para secar até atingirem, aproximadamente, 18% de umidade. Em seguida, realizou-se a semeadura em bandejas de poliestireno expandido com 120 células, contendo substrato comercial previamente esterilizado em autoclave. Essas foram levadas para a casa de vegetação, localizada no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

Germinação das sementes e viabilidade das plântulas

Os tratamentos consistiram de sementes obtidas de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa. O experimento foi conduzido em blocos casualizados com cinco repetições e parcela experimental composta por uma bandeja de poliestireno expandido de 120 orifícios com uma semente em cada, totalizando 600 sementes por tratamento. Avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas e de plântulas viáveis, considerando-se como germinadas as

sementes que atingiram o estágio de “palito de fósforo” e plântulas viáveis, aquelas que apresentaram um par de folhas verdadeiras totalmente expandidas, sem qualquer sintoma de necrose ou de mancha manteigosa. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Viabilidade das mudas

As plântulas viáveis, sem sintomas, foram transplantadas para copos de plástico descartáveis de 300 mL, contendo o substrato comercial previamente esterilizado Multiplanta®. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições e parcela experimental composta por 150 copos contendo uma muda em cada copo. Avaliou-se a porcentagem de mudas viáveis, considerando-se mudas viáveis aquelas que apresentaram dois pares de folhas verdadeiras totalmente expandidas ausentes de qualquer sintoma da doença. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Obtenção e isolamento do patógeno

Realizou-se o isolamento do patógeno, a partir das partes necrosadas das plântulas e das mudas com os sintomas característicos da doença para verificar se os mesmos estavam relacionados com o patógeno *Colletotrichum* spp. Os tecidos infectados foram desinfestados com álcool a 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2%, por 2 minutos, lavados em água destilada e esterilizada duas vezes e secos em papel de filtro esterilizado, em seguida, transferidos para placa de Petri, contendo meio de cultura MEA a 2% (extrato de malte e ágar) e mantidos, durante sete dias, em câmara de crescimento a 25°C e

fotoperíodo de 12 horas. No total, foram obtidos três isolados relacionados com o sintoma de antracnose e da mancha manteigosa.

Realizou-se o teste de patogenicidade dos isolados obtidos em GOPDs, sendo a testemunha inoculada somente com água destilada esterilizada. O delineamento foi em blocos causalizados, com três repetições e parcela experimental composta por uma planta. Avaliou-se a severidade da doença, aos 15 dias após a inoculação, sendo os dados submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

2.2 Experimento II- Suscetibilidade de mudas, oriundas de sementes de plantas com mancha manteigosa, a *Colletotrichum* spp.

Obtenção das cultivares de café.

Sementes das cultivares Acaiá IAC 474-19, Araçuaia MG 1, Catiguá MG 2, Catuaí Vermelho IAC 144, Catuaí Amarelo 2 SL, Mundo Novo IAC 376-4, Paraíso MG H 419-1, Pau Brasil MG 1, Sacramento MG 1 e Topázio MG 1190 foram obtidas da fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Três Pontas, Minas Gerais. A cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 (GOPD) foi obtida de plantas com Mancha Manteigosa, na Fazenda da Laje, em Paraguaçu-Minas Gerais. Realizou-se a semeadura em bandejas de poliestireno expandido (isopor) com 120 células, contendo o substrato comercial previamente esterilizado Multiplanta®.

Inoculação

Foi utilizado o isolado denominado MM-1 que foi mais agressivo pelo teste de patogenicidade, no experimento I. Mudas no estágio orelha de onça

foram inoculadas, para a avaliação da severidade da antracnose, nas folhas cotiledonares. Antes e após a inoculação, colocaram-se sacos plásticos umedecidos cobrindo as mudas, formando uma câmara úmida durante 24 horas. A inoculação foi realizada com uma gota de 10 µL da suspensão de *Colletotrichum* spp. (2×10^6 esporos/mL), isolado obtido no experimento I, na face abaxial das folhas, em locais marcados com discos autocolantes, com orifícios de 1,4 cm de diâmetro. Foram feitos ferimentos nos locais da inoculação com um conjunto de agulhas entomológicas, para permitir a penetração e colonização do fungo. Posteriormente, sobre a área inoculada, colocou-se um disco de papel semipermeável com 1,3 cm de diâmetro, previamente umedecido em água destilada esterilizada para formar uma micro câmara úmida (ABREU, 1988), o qual foi retirado 48 horas após a inoculação. Para cada cultivar, utilizou-se como testemunha uma muda inoculada somente com água destilada e esterilizada.

Avaliações da doença e Análise estatística

As avaliações da severidade da doença foram realizadas aos 5, 10, 15, 20 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala de notas adaptada por Maia et al. (2013), representada na Tabela 1.

Tabela 1 Critérios de avaliação do espectro de reação ao *Colletotrichum* spp., em folhas de café

Nota (grau de sintomas)	Severidade / Sintomas
0	Ausência de reação visível
1	Pequenas e poucas (1 a 2) lesões cloróticas ou acastanhadas
2	Mais de 2 lesões acastanhadas ou lesões coalescentes. O diâmetro da lesão excede 0,5 mm
3	Extensas lesões acastanhadas com numerosos pontos pretos ou lesões escuras. Mais de 50% de áreas lesionadas.
4	Área totalmente necrosada

Fonte: (MAIA et al., 2013)

A partir desses dados foi determinado o índice de intensidade da doença (IID), conforme a fórmula: $ID = \frac{\sum (F \times V)}{N \times X} \times 100$, em que F é o número de plantas com determinado grau de sintomas; V representa o grau de sintomas; N é o número total de plantas inoculadas e X corresponde ao grau máximo de sintomas.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi obtida com base nos índices de severidade, de acordo com Shaner e Finney (1977), calculados pela fórmula:

$AACPD = \sum_{i=1}^n [(X_i + X_{i+1})/2][t_{i+1} - t_i]$ sendo o X a intensidade da doença na i - ésima observação; t corresponde ao tempo de avaliação (dias) na i - ésima observação e n representa o número total de avaliações.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições. A parcela experimental foi composta por uma muda com duas

folhas inoculadas. Os dados obtidos para severidade (índice de doença) foram submetidos ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento I- Germinação de sementes e viabilidade das plântulas e mudas formadas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa

Não houve diferença estatística quanto à germinação das sementes entre os materiais obtidos de plantas sem sintomas da mancha manteigosa e o material oriundo de plantas com mancha manteigosa (GOPD). Porém, a viabilidade das plântulas e das mudas foi significativamente reduzida nas GOPDs, aproximadamente 32% e 66%, respectivamente, como ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2 Percentual (%) de Germinação de sementes, viabilidade de plântulas e de mudas provenientes de sementes de plantas, com presença e ausência de sintomas da mancha manteigosa

Tratamentos	Germinação Sementes	Viabilidade de Plântulas	Viabilidade de Mudas
Presença de sintomas	93,66 a	64,89 b	34.40 b
Ausência de sintomas	95,33 a	95,33 a	100.00 a

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Ferreira et al. (2010) também verificaram, pelo “blotter test”, que não houve diferença significativa na germinação das sementes oriundas dos dois tipos de materiais. Entretanto, quando transplantadas, e com o aumento do tempo nas avaliações, os autores relataram que houve um grande número de plântulas mortas, oriundas de sementes de plantas com mancha manteigosa, relatando que houve uma tendência linear para o aumento da incidência e severidade da doença em plântulas doentes. Nessas plântulas, inicialmente, os

autores observaram lesões superficiais castanhas que passaram para lesões mais profundas e escuras, causando o estrangulamento do hypocótilo, e, ainda, isolaram, destas lesões, colônias típicas do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

Este trabalho foi o primeiro em que se observaram sintomas diferentes dos já relatados na literatura, nos genótipos originados de sementes de plantas, com sintomas da mancha manteigosa. Além do sintoma da mancha manteigosa, caracterizado por mancha de cor verde-clara, de aspecto oleoso menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro (Figura 1D). As plântulas no estágio orelha de onça apresentaram as folhas necrosadas e os hypocótilos deprimidos pela lesão (Figura 1C), causando a morte de muitas dessas (Figura 1F). Já nas mudas com pares de folhas verdadeiras, além dos sintomas de necrose, característicos da antracnose (Figura 1B) e de mancha manteigosa (Figura 1D), observou-se o murchamento das plantas ocasionado pela intensa área necrosada no caule (Figura 1E) e na haste apical das mudas, sendo ocasionado possivelmente pela colonização do fungo nos vasos condutores de seiva, o que já foi observado por Ferreira et al. (2009) e Lins et al. (2007). Mudanças oriundas de plantas sem mancha manteigosa não apresentaram quaisquer sintomas da doença (Figura 1G e 1H).

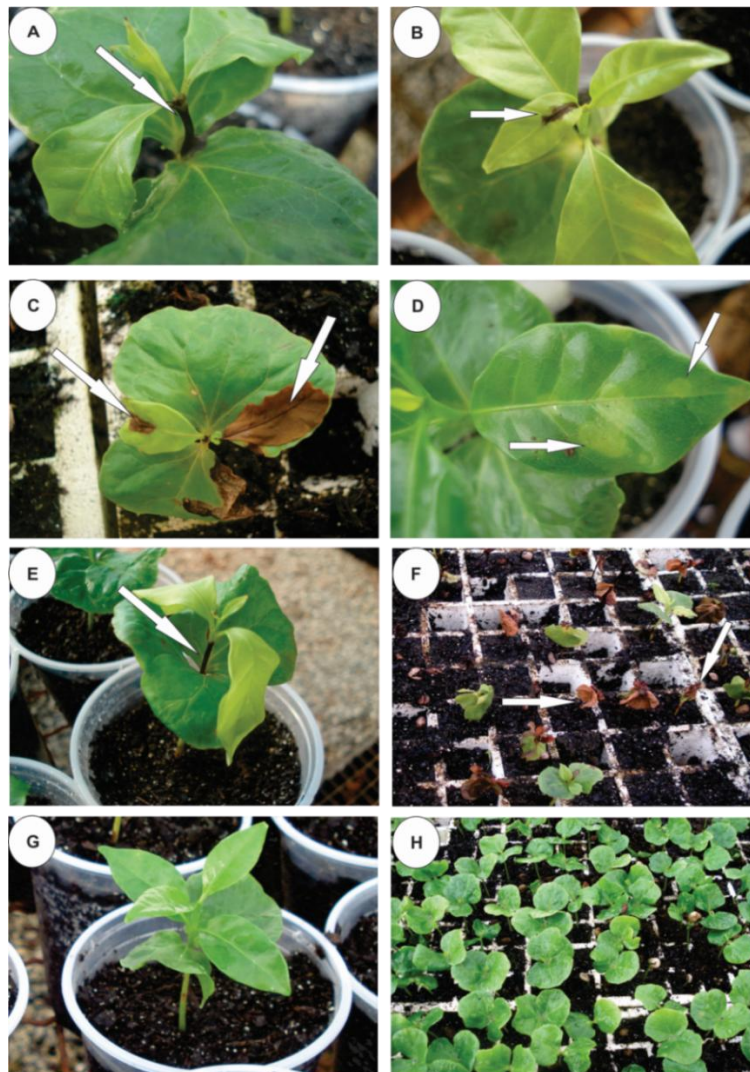


Figura 1 Principais sintomas de mancha manteigosa, observados nas plântulas e mudas de cafeeiro que foram originados de sementes provenientes de plantas com sintomas da doença

Nota: A) Intensa necrose na haste apical das mudas. B) Aparecimento de manchas necrosadas nas folhas apicais. C) Necrose nas folhas verdadeiras das mudas no estágio “orelha de onça”, seguida de morte. D) Folhas verdadeiras apresentando os sintomas característicos da mancha manteigosa. E) Necrose do caule e murchamento da planta. F) Plântulas mortas. (G e H) Testemunhas que foram originadas de sementes de plantas saudáveis.

Quando se colocaram esses materiais em câmara úmida, observou-se nas lesões necrosadas, a esporulação do patógeno (Figura 2A). Além disso, no isolamento do mesmo, obteve-se cultura pura característica de *Colletotrichum* spp. (Figura 2B), confirmado por caracteres morfológicos dos esporos (Figura 2C e 2D).

Pelo teste de patogenicidade dos isolados obtidos destas plantas, observou-se que o isolado denominado MM-1 foi mais agressivo, ocasionando os sintomas de necrose nas folhas com os bordos amarelados até atingir totalmente as mesmas, e com o passar do tempo, nas folhas mais jovens não inoculadas apareceu o sintoma característico da mancha manteigosa (Figura 2E). No final das avaliações, as folhas inoculadas apresentaram-se totalmente necrosadas (Figura 2F), ocasionando a senescência das mesmas e murcha seguida de morte de algumas plantas (Figura 2G). Mudanças inoculadas somente com água destilada esterilizada não apresentaram sintomas da doença (Figura 2H).

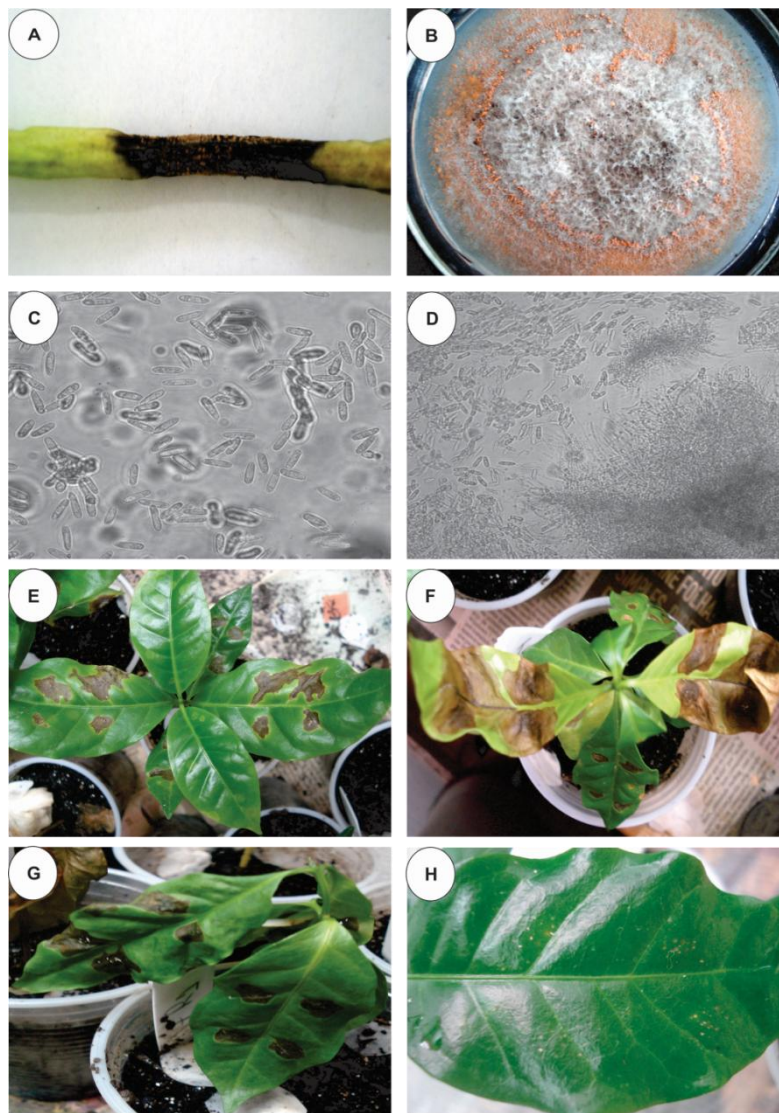


Figura 2 Isolamento, identificação e teste de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* sp., obtidos de plantas originadas de sementes de plantas com mancha manteigosa

Nota: A) Esporulação do patógeno na lesão após câmara úmida. B) Cultura pura de *Colletotrichum* sp. em MEA. (C e D) Esporos característicos de *Colletotrichum* spp. E) Necrose na área inoculada e aparecimento do sintoma da mancha manteigosa nas folhas superiores. E) Progresso do sintoma de necrose nas folhas ,chegando até a senescência. F) Intensa área necrosada e murchamento das plantas. H) Testemunhas inoculadas com água destilada esterilizada.

Estas plantas inoculadas no teste de patogenicidade foram aquelas que sobreviveram depois do teste de viabilidade das mudas, então, fica claro que mesmo ocorrendo “escape” o material, oriundo de sementes de plantas com mancha manteigosa continua bastante suscetível ao *Colletotrichum* sp, mesmo não apresentando os sintomas da doença , antes da inoculação. Esse fato é caracterizado com baixa resistência desses genótipos. Com isso, o presente trabalho confirma a hipótese de Ferreira et al. (2010) os quais mencionam que as plântulas que sobrevivem, originadas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa, poderão originar novas plantas adultas no campo, contribuindo para o processo de disseminação da doença.

3.2 Experimento II- Suscetibilidade de mudas, oriundas de sementes de plantas com mancha manteigosa, ao *Colletotrichum* sp.

No segundo experimento deste trabalho, verificou-se a suscetibilidade das mudas, no estágio “orelha de onça”, obtidas de plantas com mancha manteigosa (GOPD) ao *Colletotrichum* spp., em comparação com dez cultivares comerciais e, considerando-se a AACPD, quatro grupos distintos foram formados ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 Área Abaixo da Curva de Progresso da Antracnose (AACPD) das 11 cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) inoculadas com *Colletotrichum* sp.

Cultivares	Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)
Paraíso MG H 419-1	404,30 a
Pau Brasil MG 1	601,56 b
Catuai Amarelo 2 SL	609,37 b
Sacramento MG 1	611,33 b
Mundo Novo IAC 376-4	620,60 b
Catiguá MG 2	627,93 b
Araponga MG 1	628,91 b
Topázio MG 1190	630,37 b
Catuai Vermelho IAC 144	689,45 c
Acaiá IAC 474-19	708,99 c
Catuai Vermelho IAC 144 (GOPD*)	1453,13 d

* Genótipos originados de plantas doentes (GOPD): mudas originadas de sementes obtidas de plantas com mancha manteigosa. Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A cultivar Catuai Vermelho IAC 144, oriunda de plantas com mancha manteigosa (GOPD) mostrou-se altamente suscetível ao patógeno com a maior AACPD (Figura 3A e 3B). A cultivar Paraíso apresentou a menor AACPD, mostrando ser a mais resistente à antracnose nas folhas cotiledonares (Figura 3D). A cultivar Catuai Vermelho IAC 144 e Acaiá IAC 474-19 indicaram reação semelhante e mais suscetível que as demais cultivares.

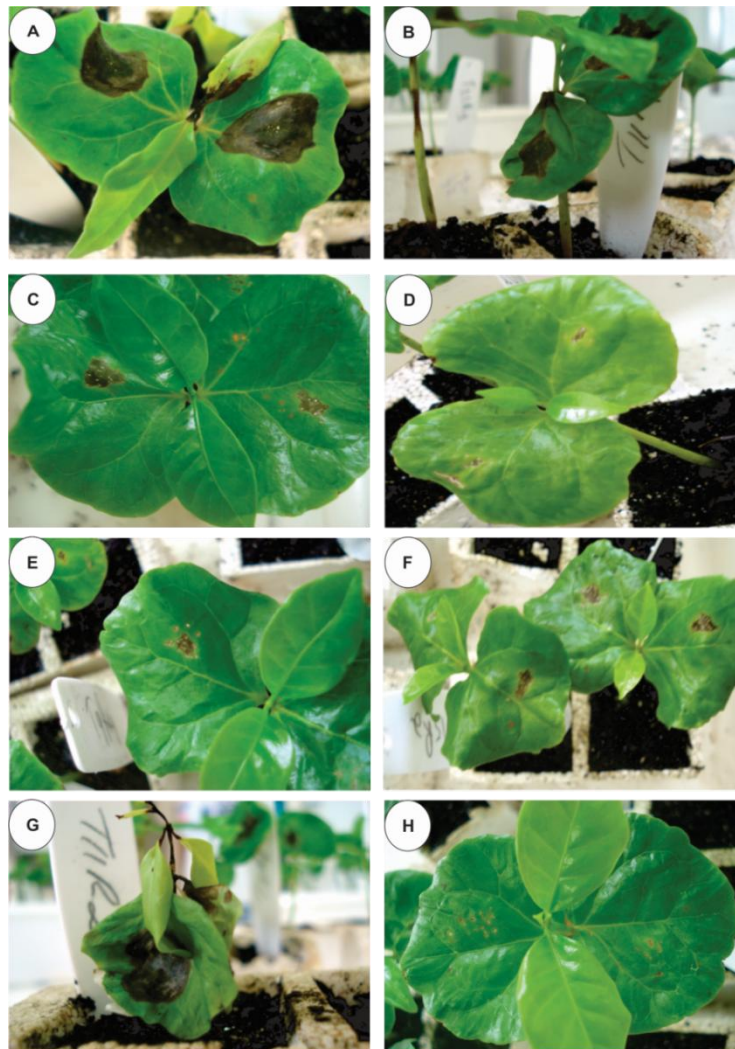


Figura 3 Sintomas de antracnose apresentados por alguma cultivares de cafeeiro em resposta a inoculação com *Colletotrichum* spp. isolado de plantas com sintomas da mancha manteigosa

Nota: (A e B) mudas originadas de sementes de plantas com mancha manteigosa apresentando uma intensa área necrosada. C) Cultivar Catiguá que apresentou resistência intermediária ao patógeno. D) cultivar Paraíso que se mostrou resistente. E) Cultivar Catucaí Amarelo com resistência intermediária. F) Cultivar Catucaí Vermelho utilizado com padrão de suscetibilidade. G) Morte das mudas doentes no final das avaliações. H) Testemunha inoculada somente com água destilada esterilizada.

A cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 já é utilizada em diversos trabalhos com o patossistema como padrão de suscetibilidade, mostrando-se muito suscetível ao patógeno. Já a Acaiá IAC 474-19 é originada da seleção de plantas individuais da cultivar Mundo Novo, portanto, apresenta suscetibilidade à ferrugem alaranjada, indicando que também pode ser utilizada como padrão de suscetibilidade em estudos que visam a seleção de materiais resistentes ao *Colletotrichum* sp.. Essa é a primeira vez que foi avaliada a reação da cultivar Acaiá IAC 474-19, inoculando *Colletotrichum* sp. em folhas. Porém, essa suscetibilidade já foi observada na cultivar Acaiá Cerrado, quando se inoculou o patógeno em hipocótilos (MIRANDA, 2003) e em constatação da presença do mesmo no exocarpo e mesocarpo de frutos de café não inoculados com *Colletotrichum* spp. (FERREIRA et al., 2005).

A cultivar Paraíso MG H 419-1 tem como característica marcante resistência à ferrugem alaranjada, sendo originada da hibridação artificial entre a cultivar Catuaí Amarelo IAC 30 com a seleção de Híbrido de Timor UFV 445-46. Possivelmente, essa resistência seja derivada da espécie *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, pois o Híbrido do Timor surgiu do cruzamento natural entre essa espécie com a *Coffea arabica* L.

Santos Neto (2012) avaliou a resistência de oito cultivares comerciais de cafeeiros ao *Colletotrichum gloeosporioides*, em folhas cotiledonares inoculadas com o patógeno. O autor observou, analisando a AACPD, a formação de dois grupos que diferiram entre si quanto à resistência. Apesar do isolado utilizado não ser o mesmo, alguns dados corroboraram com os do presente trabalho, sendo que, no primeiro grupo, tido como resistentes, encontrou-se a cultivar Paraíso MG H 419-1 e, no segundo grupo, dos suscetíveis à cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. No patossistema *Colletotrichum* x Cafeeiro tem-se observado que a expressão dos sintomas, após a inoculação, é muito variável, dependendo da suscetibilidade do material genético, da variabilidade genética

dos isolados e do tempo, após inoculação para expressar os sintomas (ABREU; FERREIRA; MARTINS, 2008).

No presente trabalho, observou-se que os GOPDs apresentaram-se altamente suscetíveis, mostrando os sintomas de antracnose nas folhas, já nos primeiros dias após a inoculação. Em todos os genótipos, foi observado o sintoma de antracnose nas folhas, diferindo apenas na AACPD (Tabela 3), ou seja, na severidade da doença. Isso é um indício de que a resistência dos genótipos de cafeeiro arábica, a alguns isolados de *Colletotrichum* spp., possa ser do tipo horizontal ou poligênica, pois Ribeiro, Bergamim Filho e Carvalho (1981) mencionam que a resistência horizontal pode ser indicada pela menor severidade da doença, nos materiais avaliados. Para o melhoramento genético de plantas, o interessante é a busca por esse tipo de resistência, pois essa apresenta maior estabilidade e durabilidade, condicionada por vários genes com efeitos menores (poligênicas) e não apresenta especificidade às raças do patógeno, ou seja, a probabilidade do patógeno “quebrar” essa resistência é menor em comparação com a resistência vertical (PLANK, 1975).

Miranda (2003) avaliou a resistência de doze cultivares de cafeeiro, sendo duas oriundas de plantas com mancha manteigosa em dez isolados de *Colletotrichum* spp. A inoculação foi realizada em hipocótilos de cafeeiros e foi analisado o índice de doença, para a caracterização dos materiais. Apenas os materiais procedentes de plantas com mancha manteigosa (Catucaí Amarelo e Catucaí Vermelho) foram suscetíveis ao patógeno, mostrando uma alta taxa de mortalidade no final das avaliações. Somente seis, dos dez isolados, foram patogênicos aos dois materiais, incluindo um isolado de *Colletotrichum kahawae*, mostrando que existem interações compatíveis e incompatíveis nesse patossistema. Sendo assim, pelos resultados do autor, conclui-se que os materiais, provenientes de plantas com mancha manteigosa, realmente são mais suscetíveis, em comparação com outros germoplasmas de cafeeiro e apresentam

os sintomas da doença somente quando inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp. patogênicos.

No final das avaliações, observamos a morte apenas dos GOPDs (Figura 3G), sendo o mesmo não observado nos outros genótipos. Sendo assim, fica evidente que, nos materiais obtidos de plantas com mancha manteigosa, existe também um fator de suscetibilidade à antracnose nas folhas. O sintoma de necrose nas folhas sempre esteve relacionado com os sintomas de mancha manteigosa. Porém, esse é o primeiro trabalho que avalia a suscetibilidade dos GOPDs à antracnose nas folhas cotiledonares e fica evidente que mais estudos precisam ser realizados, com o patossistema *Colletotrichum* X cafeeiro, para tentar descobrir o fator de suscetibilidade relacionado a esses materiais.

4 CONCLUSÕES

É reduzida a viabilidade das plântulas e mudas, oriundas de sementes de plantas, com mancha manteigosa (GOPD).

Mudas que sobreviveram apresentam baixa resistência e poderão originar novas plantas adultas , no campo, contribuindo para o processo de disseminação da doença.

Os GOPDs são mais suscetíveis à antracnose nas folhas cotiledonares do que as outras cultivares comerciais analisadas.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. S. **Resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. em cafeeiros descendentes do Híbrido de Timor**. 1988. 68 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

ABREU, M. S.; FERREIRA, J. B.; MARTINS, F. G. Mancha manteigosa no contexto do complexo *Colletotrichum* em cafeeiros. In: SIMPÓSIO DE MANEJO DE PLANTAS: MANEJO FITOSSANITÁRIO DO CAFEIEIRO, 8., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p. 105-126.

BRIDGE, P. D. et al. Variability of *Colletotrichum kahawae* in relation to other *Colletotrichum* species from tropical perennial crops and the development of diagnostic techniques. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 5, p. 274-280, May 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: primeira estimativa, janeiro 2014**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 9 fev. 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FERREIRA, J. B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *Coffea arabica* L.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes estádios fisiológicos e tecidos do fruto maduro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 4, jul./ago. 2005.

FERREIRA, J. B. et al. Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeeiros e com sintomas da mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 956-964, jul./ago. 2009.

FERREIRA, J. B. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev. 2010.

LINS, S. R. O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 488-495, 2007.

MAIA, F. G. M. et al. Comportamento de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em mudas micropropagadas de café. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 6, p. 1896-1904, nov./dez. 2013.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café “Conilon” (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Anais...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.

MIRANDA, E. F. O. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

NGUYEN, T. H. P. et al. Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 898-909, Oct. 2009.

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides*: cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, out. 2009.

PLANK, J. E. van der. **Principles of plant infection**. New York: Academic, 1975. 216 p.

RIBEIRO, I. J. A.; BERGAMIM FILHO, A.; CARVALHO, P. C. T. Avaliação da resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk et Br. em cultivares de *Coffea arabica* L. em condições naturais de epidemia. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 7, p. 80-95, 1981.

SANTOS NETO, H. **Resistência em cafeeiro a *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mancha manteigosa**. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, Aug. 1977.

SILVA, D. N. et al. Host-jump drives rapid and recent ecological speciation of the emergent fungal pathogen *Colletotrichum kahawae*. **Molecular Ecology**, Weinheim, v. 21, n. 11, p. 2655-2670, June 2012.

VARGAS, G. E.; GONZALEZ, U. L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San José, v. 22, n. 2, p. 129-135, abr./jun. 1972.

CAPÍTULO 3 Reação de acessos de cafeeiro a *Colletotrichum* spp.

RESUMO

Tendo-se em vista a importância da cafeicultura, estudos que visam o melhoramento genético do cafeeiro são necessários para conferir resistência a agentes patogênicos. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a reação de 30 acessos de cafeeiro quanto à resistência a *Colletotrichum* sp. O experimento foi instalado na Universidade Federal de Lavras, sendo o delineamento experimental em DBC com três repetições e a parcela experimental composta por uma planta. Avaliou-se a severidade da doença aos 20 dias após a inoculação, obtendo-se o Índice de Intensidade de Doenças (IID), sendo os genótipos classificados como: Resistente, Moderadamente Resistente, Moderadamente Suscetível e Suscetível. Além disso, avaliou-se o progresso da doença aos 3, 6, 9, 12, 15 e 20 dias, após a inoculação, para obter a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Foram estimadas as correlações de Pearson entre as duas variáveis. Houve variabilidade na resposta dos genótipos, no qual apenas dois apresentaram-se como resistentes, o MG1062 (Iapar 59) e o MG0245 (Obatã Tardio). Como moderadamente resistentes, 11 acessos, desses, destacamos o MG0225 (Iapar 59 polispermia) e o MG1043 (Sarchimor UFV 349-28). Foram classificados 9 acessos como moderadamente suscetíveis e dentre eles estão a maioria dos Híbridos de Timor. Entre os acessos suscetíveis em número de oito, destacando-se os materiais provenientes de Mundo Novo. Houve uma alta correlação (0,937) entre a AACPD e o IID, podendo-se optar por uma das duas variáveis para avaliação da resistência. Este trabalho fornece informações valiosas sobre genótipos que poderão ser utilizados em programas de melhoramento genético do cafeeiro, visando resistência a *Colletotrichum* spp.

Palavras-chave: Antracnose. Banco ativo de germoplasma. Resistência. Melhoramento genético. *Coffea arabica* L.

ABSTRACT

Given the importance of Coffee, studies aimed to the genetic improvement of coffee are needed to confer resistance to pathogens. The objective of this study was to evaluate the reaction of 30 coffee accessions for resistance to *Colletotrichum* sp. The experiment was carried out at Federal University of Lavras, in randomized complete blocks design with three replications and the experimental plot was comprised of one plant. The disease severity was evaluated at 20 days after inoculation and it resulted in the Intensity Index of Diseases (IID), wherewith the genotypes were categorized as resistant, moderately resistant, moderately susceptible and susceptible. Furthermore, we assessed the disease progress at 3, 6, 9, 12, 15 and 20 days after inoculation by the AreaUnder Disease Progress Curve (AUDPC). Pearson's correlations were estimated between both variables, IID and AUDPC. There was variability in the response of genotypes in which only two were categorized as resistant, MG1062 (Iapar 59) and MG0245 (ObatãTardio). As moderately resistant there were 11 accessions, including MG0225 (Iapar59 polispermia) and MG1043 (Sarchimor UFV 349-28). Nine accessions were classified as moderately susceptible and most of them were relative to Timor hybrid. The susceptible accessions were eight, highlighting genotypes from Mundo Novo. There was a high correlation (0.937) between AUDPC and IID, and it allows us to opt for one of them to assessment the resistance. This study provides valuable information on genotypes that could be used in coffee breeding programs aiming to resistance to the *Colletotrichum* spp.

Keywords: Anthracnose. coffee genebank. Resistance. *Coffeaarabica* L.

1 INTRODUÇÃO

Diversos fatores provocam quedas na produtividade e na qualidade dos grãos de café no Brasil, incluindo o ataque de pragas e doenças. Dentre as doenças, podem-se destacar as antracnoses em folhas e frutos, mancha manteigosa e a seca de ponteiros, causadas pelo fungo *Colletotrichum* spp (FERREIRA et al., 2009; LINS; ABREU; ALVES, 2007; MIRANDA, 2003). Essas doenças são caracterizadas pelo desenvolvimento de lesões necróticas em diversas partes das plantas, sendo as mais críticas e prejudiciais para as lavouras cafeeiras aquelas nas quais o fungo incide sobre as gemas, flores e chumbinho, provocando a morte e queda, bem como, o enegrecimento e morte dos ramos (PARADELA FILHO et al., 2001).

Nas pesquisas desenvolvidas com o patossistema, por diversos autores, tem sido observado que cultivares de café, utilizadas em plantios comerciais não possuem resistência às diferentes espécies de *Colletotrichum* (DORIZZOTTO, 1993; MIRANDA, 2003). Sabe-se que, no Brasil, 95% da área cultivada com café arábica são compostas por cultivares de germoplasma de Catuaí e Mundo Novo, o que representa um grande problema, já que essas duas cultivares, aparentemente, não são resistentes a *Colletotrichum* spp., podendo acarretar em perdas de produção na cafeicultura brasileira (SERA et al., 2008). Dessa forma, alternativas de controle desse patógeno são necessárias.

Devido aos poucos estudos com o patossistema, pouco se sabe sobre o controle destas doenças, embora o controle químico pareça ser eficiente, é pouco utilizado no Brasil, pois, o período crítico de controle é da floração até o estágio do fruto expandido. Portanto, não coincide com o período de controle de outras doenças importantes como a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), onerando desse modo o custo de produção (SERA et al., 2005b). Nesse contexto, o uso de cultivares resistentes é a alternativa preferencial por ser o método mais barato,

mais fácil, mais eficaz e mais seguro para o controle das doenças de plantas (PEREIRA et al., 2010).

Em um programa de melhoramento de plantas, visando a resistência às doenças, a primeira etapa é caracterizar a reação dos genótipos ao patógeno que provoca determinada doença. Posteriormente, de posse dessa informação, diversas etapas, como a identificação do controle genético da característica, tipo predominante de resistência, entre outras, são realizadas até o lançamento de uma cultivar resistente. No Brasil, esse tipo de informações relacionadas ao *Colletotrichum* ainda são escassas e não conclusivas (SERA et al., 2008).

A existência de várias espécies de *Coffea*, ainda pouco exploradas e de grande potencial, evidencia a importância da manutenção de um banco de germoplasma desse gênero, para aproveitamento em programas de melhoramento. Nesse sentido, o Banco Ativo de Germoplasma de Café, mantido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) apresenta uma grande variabilidade genética, constituída de muitas fontes de resistência à ferrugem, aos nematoides das galhas, ao bicho mineiro, à antracnose e a muitas outras doenças do cafeeiro. Assim, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a reação de 30 acessos de cafeeiro, obtidos do Banco Ativo de Germoplasma de Café da EPAMIG, quanto à resistência ao *Colletotrichum* spp., isolado de plantas com sintomas foliares da mancha manteigosa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do isolado de *Colletotrichum* sp.

O isolado de *Colletotrichum* sp. foi obtido de mudas formadas de sementes de plantas com sintoma de mancha manteigosa. Tecidos infectados com os sintomas característicos da doença foram desinfestados com álcool a 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 1%, por 1 minuto, lavados em água destilada, esterilizados e secos em papel de filtro esterilizado; em seguida, transferidos para placa de Petri, contendo meio de cultura MEA (extrato de malte e ágar) a 2% e mantidos, durante sete dias, em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Foi realizado teste de patogenicidade dos isolados em folhas de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho e o isolado mais agressivo foi utilizado para a inoculação das mudas.

2.2 Obtenção dos acessos de café

O experimento foi realizado no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades Fúngicas de Plantas e na Câmara de Crescimento da Nematologia, na Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizados 30 acessos do Banco de Germoplasma de Café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Patrocínio, Minas Gerais (Tabela 1).

A grande vantagem da utilização destes genótipos é que os acessos possuem informações detalhadas sobre sua origem e, a coleta dos frutos para a realização deste trabalho foi feita somente em uma única planta de cada acesso, que possui a localização detalhada no respectivo banco de germoplasma. Esse

fato torna possível a utilização dos resultados por outros Centros de Pesquisa de várias partes do mundo, uma vez que os germoplasmas encontram-se amplamente distribuídos e fazem parte de importantes programas de melhoramento genético de cafeeiro, de outras Instituições.

Tabela 1 Identificação dos acessos do Banco de Germoplasma de Café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Patrocínio, Minas Gerais, designação e detalhamento da localização dos respectivos genótipos

Identificação	Acessos	Talhão	Fileira	Repetição	Planta
MG 1062	IAPAR 59	C7	11 ^a	R2	6
MG 0245	Obatã Tardio	B2	25 ^a	R2	5
MG 0169	Maragogipe Amarelo	B2	17 ^a	R1	2
MG 0225	IAPAR 59 polispermia	B2	21 ^a	R1	7
MG 0007	Bourbon Amarelo	B2	6 ^a	R2	4
MG 1182	Tupi Amarelo	C7	24 ^a	R1	3
MG 0890	Bourbon 43/7 x RP 13 x CIFC 264 UFV 360-01	C6	21 ^a	R1	6
MG 0213	Caturra Vermelho	B2	20 ^a	R1	4
MG 0271	Híbrido de Timor UFV 377-15	B2	26 ^a	R1	1
MG 0194	Caturra Amarelo Colombiano	B2	21 ^a	R2	5
MG 0212	Caturra Amarelo	B2	20 ^a	R1	2
MG 1043	Sarchimor UFV 349-38	C7	9 ^a	R1	3
MG 0179	Ct. V. X Amphillo MR 2161	B2	17 ^a	R1	8
MG 0579	Dilla Alghe x H. Timor UFV 400- 01	C1	26 ^a	R1	1
MG 0352	Híbrido de Timor UFV 440-22	C1	5 ^a	R1	6
MG 1110	Catimor UFV 386-80	C7	16 ^a	R1	5
MG 0150	Iarana 1973/74 IAC 1110	B2	15 ^a	R1	9
MG 0279	Híbrido de Timor UFV 376-31	B2	26 ^a	R1	6
MG 0290	Híbrido de Timor UFV 342-50	B2	26 ^a	R1	10

“Tabela 1, conclusão”

Número do Acesso	Designação dos Acessos	Talhão	Fileira	Repetição	Planta
MG 0282	Híbrido de Timor UFV 376-12	B2	26 ^a	R1	5
MG 0277	Híbrido de Timor UFV 376-52	B2	26 ^a	R1	3
MG 0138	Mundo Novo Purpuracia	B2	15 ^a	R1	7
MG 0139	Mundo Novo Amarelo	B2	15 ^a	R1	5
MG 0137	Sumatra Amarelo	B2	15 ^a	R1	9
MG 0152	Icatu Precoce IAC 3282	B2	16 ^a	R2	4
MG 0224	Pacamara	B2	21 ^a	R1	1
MG 0275	Híbrido de Timor UFV 377-02	B2	26 ^a	R1	3
MG 1178	IPR100	C7	24 ^a	R1	2
MG 0148	Plantas Antigas MS	B2	16 ^a	R2	5
MG 0140	Mundo Novo Ponta Roxa	B2	15 ^a	R1	5

Todas as sementes foram obtidas de frutos no estádio cereja, colhidos manualmente. Os frutos foram submetidos ao despulpamento e, em seguida, as sementes foram desmuciladas por fermentação em água, por 24 horas. Após a retirada da mucilagem, foram lavadas em água corrente e dispostas em bandejas forradas com papel de filtro esterilizado e colocadas à sombra para a retirada do excesso de água. Em seguida, as mesmas foram semeadas em saquinhos plásticos, contendo substrato composto por terra, areia, esterco bovino e superfosfato simples. Essas foram levadas para o viveiro de mudas, localizado na Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Lavras, Minas Gerais.

2.3 Preparo das mudas para a inoculação

As mudas de café foram inoculadas quando apresentaram quatro pares de folhas verdadeiras completamente expandidas, em torno de nove meses após a semeadura. Vinte e quatro horas antes da inoculação, as mudas foram submetidas às condições de câmara úmida, feita com o auxílio de sacos plásticos e mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 23°C.

A inoculação foi realizada com uma gota de 20 µL da suspensão de *Colletotrichum* spp., com a concentração de 2×10^6 esporos/ml, ajustada em câmara de Neubauer, na face abaxial das folhas, em locais marcados com discos autocolantes, com orifícios de 1,4 cm de diâmetro. Foram feitos ferimentos nos locais da inoculação com um conjunto de agulhas entomológicas, para permitir a penetração e colonização do fungo. Posteriormente, sobre a área inoculada, foi colocado um disco de papel semipermeável com 1,3 cm de diâmetro, previamente umedecido, formando uma microcâmara úmida (ABREU, 1988). Essa foi retirada 48 horas após a inoculação.

A avaliação de severidade da doença foi realizada aos 3, 6, 9, 12, 15 e 20 dias, após a inoculação. Para a avaliação da severidade foi utilizada uma escala de notas adaptada por Maia et al. (2013), representada na Tabela 2.

Tabela 2 Critérios de avaliação do espectro de reação a *Colletotrichum* spp., em folhas de café

Nota (grau de sintomas)	Severidade / Sintomas
0	Ausência de reação visível
1	Pequenas e poucas (1 a 2) lesões cloróticas ou acastanhadas
2	Mais de 2 lesões acastanhadas ou lesões coalescentes. O diâmetro da lesão excede 0,5 mm
3	Extensas lesões acastanhadas com numerosos pontos pretos ou lesões escuras. Mais de 50% de áreas lesionadas.
4	Área totalmente necrosada

A partir desses dados foi determinado o Índice de Intensidade da Doença (IID), conforme a fórmula proposta por Cirulli e Alexander (1966):

$$IID = \frac{\sum (F \times V)}{(N \times X)} \times 100$$

em que:

F: número de plantas com determinado grau de sintomas

V: grau de sintomas

N: número total de plantas inoculadas

X: grau máximo de sintomas

De acordo com os dados obtidos pelo IID na avaliação aos 20 dias após a inoculação, os acessos avaliados foram classificados nas seguintes classes de suscetibilidade: resistente (R) $IID \leq 25$; moderadamente resistente (MR)

25<IID≤50; moderadamente suscetível (MS) 50<IID≤75 e suscetível (S) IID>75 (MIRANDA, 2003).

Para analisar o progresso da doença, no tempo, em todas as avaliações, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) com base nos índices de severidade, de acordo com Shaner e Finney (1977), pela fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=1}^n [(X_i + X_{i+1})/2][t_{i+1} - t_i]$$
, sendo o X a intensidade da doença na i - ésima observação; t corresponde ao tempo de avaliação (dias) na i - ésima observação e n representa o número total de avaliações.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com três repetições. A parcela experimental foi composta por uma planta com oito discos autocolantes. Os dados obtidos para severidade aos 20 dias após a inoculação (IID) e a AACPD foram submetidos ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). Estimou-se a correlação de Pearson entre a AACPD e o IID, utilizando o comando proc corr do SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2009).

3 RESULTADOS

Os genótipos utilizados apresentaram grande variabilidade quanto à resposta de resistência ao isolado de *Colletotrichum* sp. De acordo com os resultados obtidos por meio do índice de intensidade de doença (IID), apenas dois genótipos, Iapar 59 e Obatã Tardio, apresentaram índice de doença menor que 25, sendo classificados como resistentes (Tabela 3). Doze genótipos foram classificados como moderadamente resistentes ($25 < \text{IID} \leq 50$), nove como moderadamente suscetíveis ($50 < \text{IID} < 75$) e outros nove genótipos classificados como suscetíveis ($\text{IID} > 75$).

Tabela 3 Classificação dos genótipos inoculados com *Colletotrichum* spp.

Designação do Material	Classificação	Reação	IID	*	AACPD	*
Iapar 59	(IID ≤ 25)	R	15,63	a	185,42	a
Obatã Tardio	(IID ≤ 25)	R	20,83	b	277,08	b
Maragogipe Amarelo	(25<IID≤50)	MR	35,42	c	451,04	c
Iapar 59 polispermia	(25<IID≤50)	MR	36,46	c	432,34	c
Bourbon Amarelo	(25<IID≤50)	MR	39,58	c	605,73	c
Híbrido de Timor UFV 377-15	(25<IID≤50)	MR	45,84	c	464,59	c
Bourbon 43/7 x RP 13 x CIFC 264 UFV 360-01	(25<IID≤50)	MR	40,63	c	488,54	c
Sarchimor UFV 349-38	(25<IID≤50)	MR	47,92	c	489,42	c
Tupi Amarelo	(25<IID≤50)	MR	40,63	c	528,65	c
Caturra Amarelo Colombiano	(25<IID≤50)	MR	44,79	c	659,89	c
Caturra Amarelo	(25<IID≤50)	MR	45,83	c	617,19	c
Ct. V. X Amphillo MR 2161	(25<IID≤50)	MR	48,96	c	651,56	c
Caturra Vermelho	(25<IID≤50)	MR	43,75	c	666,67	c
Catimor UFV 386-80	(50<IID≤75)	MS	54,17	c	611,46	c
Híbrido de Timor UFV 440-22	(50<IID≤75)	MS	51,04	c	677,08	c
Dilla Alghe x H. Timor UFV 400- 01	(50<IID≤75)	MS	51,04	c	796,36	c
Iarana 1973/74 IAC 1110	(50<IID≤75)	MS	57,29	c	957,81	c
Híbrido de Timor UFV 342-50	(50<IID≤75)	MS	64,58	c	801,57	c
Híbrido de Timor UFV 376-31	(50<IID≤75)	MS	61,54	c	982,94	c
Híbrido de Timor UFV 376-52	(50<IID≤75)	MS	71,87	c	1096,88	c
Mundo Novo Purpuracia	(50<IID≤75)	MS	73,96	c	1154,69	c
Híbrido de Timor UFV 376-12	(50<IID≤75)	MS	71,87	c	1273,44	d
Mundo Novo Amarelo	(IID > 0,75)	S	76,04	c	1086,98	c
Icatu Precoce IAC 3282	(IID > 0,75)	S	79,17	c	1233,33	c

“Tabela 3, conclusão”

Designação do Material	Classificação	Reação	IID	*	AACPD	*
Pacamara	(IID > 0,75)	S	80,21	d	1122,92	c
Híbrido de Timor UFV 377-02	(IID > 0,75)	S	83,33	d	989,58	c
IPR100	(IID > 0,75)	S	88,54	e	1280,21	d
Sumatra Amarelo	(IID > 0,75)	S	77,08	c	1272,92	d
Catuaí Vermelho (Padrão Suscetibilidade)	(IID > 0,75)	S	89,58	e	1255,30	d
Plantas Antigas MS	(IID > 0,75)	S	86,46	e	1431,25	e
Mundo Novo Ponta Roxa	(IID > 0,75)	S	89,58	e	1412,07	e

* Médias seguidas pela mesma letra minúsculas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade.

R= Genótipos Resistentes; MR: Genótipos Moderadamente Resistentes; MS= Genótipos Moderadamente Suscetíveis; S= Genótipos Suscetíveis.

IID= Índice de Intensidade da doença aos 20 dias após a inoculação. AACPD= Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença.

Considerando as médias dos genótipos baseadas no IID, observa-se que as mesmas foram agrupadas em cinco diferentes classes, por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$) (Tabela 3). Com isso, o genótipo Iapar 59 apresentou a menor média, por outro lado, os genótipos IPR100, Catuaí Vermelho, Plantas Antigas MS e Mundo Novo Ponta Roxa apresentaram as maiores médias.

O teste de médias para Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) dos genótipos resultou em cinco diferentes classes (Tabela 3). Poucas modificações foram observadas, quando se comparou a classificação dos genótipos por meio do IID e da AACPD (Tabela 3). Sendo assim, a magnitude da estimativa da correlação de Pearson foi de 0,93 (dado não mostrado), o que indica que a concordância na classificação das médias, dessas duas variáveis, foi alta.

4 DISCUSSÃO

As diferenças na reação dos genótipos utilizados nesse trabalho era de fato se esperar, pois os mesmos possuem constituições genéticas diferentes, resultado de anos de hibridações, avaliações, seleções realizadas por diversos programas de melhoramento.

A cultivar Iapar 59 foi classificada como resistente, quando se utilizou o IID (Tabela 3). Ela foi obtida pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), pelo cruzamento entre Villa Sarchi CIFC 971/10 e o Híbrido de Timor CIFC 832/2. Uma característica marcante dessa cultivar é a de possuir resistência completa à todas as raças da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) (CARVALHO et al., 2008). Também é considerada resistente ao nematoide das galhas *Meloidogyne exigua* (SALGADO et al., 2002). Resultado semelhante foi relatado por Sera et al. (2005a), os quais classificaram essa cultivar como resistente ao *Colletotrichum* sp., quando foram realizadas avaliações em campo. Vale salientar que essa resistência pôde ser observada, quando se inoculou o patógeno em folhas de mudas de cafeeiro, conforme observado neste trabalho. Desse modo, a cultivar Iapar 59 pode ser uma boa fonte de resistência a *Colletotrichum* spp. e ser utilizada em programas de melhoramento do café.

Outro genótipo classificado como resistente a *Colletotrichum* sp. foi o Obatã Tardio, proveniente de uma seleção de plantas da cultivar Obatã IAC 1669-20, oriundas do cruzamento realizado entre Villa Sarchi e o Híbrido de Timor CIFC 832/2. Assim como a cultivar IAPAR 59, essa cultivar também é resistente à ferrugem do cafeeiro, sendo também uma boa fonte de resistência para programas de melhoramento. Além disso, essa resistência a doenças favorece a indicação do seu plantio para o sistema adensado (CARVALHO et al., 2008), que torna as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento de diversas doenças.

Segundo Sera et al. (2005a), é possível que a resistência apresentada pela IAPAR 59 e a Obatã Tardio, seja derivada de *Coffea canephora* Pierre, pois ‘Obatã’ ("Sarchimor") e IAPAR-59 ("Sarchimor") possuem genes dessa espécie.

Na Tabela 3, estão descritos os acessos que se apresentaram moderadamente resistentes, ou seja, índice de doença entre 0,25 a 0,5. Pode-se destacar alguns desses, como o acesso IAPAR 59 polispermia, que apresenta na sua origem genética o IAPAR 59, que se mostrou resistente neste trabalho, porém, possivelmente por ser um mutante (Polysperma), essa resistência foi parcialmente perdida. O Maragogipe Amarelo, que é originado de uma provável hibridação natural entre o Maragogipe Vermelho e o Amarelo de Botucatu, tem despertado o interesse dos melhoristas para possíveis cruzamentos devido ao seu fenótipo “gigantismo” para caracteres morfológicos, como porte da planta, flores, frutos, sementes e melhor qualidade de bebida (MENDES et al., 2008).

Outro genótipo que se destacou foi o Tupi Amarelo, que se originou do cruzamento natural entre Tupi IAC 1669-33, de frutos vermelhos, com a cultivar Catuaí Amarelo, que apresenta alta produtividade, é indicada para plantios adensados, e tem apresentado resistência moderada à ferrugem alaranjada, porém, ainda está em fase experimental em Patrocínio-MG e Altinópolis-SP (CARVALHO et al., 2008).

Em testes com hipocótilos e frutos verdes, essa cultivar também se mostrou moderadamente resistente, superando as cultivares Mundo Novo IAC 319-19, Rubi MG 1192, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Acáia Cerrado MG 1474 e Katipó (MIRANDA, 2003). Porém, segundo Sera et al. (2007a), em teste de campo, o mesmo não foi observado, mostrando suscetibilidade ao patógeno. Esses autores mencionam que essa diferença ocorre, possivelmente, devido às diferentes condições climáticas entre o campo e em condições controladas e que os isolados presentes em Londrina-PR podem ser diferentes dos de Lavras - MG.

O acesso Sarchimor UFV 349-38 apresentou moderada resistência neste trabalho. Originou-se da geração F2 do cruzamento entre Villa Sarchi CIFIC 971/10 x HDT CIFIC 832/2, visando resistência à ferrugem alaranjada e, a partir dessa população, foram obtidas várias cultivares como, por exemplo: Tupi, Obatã e a IAPAR 59 (VÁRZEA et al., 2008), sendo que neste trabalho, a primeira mostrou-se moderadamente resistente e as duas últimas resistentes. Todos esses genótipos além de apresentarem resistência à ferrugem alaranjada, também são fontes de resistência ao *Colletotrichum spp.*, provavelmente por apresentarem genes de *Coffea canéfora*, em seus genótipos.

Dentre os outros acessos moderadamente resistentes, o Bourbon Amarelo e o Bourbon 43/7 x RP 13 x CIFIC 264 UFV 360-01 se destacaram. Na literatura, encontramos que esses genótipos apresentam, como característica marcante a qualidade de bebida, porém, com alta suscetibilidade à doenças (FAZUOLI et al., 2008) o que prejudica a utilização em plantios comerciais. Sendo assim, a introdução de genes de resistência às doenças, nesses acessos, seria de grande valor para os produtores de café.

Além destes, o Caturra Vermelho que se originou possivelmente de uma ou duas mutações naturais de Bourbon Vermelho, sendo assim, a sua principal característica é a qualidade de bebida, pois tem praticamente 100% de seu material genético advindo do Bourbon; entretanto, apresenta alta suscetibilidade à ferrugem alaranjada (CARVALHO et al., 2008).

Entre os acessos que se mostraram moderadamente suscetíveis e suscetível estão seis Híbridos de Timor (HT) testados neste trabalho, como os HT UFV 440-22, HT UFV 376-31, HT UFV 342-50, HT UFV 376-12, HT UFV UFV 376-52 e HT UFV UFV 377-02, como mostrado na Tabela 3. O Híbrido de Timor originou-se do cruzamento natural entre *Coffea arabica* (cultivar Típica) e *Coffea canephora*, com vários retrocruzamentos com a cultivar Típica, encontradas na Ilha de Timor (hoje Timor Leste). Essas plantas apresentam

elevada resistência à ferrugem e têm sido bastante utilizadas como fonte de resistência a esse patógeno, para o desenvolvimento de novas cultivares comerciais (CARVALHO et al., 2008).

Os principais Híbridos de Timor, utilizados para a obtenção dessa resistência, são as plantas denominadas de H832/1 que deram origem à Catimores, como as cultivares Oeiras, Sabiá Tardio e Katipó, e a planta H 832/2, que foi utilizada para o desenvolvimento das cultivares do germoplasma Sarchimor, como a Obatã, a Iapar 59, a Tupi e a Acauã. Apesar da maioria dos acessos do Híbrido de Timor apresentar resistência à ferrugem, o mesmo não foi observado para o isolado de *Colletotrichum* spp. utilizado neste trabalho, porém, números significativos de genótipos originados do mesmo apresentaram reações de resistência e moderada resistência, mostrando que também são importantes para a obtenção de cultivares resistentes ao *Colletotrichum* spp.

Dentre os acessos que se mostraram mais suscetíveis estão aqueles que apresentam a cultivar Mundo Novo como genitores, fato que tem sido observado na literatura (MIRANDA, 2003). A cultivar Catuaí Vermelho IAC 144, utilizada como padrão de suscetibilidade neste trabalho, mostrou-se suscetível ao patógeno e útil como testemunha de suscetibilidade em testes que visam a resistência de cafeeiros à *Colletotrichum* spp.

A cultivar Mundo Novo foi originada de um cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho (MENDES et al., 2008). No presente trabalho, o acesso Sumatra amarelo mostrou-se suscetível ao patógeno e, como os acessos de Bourbon apresentaram-se moderadamente resistentes, é possível que a suscetibilidade dos genótipos Mundo Novo seja derivado da cultivar Sumatra.

O acesso IPR100, que se mostrou suscetível, já é uma cultivar comercial e apresenta como característica marcante resistência ao nematoide *Meloidogyne paranaenses* (SERA et al., 2007b). Essa cultivar originou-se de um genótipo de

Catuai (IAPAR Vit. 83) e, segundo Sera et al. (2007a), a mesma apresentou produção e vigor vegetativo normais em áreas infestadas com o fitonematoide. Entretanto, em testes com a ferrugem alaranjada, a cultivar mostrou suscetibilidade similar ao da Catuai Vermelho IAC 81 (SERA et al., 2010), o mesmo observado nesse trabalho com *Colletotrichum* spp.

A AACPD e o IID foi estatisticamente diferente nos materiais analisados. Pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), cinco grupos distintos foram formados para as duas variáveis (Tabela 3). O acesso IAPAR 59 foi o que apresentou a menor AACPD, seguido do acesso Obatã Tardio. No total, vinte e três acessos se comportaram de maneira homogênea com uma AACPD e IID intermediários. Os acessos Sumatra Amarelo, IPR 100, Híbrido de Timor UFV 376-12 e a cultivar Catuai Vermelho (padrão de suscetibilidade) apresentaram a mesma AACPD, sendo superiores às anteriores. Como mais suscetível ao *Colletotrichum* spp. encontraram-se os acessos Mundo Novo Ponta Roxa e Plantas Antigas MS, apresentando uma AACPD maior em relação às demais. Somente os acessos Híbrido de Timor UFV 377-02, Pacamara, Catuai Vermelho, Sumatra Amarelo, Híbrido de Timor UFV 376-12 e IPR100 apresentaram uma AACPD e IID estatisticamente diferentes, mas ambos foram mais suscetíveis que o restante dos materiais.

A AACPD e o IID tiveram uma alta correlação (0,937) pelo método de Pearson. Sendo assim, pode-se optar por uma ou outra variável para a avaliação da resistência em mudas de café inoculadas com *Colletotrichum* spp.. A AACPD é uma medida quantitativa da intensidade da doença no decorrer do tempo e muito utilizada para a avaliação da resistência de materiais genéticos, em campo, a determinadas doenças de plantas (JEGER; VILJANEN-ROLLINSON, 2001).

Segundo Parlevliet (1988), a quantificação da proporção do tecido doente por mais de uma vez, durante a epidemia no campo, possibilita o cálculo da AACPD, o qual a considera um bom indicador da resistência quantitativa. No

presente trabalho, observaram-se sintomas de necrose em todos os acessos, diferindo apenas na severidade da doença. Esse fato reforça o envolvimento da resistência horizontal no patossistema, já indicado por Santos Neto (2012).

O IID calcula a porcentagem da área do tecido doente e é mensurada em uma única avaliação da doença, normalmente, entre 20 a 30 dias após a inoculação do patógeno. Sendo assim, é uma variável relativamente mais fácil de ser medida, o que facilita os trabalhos em programas de melhoramento do cafeeiro, visando resistência ao *Colletotrichum* spp.

Para a doença *Coffee Berry Disease*, o teste de seleção visando resistência também é baseado em apenas uma única avaliação da severidade da doença, em hipocótilos de cafeeiro, a partir da qual se calcula a intensidade da doença e se realiza a classificação dos materiais à semelhança do que foi realizado no presente trabalho. Vossen, Cook e Marakaru (1976), trabalhando com diferentes isolados de *Colletotrichum kahawae* e vários genótipos de café, encontraram uma correlação de 0,76 entre o teste em hipocótilo e a doença no campo.

Chaves, Martinelli e Federizzi (2004) mencionam que os componentes de resistência que atuam na redução das doenças pode sofrer alteração dependendo do patossistema. Além disso, os autores mencionam que, para selecionar materiais resistentes avaliando-se apenas um componente de resistência, esse deve apresentar alta relação com a AACPD, o que facilitaria a seleção de materiais resistentes nos programas de melhoramento de plantas, fato que foi observado com o IID neste trabalho.

5 CONCLUSÃO

Existem genótipos de cafeeiro no Banco Ativo de Germoplasma de Café da EPAMIG, que podem ser incorporados em futuros programas de melhoramento genético do cafeeiro, visando resistência à *Colletotrichum* spp.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. S. **Resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. em cafeeiros descendentes do Híbrido de Timor**. 1988. 68 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

CARVALHO, C. H. S. de et al. Cultivares de café arábica de porte baixo. In: CARVALHO, C. H. S. de (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: EMBRAPA Café, 2008. v. 1, p. 157-226.

CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; FEDERIZZI, L. C. Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: III., correlação de componentes de resistência entre si e com a intensidade de doença no campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 197-200, mar./abr. 2004.

CIRULLI, M.; ALEXANDER, L. J. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. *licopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 56, p. 1301-1304, 1966.

DORIZZOTTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* spp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais**. 1993. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

FAZUOLI, L. C. et al. Cultivares de café arábica de porte alto. In: CARVALHO, C. H. S. de. (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: EMBRAPA Café, 2008. v. 1, p. 227-254.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FERREIRA, J. B. et al. Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeeiros e com sintomas da mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 956-964, jul./ago. 2009.

JEGER, M. J.; VILJANEN-ROLLINSON, S. L. H. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 1, p. 32-40, Jan. 2001.

LINS, S. R. O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 488-495, nov./dez. 2007.

MAIA, F. G. M. et al. Comportamento de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em mudas micropropagadas de café. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 6, p. 1896-1904, nov./dez. 2013.

MENDES, A. N. G. et al. História das primeiras cultivares de café plantadas no Brasil. In: CARVALHO, C. H. S. de (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: EMBRAPA Café, 2008. p. 157-226.

MIRANDA, E. F. O. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PARADELA FILHO, O. et al. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: IAC, 2001. 11 p. (Boletim Técnico IAC, 191).

PARLEVLIET, J. E. Strategies for the utilization of partial resistance for the control of cereal rusts. In: SIMMONDS, N. W.; RAJARAM, S. (Ed.). **Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat**. Mexico: CIMMYT, 1988. p. 48-62.

PEREIRA, A. A. et al. Cultivares: origem e suas características. In: REIS, R. P.; CUNHA, R. L. (Ed.). **Café Arábica do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG, 2010. p. 163-221.

SALGADO, S. M. L. et al. Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros Iapar-59 e Catuaí. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 205-207, jul. 2002.

SANTOS NETO, H. **Resistência em cafeeiro a *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mancha manteigosa**. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SERA, G. H. et al. Correlação entre a necrose de frutos associada ao *Colletotrichum* spp. com as características frutos por nó e produtividade entre genótipos de café arábica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 48-54, jan./fev. 2008.

SERA, G. H. et al. Correlação entre a ocorrência de *Colletotrichum* spp. e outras características agronômicas em cafeeiros. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 435-440, abr. 2005a.

SERA, G. H. et al. Partial resistance to fruit necrosis associated to *Colletotrichum* spp. among arabic coffee genotypes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 395-402, May 2007a.

SERA, G. H. et al. Progenies de *Coffea arabica* cv IPR-100 resistentes ao nematóide *Meloidogyne paranaensis*. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 43-49, 2007b.

SERA, G. H. et al. Resistance to leaf rust in coffee cultivars. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 59-66, Jan./Apr. 2010.

SERA, G. H. et al. Resistência de campo ao *Colletotrichum* spp. entre genótipos de café (*Coffea arabica* L.). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2005b. 1 CD-ROM.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 3, p. 1051-1056, Feb. 1997.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide. Version 9.2. Cary, 2009. 7869 p.

VÁRZEA, V. M. P. et al. The use of Sarchimor derivatives in coffee breeding for resistance to leaf rust. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 22., 2008, Campinas. **Proceedings...** Campinas: ASIC, 2008. p. 1424-1429.

VOSSSEN, H. A. M. van der; COOK, R. T. A.; MARAKARU, G. N. W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noack (sensu Hindorf) in *Coffea arabica* L.: I., methods of pre-selection for resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, p. 733-745, 1976.

ANEXO

ANEXO A - Sintomas de antracnose apresentados pelos diferentes acessos de cafeeiro

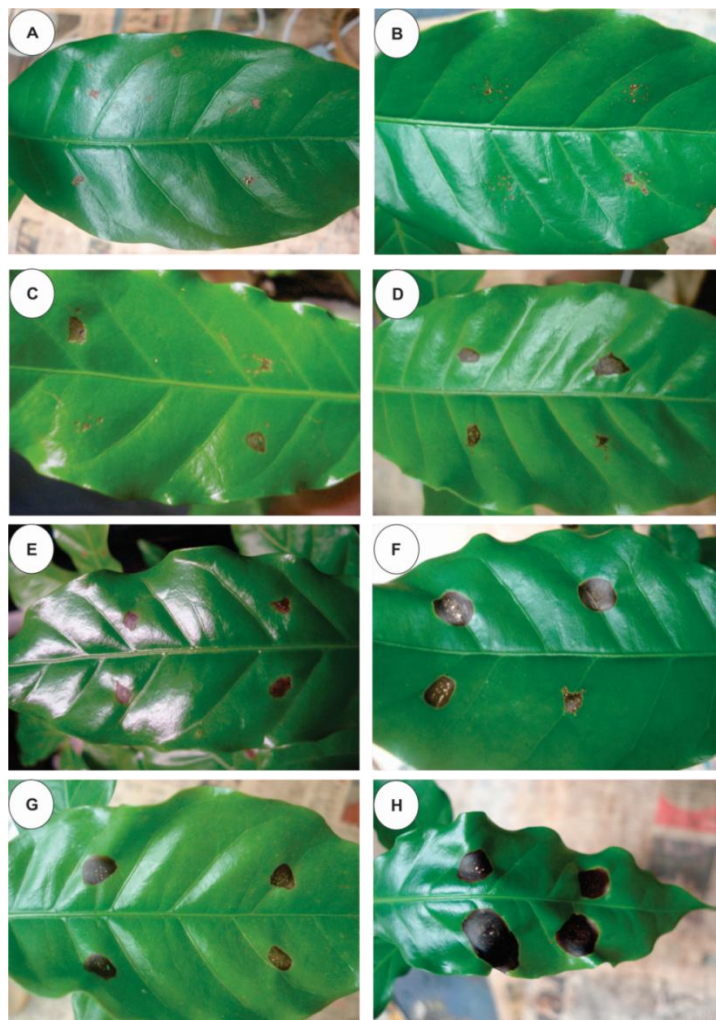


Figura 1 Sintomas de necrose nos diferentes acessos inoculados com *Colletotrichum* sp. aos 20 dias após a inoculação

Nota: A) MG 10620 (IAPAR 59); B) MG 0245 (Obatã Tardio); C) MG 0225 (Iapar 59 polispermia); D) MG 0169 (Maragogipe Amarelo); E) MG 1182 (Tupi Amarelo); F) MG 0150 (Iarana 1973/74 IAC 1110); G) MG 0579 (Dilla Alghe x H. Timor UFV 400- 01); H) MG 0282 (Híbrido de Timor UFV 376-12).

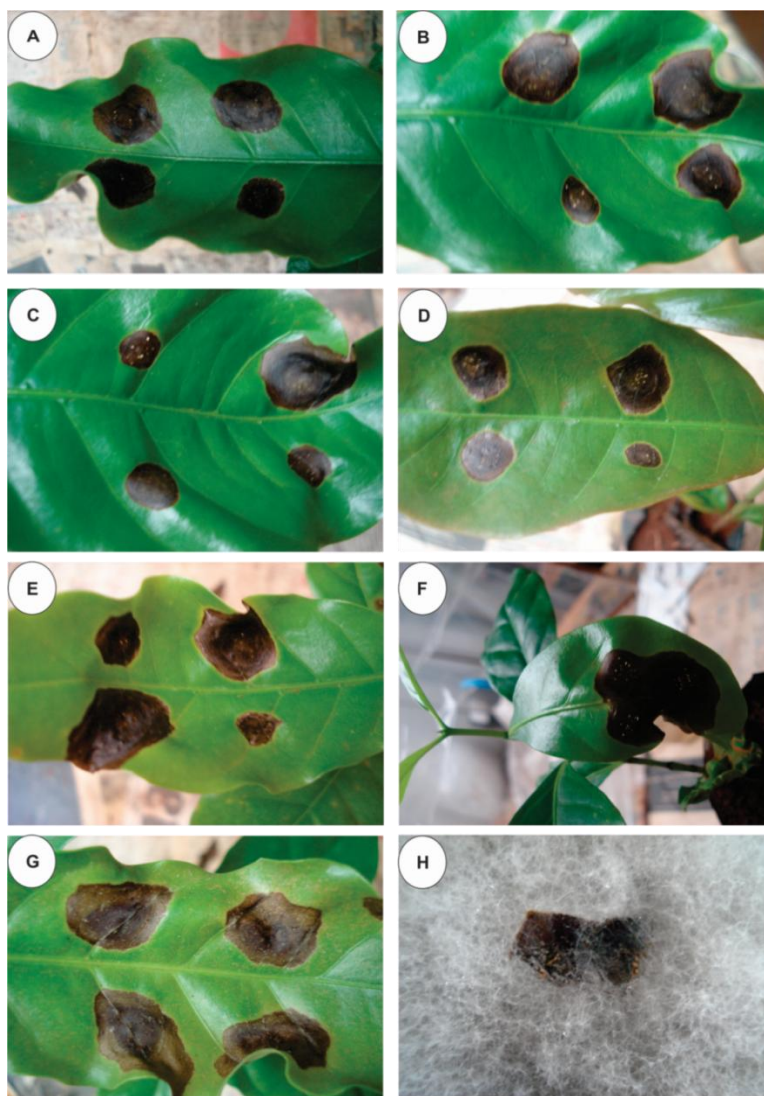


Figura 2 Sintomas de necrose nos diferentes acessos inoculados com *Colletotrichum* sp. aos 20 dias após a inoculação

Nota: A) MG 0139 (Mundo Novo Amarelo); B) MG 0152 (Icatu Precoce IAC 3282); C) MG 1178 (IPR100); D) MG 0140 (Mundo Novo Ponta Roxa); E) MG 0148 (Plantas Antigas MS); F) MG 0140 (Mundo Novo Ponta Roxa); G) Catuaí Vermelho Padrão de Suscetibilidade; H) Isolamento de *Colletotrichum* sp. das lesões necrosadas.

CAPÍTULO 4 Identificação de marcadores moleculares envolvidos na interação *Colletotrichum X* cafeeiro

RESUMO

O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético tem se consolidado como uma técnica auxiliar nas etapas de seleção. Objetivou-se, na presente pesquisa, a identificação de marcadores moleculares, provenientes de sequências expressas do projeto genoma café, envolvidos na resistência do cafeeiro à *Colletotrichum* spp. Para isso, utilizaram-se 24 acessos obtidos do Banco de Germoplasma da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, os quais foram previamente inoculados com *Colletotrichum* spp. e classificados em resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente suscetíveis e suscetíveis. Coletaram-se folhas jovens totalmente expandidas de três plantas de cada acesso. A extração do DNA foi realizada com *kit* de extração Wizard Genomic DNA Purification Kit®, seguindo o protocolo do fabricante. Utilizaram-se os 59 pares de *primers*, já publicados na literatura, que foram derivados de sequências expressas do projeto genoma café. A amplificação dos fragmentos foi realizada pela técnica de PCR e os produtos amplificados foram visualizados transiluminador, após eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed®. Dentre os *primers* testados, 43 foram amplificados. Desses, doze foram monomórficos, como os CARFs 022, 023, 025, 026, 049, 050, 051, 052, 054, 056, 057 e 059. No presente trabalho não se encontraram *primers* polimórficos capazes de diferenciar os diferentes acessos. Porém, informações importantes devem ser consideradas para futuros trabalhos, como a utilização de enzimas de restrição nos produtos amplificados para tentar gerar polimorfismo e a realização do sequenciamento para a detecção de SNPs (Single nucleotide polymorphisms).

Palavras-chave: EST-PCR. Projeto genoma café. Melhoramento genético. *Coffea arabica* L.

ABSTRACT

The use of molecular markers in plant breeding has been consolidated as a support tool in the stages of selection. This research aimed to identify molecular markers from expressed sequence tags published in the coffee genome project, involved in the resistance of coffee to *Colletotrichum* sp. For this, we used 24 accessions of coffee obtained from the Germplasm Bank of Agricultural Research of Minas Gerais which were previously inoculated with *Colletotrichum* sp. and classified as resistant, moderately resistant, moderately susceptible and susceptible. We collected fully expanded young leaves of three plants of each accession. DNA extraction was performed using Wizard Genomic DNA Extraction Purification Kit® following the manufacturer's protocol. We used 59 pairs of primers already published in the literature that were derived from expressed sequence in the coffee genome project. The amplification of fragments was performed by PCR and the amplified products were visualized through the transilluminator after electrophoresis on 1.5% agarose gel and stained with GelRed®. Considering the primers were tested aiming to obtain molecular markers, 43 were amplified and twelve of them showed monomorphic patterns (CARFs 022 , 023 , 025 , 026 , 049 , 050 , 051 , 052 , 054 , 056 , 057 and 059). In the present study, we did not find polymorphic primers which could classify the accessions in different categories. Although the results were not conclusive, some important information should be considered for future researches such as using restriction enzymes in amplified products to try to create polymorphism and completion of the sequencing for the detection of SNPs (single nucleotide polymorphisms).

Keywords: EST- PCR. Coffee genome project. Genetic improvement. *Coffea arabica* L.

1 INTRODUÇÃO

O uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas, visando resistência às doenças tem sido consolidado como uma ferramenta auxiliar durante as etapas de seleção. Diversos tipos de marcadores são utilizados para diferentes culturas, salientando-se os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*), entre outros (ALKIMIN et al., 2013; ALZATE-MARIN et al., 2005; MISSIO et al., 2009). Todavia, após o sequenciamento do genoma de espécies de interesse, os marcadores designados como *Expressed Sequence Tag Polymerase Chain Reaction* (EST-PCR) têm sido adotado nas pesquisas.

Os marcadores EST-PCR possuem algumas vantagens para estudos genéticos, pois eles marcam genes expressos, sendo particularmente úteis para o mapeamento de QTLs (ALVARENGA et al., 2011). Segundo Rowland et al. (2003) se um marcador EST-PCR é encontrado ligado a um QTL é possível que o gene, a partir do qual esse marcador foi derivado, controle a característica em questão. Pelo fato de serem originados de regiões codificadoras, que são mais conservadas entre as populações e espécies do que as não codificadoras, os marcadores EST-PCR são úteis para o estudo de mapeamento comparativo. Além disso, os EST-PCR podem ser herdados codominantemente, o que permite a identificação de dois alelos diferentes, em locos heterozigotos de organismos diploides.

Para a cultura do café, as pesquisas usando marcadores do tipo EST-PCR foram intensificadas após o desenvolvimento do Projeto Brasileiro do Genoma Café, em 2002. Milhares de sequências EST foram obtidas e disponibilizadas para uso por meio dos pesquisadores de diversas instituições envolvidas no projeto (VIEIRA et al., 2006). Com isso, o número de publicações em diferentes linhas de pesquisas tem aumentado (ALVARENGA et al., 2010, 2011; FREIRE et al., 2013; PINTO; MALUF; GUERREIRO-FILHO, 2007).

Contudo, resultados referentes ao uso dessas sequências, para identificação de resistência de plantas de café ao *Colletotrichum* spp., são escassos.

Objetivou-se, na presente pesquisa, identificar marcadores moleculares provenientes de sequências expressas do projeto genoma café, envolvidas na resistência do cafeeiro à *Colletotrichum* spp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos acessos de cafeeiro

Foram utilizados 24 acessos do Banco de Germoplasma de Café da Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Patrocínio, Minas Gerais os quais já foram previamente inoculados com *Colletotrichum* spp. e classificados como resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente suscetíveis e suscetíveis (Tabela 1).

Tabela 1 Identificação dos acessos utilizados para a extração do DNA e aplicados na reação de PCR junto com os *primers* desenhados por Alvarenga et al. (2011), para a verificação da amplificação dos fragmentos em gel de eletroforese

Número do Acesso	Acesso	Reação (IID)	Identificação
MG 1062	IAPAR 59	R (15,63)	A
MG 0245	Obatã Tardio	R (20,83)	B
MG 0225	IAPAR 59 polispermia	MR (36,46)	C
MG 0007	Bourbon Amarelo	MR (39,58)	D
MG 1182	Tupi Amarelo	MR (40,63)	E
MG 0890	Bourbon 43/7 x RP 13 x CIFC 264 UFV 360-01	MR (40,63)	F
MG 0213	Caturra Vermelho	MR (45,83)	G
MG 0271	Híbrido de Timor UFV 377-15	MR (45,84)	H
MG 0194	Caturra Amarelo Colombiano	MR (44,79)	I
MG 0212	Caturra Amarelo	MR (45,83)	J
MG 1043	Sarchimor UFV 349-38	MR (47,92)	L
MG 0179	Ct. V. X Amphillo MR 2161	MR (48,96)	M
MG 0279	Híbrido de Timor UFV 376-31	MS (61,54)	N
MG 0290	Híbrido de Timor UFV 342-50	MS (64,58)	O
MG 0282	Híbrido de Timor UFV 376-12	MS (71,87)	P
MG 0277	Híbrido de Timor UFV 376-52	MS (71,87)	Q
MG 0138	Mundo Novo Purpuracia	MS (73,96)	R
MG 1178	IPR100	S (88,54)	S
MG 0139	Mundo Novo Amarelo	S (76,04)	T
MG 0137	Sumatra Amarelo	S (77,08)	U
MG 0152	Icatu Precoce IAC 3282	S (79,17)	V
MG 0224	Pacamara	S (80,21)	X
MG 0148	Plantas Antigas MS	S (86,46)	Z
MG 0140	Mundo Novo Ponta Roxa	S (89,58)	W

Reação: Resposta dos acessos a *Colletotrichum* spp. (dados não publicados). R= resistentes; MR: moderadamente resistentes; MS: moderadamente suscetíveis; S: suscetíveis. IID= Índice de Intensidade da doença, aos 20 dias após inoculação. Identificação: Substituição dos nomes dos acessos por letras, nos resultados de amplificação dos fragmentos de DNA.

Todas as sementes foram obtidas de frutos no estágio cereja, colhidos manualmente. Realizou-se o despulpamento dos frutos para a obtenção das sementes, que foram desmuciladas por fermentação em água, durante 24 horas.

Após a retirada da mucilagem, as mesmas foram lavadas em água corrente e colocadas à sombra para secar, até atingirem aproximadamente 18% de umidade. Em seguida, as mesmas foram semeadas em saquinhos plásticos, contendo substrato composto por terra, areia, esterco bovino e superfosfato simples. Essas foram levadas para o viveiro de mudas localizado na EPAMIG, em Lavras, MG.

2.2 Extração do DNA

Coletaram-se folhas jovens totalmente expandidas de três plantas de cada acesso as quais foram misturadas para constituir-se uma amostra. Após a coleta, as amostras foram envolvidas em papel alumínio, identificadas, mergulhadas em nitrogênio líquido, e após o congelamento, foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer, a -80°C.

A extração do DNA foi realizada com o kit de extração Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada pelo equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Para a amplificação, o DNA foi diluído em água ultrapura, para uma concentração final de 100 ng/μl.

Sequências dos Primers provenientes do Projeto Genoma Café

Utilizaram-se os 59 pares de primers, construídos por Alvarenga et al. (2011), que vieram de sequências expressas mineradas in silico do projeto genoma café, com maior possibilidade de estarem envolvidas na resistência do cafeeiro às doenças.

É importante salientar, resumidamente, como esses 59 primers foram obtidos. Alvarenga et al. (2010) realizaram a identificação de sequências

expressas do Projeto Brasileiro do Genoma Café, potencialmente associadas com resistência à doenças, encontrando 11.300 ESTs com alto nível de similaridade com proteínas relacionadas ao processo de defesa do cafeeiro à doenças e pragas.

Já Alvarenga et al. (2011) utilizaram as sequências encontradas por Alvarenga et al. (2010) e também realizaram uma nova mineração dos dados, utilizando duas estratégias de mineração: Eletronic Northern e Sequências Publicadas. As sequências mineradas foram analisadas para identificar aquelas que apresentaram maior possibilidade de estarem envolvidas na defesa do cafeeiro a doenças. Essa análise foi baseada na anotação de cada sequência, observando-se o organismo homólogo, a função potencial da sequência, o e-value menor ou igual a 10⁻²⁰, o score maior ou igual a 100 e, para os contigs, a presença de ESTs- provenientes da biblioteca RM1- que é uma biblioteca de folhas de *Coffea arabica* infectadas com bicho mineiro e ferrugem, e é uma fonte potencial de sequencias envolvidas no processo de resistência da planta contra doenças.

Com essas duas estratégias de mineração dos dados, os autores identificaram 2.272 sequências e junto com as 11.300 sequências obtidas por Alvarenga et al. (2010) selecionaram 62 com maior possibilidade de estarem envolvidas na resistência do cafeeiro a patógenos e desenharam os *primers* que as amplificaram. Após a análise da estabilidade dos *primers*, sintetizaram-se 59 pares de iniciadores os quais foram denominados de CARF 001 a CARF 059 (Tabela 3) (Anexos).

A amplificação dos fragmentos por PCR foi em reações de 25 µL, contendo: tampão 1X; 1,5 mM de MgCl₂; 1 µM de cada primer; 0,2 mM de cada um dos dNTPs; 1,25 U de Taq DNA polimerase e 100 ng de DNA. A PCR foi realizada em termociclador Maxygene (Axygen). Para a amplificação, utilizou-se o procedimento *touchdown* PCR, fundamentado em uma etapa de

desnaturação inicial de 95°C, por dois minutos, seguido de cinco ciclos, com uma etapa de desnaturação de 95°C por 45 segundos, uma etapa de anelamento por 20 segundos e extensão a 72°C, por 40 segundos. A temperatura de anelamento foi de 60°C a 55°C, reduzindo 1°C a cada ciclo. Após os cinco ciclos, procederam-se a mais 30 ciclos, com desnaturação a 95°C por 60 segundos, anelamento de 55°C, por 20 segundos e extensão de 72°C, por 40 segundos, com extensão final de 72°C, por sete minutos.

Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados com transiluminador, após eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed® (Biotium).

3 RESULTADOS

A reação dos genótipos avaliados para o *Colletotrichum* spp., de acordo com o Índice de Incidência da Doença (IID) classificou os genótipos A e B como resistentes, C até M como moderadamente resistentes, os genótipos N até R como moderadamente suscetíveis e os genótipos S até W como suscetíveis (Tabela 1). Desse modo, verifica-se variabilidade desse caráter para os diferentes genótipos utilizados.

Para os 59 pares de *primers* testados, 43 foram amplificados (Tabela 2). Desse total, doze não apresentaram polimorfismo entre os genótipos avaliados como os CARFS 022, 023, 025, 026, 049, 050, 051, 052, 054, 056, 057 e 059.

Quando comparado com o trabalho de Alvarenga et al. (2011), os *primers* (CARFs) de número 009, 010, 016, 021, 027, 029, 031, 032, 035, 041, 044 e 045 não amplificaram nenhum fragmento em ambas as pesquisas (Tabela 2). Já os *primers* de número 012, 019, 033 foram efetivos no trabalho conduzido por Alvarenga et al. (2011), mas não no presente trabalho. Os *primers* de número 023, 036, 037, 043, 046, 048, 056 amplificaram alguns fragmentos no presente trabalho, mas não na pesquisa de Alvarenga et al. (2011).

Tabela 2 Produtos da amplificação de 59 pares de *primers* (CARFs) obtidos a partir de sequências expressas tipo EST-PCR para 24 acessos. (A e B)= Acessos resistentes; (C-M)= moderadamente resistentes; (N-R) moderadamente suscetíveis e (S-W) suscetíveis

CARFS	Acessos																							
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	X	Z	W
001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
003	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
005	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
006	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
007	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
008	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
011	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
014	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
015	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
017	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
018	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
020	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
022	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

“Tabela 2, continuação”

CARFS	Acessos																								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	X	Z	W	
023	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
024	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
026	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
028	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
029	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
030	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
033	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
034	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
036	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
037	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
038	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
039	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
040	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
042	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
043	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
044	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
046	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

“Tabela 2, conclusão”

CARFS	Acessos																								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	X	Z	W	
047	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
048	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
049	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
050	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
051	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
052	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
053	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
054	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
055	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
056	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
057	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
058	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
059	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

⁺ Fragmento amplificado e detectado; ⁻ Fragmento não amplificado; * Dímeros de *primers*

Genótipos A e B= Resistentes; Genótipos C-M: Moderadamente Resistentes; Genótipos N-R= Moderadamente Suscetíveis;
Genótipos S-W: Suscetíveis.

Os iniciadores CARF 042 e CARF 053 não amplificaram fragmentos nos acessos MG 1062 (Iapar 59) e MG 0245 (Obatã tardio), considerados resistentes, mas amplificaram nos acessos suscetíveis MG 0148 (Plantas Antigas MS) e MG 0140 (Mundo Novo Ponta Roxa) (Tabela2).

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi encontrado um baixo polimorfismo dos marcadores utilizados, não conseguindo diferenciar os genótipos em resistentes e suscetíveis. Isso pode ser explicado em função da baixa variabilidade genética entre os acessos testados e do baixo polimorfismo exibido por marcadores de EST-PCR.

Em estudos com a cultura do café, principalmente *Coffea arabica*, tem sido observada uma baixa variabilidade genética dos genótipos analisados, mesmo quando comparando espécies selvagens e cultivares comerciais, por meio de marcadores moleculares (ANTHONY et al., 2002; COMBES et al., 2000; LASHERMES et al., 1993; OROZCO-CASTILLO et al., 1994). Essa baixa variabilidade pode ser explicada pela base genética estreita dos genótipos dessa espécie, por ser uma espécie autógama que contribui para baixo nível de heterozigose e número pequeno de plantas introduzidas nos cultivos dos principais países produtores (MALUF et al., 2005; SILVESTRINI et al., 2000).

Outro fato que pode explicar os resultados obtidos é que marcadores EST-PCR são originados de regiões codificadoras de proteínas, que são altamente conservadas entre as espécies, o que pode ocasionar um menor grau de polimorfismo dos marcadores moleculares derivados dessas sequências.

O marcador CARF 005 exibiu um baixo polimorfismo nessa pesquisa, amplificando fragmentos em todos os acessos, exceto no “I” (Tabela 2). Esse resultado é diferente do observado por Alvarenga et al. (2011), no qual o mesmo marcador foi altamente polimórfico, amplificando por meio de PCR convencional, fragmentos somente nos genótipos resistentes à ferrugem alaranjada.

A interação do patógeno *Hemileia vastatrix*, agente etiológico da ferrugem do cafeeiro, com o cafeeiro é um exemplo clássico da teoria gene-a-

gene. Acredita-se que a resistência do cafeeiro à ferrugem seja controlada por, pelo menos, nove genes (oligogenes) de efeitos maiores (SH1-SH9), os quais podem atuar individualmente ou em associação (BETTENCOURT; RODRIGUES JUNIOR, 1988). Em oposição, estudos apontam que a resistência do cafeeiro ao *Colletotrichum* spp. seja do tipo horizontal (poligênica), controlado por vários genes de efeitos menores (SANTOS NETO, 2012). Sendo assim, a busca por marcadores moleculares polimórficos, que possam ser utilizados em programas de melhoramento genético, visando seleção assistida, seja mais complicado para caracteres quantitativos do que qualitativos, o que pode explicar os resultados distintos encontrados neste trabalho para *Colletotrichum* spp., em relação à ferrugem do cafeeiro.

É possível que os iniciadores CARF 042 e CARF 053, que não amplificaram fragmentos nos acessos resistentes, mas amplificaram nos acessos suscetíveis, codifiquem um fator que pode facilitar o desenvolvimento e progresso da doença, apesar dos mesmos serem construídos a partir de sequências envolvidas na resistência do cafeeiro às doenças.

Dentre os iniciadores, 15 não amplificaram fragmento algum de DNA. Por serem construídos a partir de ESTs, ou seja, de regiões codificadoras, é possível que a razão da não amplificação seja devido à presença de íntrons (regiões não codificadoras) (ALVARENGA et al., 2011).

Para os *primers* que foram monomórficos, pode-se recorrer ao uso de enzimas de restrição, visando reduzir o tamanho das sequências amplificadas, de modo que possa haver polimorfismo. Essas têm sido algumas das técnicas utilizadas por pesquisadores, para aumentar o polimorfismo dos marcadores utilizados (MA; WEI; CHENG, 2004; VILELA et al., 2009).

No trabalho de Vilela et al. (2009), os autores utilizaram 53 pares de *primers* de genes candidatos os quais podem atuar em rotas metabólicas de compostos, relacionados à qualidade da bebida. Foi observado que, apenas 4

pares de *primers* foram polimórficos, quando testados em uma população de 144 indivíduos. Para as reações que apresentaram padrões monomórficos, foram utilizados quatro enzimas de restrição, que revelaram seis combinações polimórficas, sendo duas dessas com duas bandas polimórficas e as outras quatro, com apenas uma banda polimórfica. Sendo assim, a utilização de enzimas de restrição pode ser empregada nos produtos amplificados pelos *primers* que foram monomórficos neste trabalho, visando identificar marcadores polimórficos que consigam separar aqueles genótipos resistentes dos suscetíveis ao *Colletotrichum* sp.

Outra possibilidade de trabalhos com os *primers* que foram monomórficos, nesta presente pesquisa, seria a realização do sequenciamento dos produtos amplificados, para tentar identificar SNPs (single nucleotide polymorphisms) que são as variações mais abundantes no genoma (NASU et al., 2002). Esses são resultantes em mutações pontuais nas sequencias de DNA, encontradas em regiões do genoma codificantes ou não codificantes de proteínas. Em razão da alta frequência de ocorrência nos genomas, os SNPs são importantes fontes de variabilidade que podem ser utilizadas para construção de mapas genéticos e para o mapeamento de características interessantes (BROOKES, 1999).

Além disso, pelas evidências da resistência dos genótipos de cafeeiro ao *Colletotrichum* spp. ser do tipo quantitativa (poligênica), outra opção seria tentar verificar diferenças quantitativas na expressão dos genes amplificados pelos *primers* monomórficos, com a técnica de PCR em tempo real, ou por ensaios de microarranjos, quando essa técnica estiver disponível para a cultura do café.

5 CONCLUSÃO

Na presente pesquisa, os *primers* utilizados não foram efetivos para diferenciar acessos com resistência inespecífica ao *Colletotrichum* ssp.

REFERÊNCIAS

ALKIMIM, E. R. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência à ferrugem do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 8., 2013, Salvador. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2013. 1 CD-ROM.

ALVARENGA, S. M et al. *In Silico* identification of coffee genome expressed sequences potentially associated with resistance to diseases. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 4, p. 795-806, Apr. 2010.

ALVARENGA, S. M. et al. Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência a ferrugem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 890-898, ago. 2011.

ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, jul./ago. 2005.

ANTHONY, F. et al. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 5, p. 894-900, Feb. 2002.

BETTENCOURT, A. J.; RODRIGUES JUNIOR, C. J. Principles and practices of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee agronomy**. London. Elsevier, 1988. p. 199-234.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, v. 234, n. 2, p. 177-186, July 1999.

COMBES, M. C. et al. Characterization of microsatellites loci in *Coffea arabica* and related coffee species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 1171-1193, Aug. 2000.

FREIRE, L. P. et al. Análise da expressão do gene manose 6 fosfato redutase em cafeeiros submetidos ao déficit hídrico. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 17-23, jan./fev. 2013.

LASHERMES, P. et al. Use of random amplified DNA markers to analyze genetic variability and relationships of *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 40, n. 2, p. 91-93, Jan. 1993.

MA, Z. Q.; WEI, J. B.; CHENG, S. H. PCR-based markers for the powdery mildew resistance gene Pm4a in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 140-145, June 2004.

MALUF, M. P. et al. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 366-373, July/Aug. 2005.

MISSIO, R. F. et al. Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 9, p. 361-371, 2009.

NASU, S. et al. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. **DNA Research**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 163-170, Oct. 2002.

OROZCO-CASTILLO, C. et al. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 8, p. 934-940, Mar. 2004.

PINTO, F. O.; MALUF, M. P.; GUERREIRO-FILHO, O. Study of simple sequence repeat markers from coffee expressed sequences associated to leaf miner resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 377-384, mar. 2007.

ROWLAND, L. J. et al. Development of EST-PCR markers for DNA fingerprinting and genetic relationship studies in blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, n. 5, p. 682-690, Sept. 2003.

SANTOS NETO, H. **Resistência em cafeeiro a *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mancha manteigosa**. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVESTRINI, M. et al. Caracterização de linhagens comerciais de café através de marcadores moleculares. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2000. 1 CD-ROM.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 95-108, Jan./Mar. 2006.

VILELLA, O. T. et al. Obtenção de marcadores moleculares por meio de PCR-RFLP de genes relacionados com qualidade em café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6., 2009, Vitória. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2009. 1 CD-ROM.

ANEXO

ANEXO A - Figuras da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados pelos diferentes primers testados

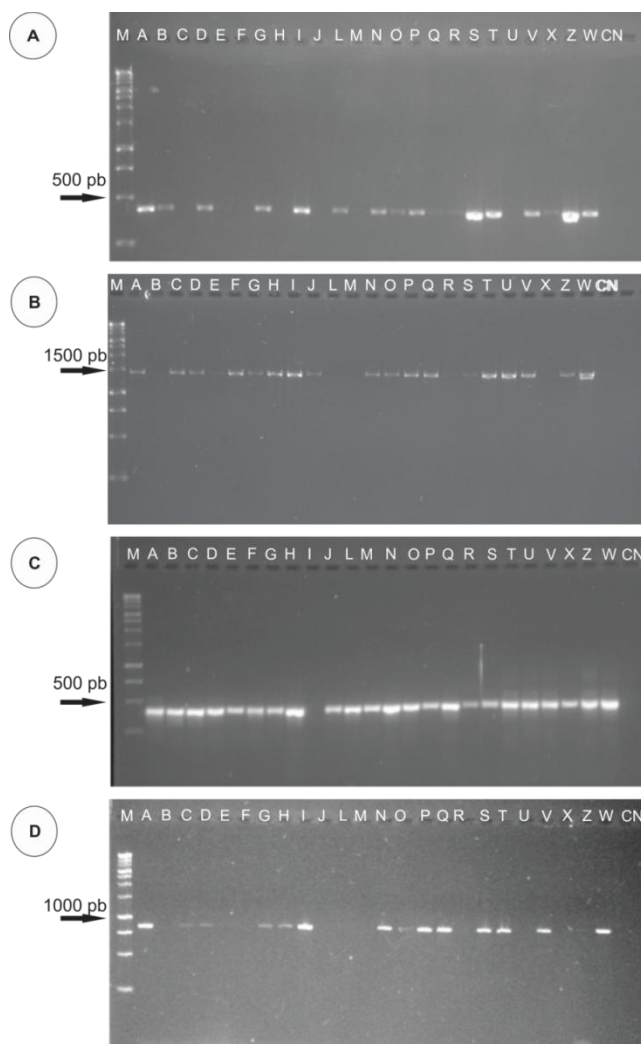


Figura 1 Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados dos genótipos de cafeeiro resistentes (A e B); moderadamente resistentes (C-M); moderadamente suscetíveis (N-R) e suscetíveis (S-W) pelos iniciadores: (A) CARF 003, (B) CARF 020, (C) 005 e (D) CARF 006

Nota: M= Marcador de peso molecular 1kpb. CN= controle negativo.

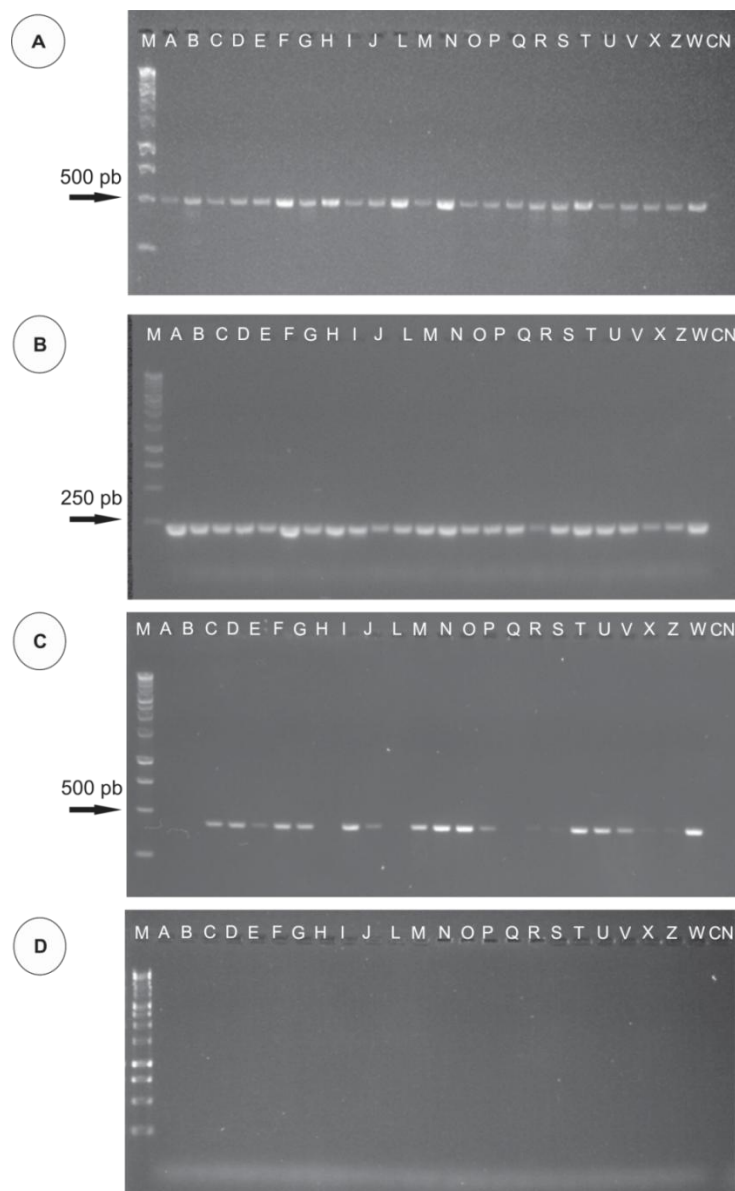


Figura 2 Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados dos genótipos de cafeeiro resistentes (A e B); moderadamente resistentes (C-M); moderadamente suscetíveis (N-R) e suscetíveis (S-W) pelos iniciadores: (A) CARF 025, (B) CARF 056, (C) 042 e (D) CARF 012

Nota: M= Marcador de peso molecular 1kpb. CN= controle negativo.

Tabela 3 Iniciadores obtidos a partir das sequências ESTs mineradas do Projeto Genoma Café (Alvarenga et al. 2011)

CARF 001(1)(+)	gi 24459841 emb CAC82597.1 disease resistance - like protein [Coffea arabica]	259	2.00E-67	CAAGAAACAATGGCTGAGG	CAATAGAGTCGGTCGGTCTG
CARF 002(1)(+)	gi 15225780 ref NP_180241.1 leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative [Arabidopsis thaliana]	296	1.00E-78	GGGTCCAAAGTGTGTAGG	CATCGTCTGTTTCACCTCTG
CARF 003(1)(+)	gi 42602161 gb AAS21681.1 receptor-like kinase [Arabidopsis thaliana]	102	1.00E-20	CGTCCACGAGAAGATGATAC	TGAGTTGCCAAGAAGTTG
CARF 004(1)(+)	gi 15226721 ref NP_179220.1 leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative [Arabidopsis thaliana]	131	4.00E-13	TGCCAAACCTTACTGCTTTC	GCTGTTTCATCTCCATTTC
CARF 005(2)(+)	gi 24459841 emb CAC82597.1 disease resistance - like protein [Coffea arabica]	260	2.00E-68	GGACATCAACACCAACCTC	ATCCCTACCATCCACTTCAAC
CARF 006(2)(+)	gi 30689664 ref NP_195056.2 disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative [Arabidopsis thaliana]	652	0	GTCCCTATTCTGCCACTTGG	CAGCCCTTCTCTCTTCTG
CARF 007(2)(+)	gi 4835586 dbj BAA77677.1 acidic chitinase [Glycine max]	268	2.00E-70	ACTGTCCGGATACAACACAC	GAAGAGCCAGGACTACATTTC
CARF 008(3)(+)	gi 34907232 ref NP_914963.1 putative disease resistance protein 12 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	108	1.00E-16	TGAGCGATTTACTGTCTGTTG	TTCAGAGACGCAAGGTTT
CARF 009(3)(-)	gi 15225286 ref NP_180201.1 receptor-related protein kinase, ERECTA [Arabidopsis thaliana]	180	2.00E-60	AGTTTGAGCGGAGAAATACC	CAATAGGCTGCTGGTAAATGTAG
CARF 010(3)(-)	gi 12331298 emb CAC24711.1 cytochrome P450 [Solanum tuberosum]	208	1.00E-52	TCCCTTACCTTCATCTTC	GCTTACTCTCCCAAATGCTG
CARF 011(3)(+)	gi 24459849 emb CAC82600.1 disease resistance - like protein [Coffea canephora]	164	2.00E-39	AGAAGATGCTCAACCCAGAC	CCCATACCAACCACTGAAAC
CARF 012(2)(+)	gi 30689664 ref NP_195056.2 disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative [Arabidopsis thaliana]	652	0	AGAAGGTGAAGGAGATGCTG	TATTGATTCCGAGAGGGATG
CARF 013(2)(+)	gi 50899184 ref XP_450380.1 putative disease related protein 2 [Oryza sativa]	138	1.00E-65	AGAAGGCACTGGTAAGTTGG	GTAACGAATGACCGAAGGTT
CARF 014(2)(+)	gi 28555894 emb CAD45029.1 NBS-LRR disease resistance protein homologue [Hordeum vulgare]	109	3.00E-11	AGTCTGGGAGTAAATGGACAG	GGTTTCAAGGGACACAAGG
CARF 015(3)(+)	gi 5880843 gb AAD54934.1 chitinase precursor [Petroselinum crispum]	243	1.00E-111	AAAGAGGTTCTGGGTAGTGG	AATCTGGGTTGCGTAGGAG
CARF 016(3)(-)	gi 34484310 gb AAQ72788.1 hypersensitive-induced response protein [Cucumis sativus]	266	4.00E-70	ATCCATCTGTCTGCCTTC	TATCCACAATGAGCGTCTG
CARF 017(3)(+)	gi 116328 sp P17541 acidic endochitinase precursor [Cucumis sativus]	162	7.00E-39	CCTGTTGTTGATTGCTTCTC	TAAGTCGTGTTCCGCTGTG
CARF 018(3)(+)	gi 12331298 emb CAC24711.1 cytochrome P450 [Solanum tuberosum]	209	6.00E-53	ACCCAGAAACTACCACCATC	CGCATTGTCTCCAGTAATC
CARF 019(3)(+)	gi 16974114 emb CAC95155.1 putative resistance protein [Solanum lycopersicon]	253	2.00E-66	ATCCACTGCCACTCTCATC	ACCACGGCTCATTGTAAGTC
CARF 020(1)(+)	gi 21617980 gb AAM67030.1 putative RING zinc finger protein [Arabidopsis thaliana]	106	6.00E-15	CTCCTTCACATCCTCTCAC	TTCGTCTCACTCCAGGTTT
CARF 021(1)(-)	gi 30687274 ref NP_850285.1 protein kinase family [Arabidopsis thaliana]	128	1.00E-18	GCAGTCCACCACAAGTTTC	ACCACAAGGAGGGTTCTGAC
CARF 022(1)(+)	gi 18855060 gb AAL79752.1 putative protein kinase [Oryza sativa]	126	2.00E-29	ATTGCTGGGCTGTTCTACAC	ATTCCTCTCTCCTTCGTC
CARF 022(1)(+)	gi 18855060 gb AAL79752.1 putative protein kinase [Oryza sativa]	126	2.00E-29	ATTGCTGGGCTGTTCTACAC	ATTCCTCTCTCCTTCGTC
CARF 023(1)(-)	gi 4240031 dbj BAA74802.1 DNA binding zinc finger protein [Pisum sativum]	112	3.00E-15	GGGAAAGGTGATGAATGTG	AAAGTGAATCCTCCGACAG
CARF 024(1)(+)	gi 31324528 gb AAP47579.1 receptor kinase Leerk [Gossypium hirsutum]	257	2.00E-67	TGCCCTTCTTCTAATCCTG	TATGCTTGGCTGTTCATC
CARF 025(1)(+)	gi 11358841 pir serine/threonine - protein kinase-like protein [Arabidopsis thaliana]	115	1.00E-11	TGCCATTTCTGAGTGTG	TGGGAGTGATGATTGACTG

“Tabela 3, continua”

CARF 026(1)(+)	gb ABO78298.1 glycosyl transferase, family 48 [Medicago truncatula]	380	4.00E-104	GCAGTGTTCCTTCGCTTG	GCCACATCCTTACCTTTAC
CARF 027(1)(-)	gi 15221833 ref NP_173302.1 protein kinase-related [Arabidopsis thaliana]	269	3.00E-71	GAAGAAGGTGCGGTTTGAC	ACTCGGGATGTAAAGAGGTG
CARF 028(1)(+)	gi 15231381 ref NP_187364.1 membrane protein [Arabidopsis thaliana]	141	2.00E-32	CTAACACCACCCTTCAATC	AAACACCACCATCCACAAC
CARF 029(1)(-)	gi 29124139 gb AAO65880.1 putative DNA-binding protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	141	5.00E-32	ACTTAGGAGGGAATGGGAAC	GGGCTGAGAGTTGAGATAGG
CARF 030(1)(+)	gi 2792155 emb CAA11226.1 chalcone reductase [Sesbania rostrata]	105	7.00E-52	ATGTTGGTTGGCAGCAGAG	TTTCTTCTTGGTGAGTTCC
CARF 031(1)(-)	gi 30683822 ref NP_850115.1 protein kinase family [Arabidopsis thaliana]	179	2.00E-49	ATGTGGTCCCTTTGCTTG	CAGTTGCGATTCCATCC
CARF 032(1)(-)	gi 30683822 ref NP_850115.1 protein kinase family [Arabidopsis thaliana]	241	3.00E-62	CCATCTCAAGGACGGTAAAG	TCGGAGCAAGTAGCCAAAG
CARF 033(1)(+)	ref NP_189017.1 leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein [Arabidopsis thaliana]	363	9.00E-99	TCTGCCAACCATCCAAAG	CAAATGTTCCAGCCAACC
CARF 034(1)(+)	gi 92874399 gb ABE82675.1 tyrosine protein kinase, active site [Medicago truncatula]	100	2.00E-19	TGTCAGCATCATCATCAACC	TCAAGTGCCATAAGTTCTCC
CARF 035(1)(-)	gi 30686115 ref NP_850618.1 GATA zinc finger protein [Arabidopsis thaliana]	105	3.00E-11	AGTGAAGATGGAGGGTGGAG	CCTGAGTGTTTATGGGTTAGTAGG
CARF 036(2)(-)	gi 24459853 emb CAC82602.1 disease resistance-like protein [Coffea arabica]	142	5.00E-33	CCGTCTGGTTTCAATCGTC	ATCTCCTGGCAATCTCTCTG
CARF 037(2)(-)	gi 24459845 emb CAC82610.1 disease resistance-like protein [Coffea arabica]	161	2.00E-58	CCATCGCAITTCCTTTGGAG	GGAGGGATTGGTTGTTTG
CARF 038(3)(-)	gi 7488989 pir disease resistance protein Prf [Solanum lycopersicon]	163	4.00E-39	TCCCGTCTCTCTCTCTTG	TCCAGGCAGATGAAGTTTG
CARF 039(3)(+)	gi 27817976 dbj BAC55740.1 putative disease resistance gene homolog [Oryza sativa]	142	7.00E-33	AAAGAGCAGGACTTCACGAC	CTCCACTAAGCAAAGACAAC
CARF 040(3)(+)	gi 3451147 emb CAA09110.1 chitinase [Hevea brasiliensis]	266	4.00E-70	GGATACAGCACAGCAGAGAG	AGCAGCCAGGACTACATTTTC
CARF 041(3)(-)	gi 15242291 ref NP_197045.1 cyclic nucleotide-regulated ion channel (CNGC2) [Arabidopsis thaliana]	142	7.00E-63	ACTATGAACGCCAGAGGTG	GGGTCTCCTCCCTTGATC
CARF 042(3)(+)	gi 15230534 ref NP_187864.1 heat shock protein hsp70 [Arabidopsis thaliana]	425	1.00E-118	FACTCCACTGTCCTTGGTC	TCGTATCCACCTTCTCTGG
CARF 043(3)(+)	gi 3451147 emb CAA09110.1 beclin 1-like protein [Arabidopsis thaliana]	258	1.00E-67	GACATTGCCACAACACAGAC	GGGAAAGCATCAGTTAGCAC
CARF 044(3)(-)	gi 11066033 gb AAG28426.1 cytosolic aconitase [Nicotiana tabacum]	409	1.00E-120	CGGTTGACATTGACTTTGAG	GAGCCCTGTTGTTTAGGAC
CARF 045(3)(-)	gi 30013657 gb AAP03871.1 oxygen evolving complex 33 kDa photosystem II protein [Nicotiana tabacum]	373	1.00E-113	ACTTTGTAAGGGCGATTGAG	TCATCAAGGGTGTAGGTTAGG
CARF 046(3)(-)	gi 584861 sp P37118 cytochrome P450 [Solanum melongena]	296	2.00E-79	CTGGAGGGTGTGATAGAAGG	TGTGTGCTCTTGGAAACATC
CARF 047(3)(+)	gi 15021761 gb AAK77908.1 AAA-metalloprotease FtsH [Pisum sativum]	298	6.00E-80	CACTGTTGCTTCTGGGTTTC	FTCACGCTCATCAATTACCTC
CARF 048(3)(-)	gi 6934298 gb AAF31705.1 heat-shock protein 80 [Euphorbia esula]	236	3.00E-61	ATCCTGTGAATGCGGTTG	ACCCTGCTGTTGGTTACTG
CARF 049(3)(+)	gi 13752562 gb AAK38727.1 importin alpha 2 [Capsicum annum]	479	1.00E-134	TGGGCTCTCTCATCTCTC	CCTGAATCTGCTCCTTATTTC
CARF 050(3)(+)	gi 15232308 ref NP_188696.1 non-race specific disease resistance protein (NDR1) [Arabidopsis thaliana]	135	5.00E-31	GCCTGATGCCACTTTGTTTC	AGCCTACACCTTTGCTCTTC
CARF 051(3)(+)	gi 15553476 gb AAL01886.1 chitinase 3-like protein precursor [Trichosanthes kirilowii]	164	2.00E-39	CCTGTTGTTGATTGCTTCTC	TAAGTCGTGTTCCGCTGTG

“Tabela 3, conclusão”

CARF 052(3)(+)	gi 15553476 gb AAL01886.1 chitinase 3 like protein precursor [Trichosanthes kirilowii]	181	2.00E-44	GAGAGCAGGGTCAGGAATAG	GAAGATGCCGAAGAAGTGG
CARF 053(3)(+)	gi 1076693 pir S51678 chitinase (EC 3.2.1.14) class I [Sambucus nigra]	379	1.00E-104	AGCGGTGGTAATAATGGTG	TCTCTGGCTACAAGTTCAGG
CARF 054(3)(+)	gi 1345787 sp P48387 chalcone synthase [Camellia sinensis]	470	1.00E-131	GGCTGAGAACAACAAAGGTG	AAGAATGAACACGACACAGG
CARF 055(3)(+)	gi 12229619 sp Q9ZRS4 chalcone synthase [Catharanthus roseus]	187	2.00E-46	GCCTGTGCCTGTTCATTC	GGTCATTCAACCAAGCAAG
CARF 056(3)(-)	gi 7433144 pir T07101 lipoxygenase (EC 1.13.11.12) [Solanum lycopersicon]	293	5.00E-79	CCTAATCGTCCAACGTGAG	CATCTCGTGGTATGGTATCTG
CARF 057(3)(+)	gi 25044823 gb AAM28275.1 germin like protein [Ananas comosus]	107	2.00E-28	TCTGTGTTGCGGATTTGAG	TTGAAGGCTGTTGTAAGCAC
CARF 058(3)(-)	gi 15241939 ref NP_201080.1 hypersensitive induced response protein [Arabidopsis thaliana]	186	3.00E-46	GGTAAGTTTCAGGATGTGCTTG	GATTGAGTTTGGAACACTGG
CARF 059(3)(+)	gi 7438249 pir T03803 tumor-related protein [Nicotiana glauca]	146	5.00E-34	ACTACATCGGGACCACCTTC	CCTTCAACTCCGTCAGTCAG

(1)Iniciadores obtidos por meio da estratégia “electronic northern”.

(2)Iniciadores obtidos por meio da estratégia palavras-chave.

(3)Iniciadores obtidos por meio da estratégia sequências publicadas.

(+) iniciadores que funcionaram; e (-) iniciadores que não funcionaram.