

DALZA GOMES DA SILVA

LEVANTAMENTO DE RAÇAS FISIOLÓGICAS DE
Hemileia vastatrix E RESISTÊNCIA DE CLONES DE
Coffea canephora var. CONILLON À FERRUGEM

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
DEZEMBRO - 2000

Ao meus pais José e Derli (*in memoriam*).

Aos meus irmãos José Luiz (*in memoriam*), Luziene e Roseny.

Aos meus sobrinhos Raphaela, Ludmilla, Aline, Arthur, Daniel e Gabriel.

AGRADECIMENTO

Agradeço a DEUS, pelas minhas derrotas, pois me ensinaram a ser humilde, e pelas minhas vitórias, sinais de reconhecimento do meu esforço.

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

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

Ao Prof. Laércio Zambolim, pelos ensinamentos, pela orientação e pela amizade.

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

Ao Professor Ney Sakyama, ao Dr. Antonio Alves Pereira e à Cássia Sakyama, pelas valiosas sugestões, pelo ensinamentos e pela amizade.

Aos Professores Geraldo Martins Chaves e Francisco Xavier Ribeiro do Vale, pelas valiosas sugestões.

À Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária, pela concessão das mudas de café Conillon e coleta dos isolados de *Hemileia vastatrix*, no Estado do Espírito Santo.

Aos Técnicos Agrícolas, Abraão Verdin, José Luiz Gomes da Silva (in memoriam), Marcelo Ribeiro Macêdo (in memoriam) e ao Pesquisador Dr.

Aybiré Francisco A. Fonseca, da EMCAPER, que não mediram esforços na coleta dos isolados e formação das mudas utilizadas neste trabalho.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), pelo apoio na finalização deste curso.

À colega Terezinha Aparecida Cabral, pela ajuda na realização dos ensaios.

Ao auxiliar de laboratório José Carlos Batista, que nunca mediu esforços em colaborar com a condução dos experimentos.

Aos estagiários Delmo, Felipe, Maria Eunice e Otávio, que colaboraram na realização deste trabalho.

Aos meus amigos muito especiais, Maria Amélia Gava Ferrão e Aybiré Francisco de Almeida Fonseca, pela amizade e pelo incentivo.

Aos meus amigos Silvaldo Felipe da Silveira e Luciana Aparecida Rodrigues, que me acolheram e me amaram como irmãos, nos momentos mais difíceis.

Aos colegas de curso, pela convivência e amizade: César Bauer Gomes, Cláudia Vanetti, Claudine Dinari, Edson Mizobutisi, Hélcio Costa, Jorge Brittes Sanches, José Clério Rezende, José Mauro da Cunha Castro, Luiz Arthur Costa do Vale, Maria Célia Brites, Maria Eunice Assis Castro, Ramón Acunã, Ricardo Trezzi Casa, Valéria Dellaretti Guimarães e Wilson da Silva Moraes.

Às amigas Cláudia Regina Dias, Adelica Aparecida Xavier, Regina Cássia Ribeiro e Alessandra J. Boari, grandes companheiras.

Aos meus amigos, Willam Lima de Carvalho e sua esposa Elizabeth, Mpanzo Domingos, Simone Koprowski Garcia, Mara Rodrigues, Jailson Oliveira Arieira e Helder Gomes de Oliveira, pelos momentos agradáveis.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Cecília Maria Arruda Soares, Délio Duarte, Lúcia Regina Apolinário, Jorge Carlos de Aquino, Braz Marins Paes, Antônio Joaquim Macabeu e Geraldo Nério Xavier.

Às minhas colegas de república Neusa Passos Matos, Célia Maria Cleto de Lima, Eliane Aparecida Gomes e Roberta Miranda Fernandes, pela amizade e pelo convívio.

Ao amigo Lúcio Gonçalves Coimbra, pela editoração da tese, pela agradável convivência e pela amizade.

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

BIOGRAFIA

Dalza Gomes da Silva, filha de José Gomes da Silva e Derli Tobias da Silva, nasceu em Alegre, Espírito Santo, no dia 1º de dezembro de 1960.

Em janeiro de 1979 ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo (Alegre - ES), graduando-se em Engenharia Agrônômica, em janeiro de 1983.

Em março de 1984 iniciou o curso de Mestrado em Fitossanidade, na Universidade Federal de Lavras (Lavras - MG), concluindo-o em julho de 1988.

No período de 22 de agosto de 1988 a 24 de agosto de 1990 exerceu atividade docente, como professora titular de Biologia Geral e professora assistente em Elementos de Geologia, na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Alegre (ES).

No período de setembro de 1992 a abril de 1993 exerceu o cargo de Engenheira Agrônoma na Cooperativa de Laticínios Selita Ltda, em Cachoeiro de Itapemirim.

Em março de 1994 iniciou o curso de Doutorado na Universidade Federal de Viçosa.

No período de fevereiro a dezembro de 1998 lecionou a disciplina Fitopatologia, como professora contratada, na Fundação Percival Farquhar/Universidade Vale do Rio Doce, em Governador Valadares (MG).

Atualmente é Engenheira-Agrônoma/Assistente Técnico do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), atuando na área de defesa sanitária vegetal.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Identificação de raças fisiológicas de <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br. em culturas obtidas em <i>Coffea canephora</i> e <i>Coffea arabica</i>	20
3.1.1. Obtenção e mutiplicação das culturas de <i>H. vastatrix</i>	20
3.1.2. Técnica de inoculação e preservação do inóculo	21
3.1.3. Identificação de raças fisiológicas de <i>H. vastatrix</i>	21
3.1.4. Avaliação das reações nos clones diferenciadores	23
3.2. Avaliação da resistência de clones de <i>Coffea canephora</i> var. Conillon à <i>Hemileia vastatrix</i>	24
3.2.1. Obtenção e condução das mudas	24
3.2.2. Avaliação das reações de clones de <i>C. canephora</i> var. Conillon a <i>H. vastatrix</i>	25

	Página
3.3. Estudo da variabilidade genética de clones de <i>Coffea canephora</i> var. Conillon por meio de marcadores RAPD	26
3.3.1. Extração do DNA dos clones de <i>C. canephora</i> var. Conillon	27
3.3.2. Processo de obtenção de marcadores RAPD	28
3.3.3. Análise estatística dos dados	30
3.3.3.1. Avaliação da resistência dos clones de <i>C. canephora</i> var. Conillon	30
3.3.3.2. Avaliação da variabilidade genética de clones de <i>C. canephora</i> var. Conillon	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Identificação de raças fisiológicas de <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br. em alguns municípios dos estados do Espírito Santo e Minas Gerais	32
4.2. Avaliação da resistência dos clones de <i>C. canephora</i> var. Conillon à <i>H. vastatrix</i> , por meio de inoculações artificiais	36
4.3. Diversidade genética de clones de <i>Coffea canephora</i> var. Conillon, analisada por meio de marcadores RAPD	47
5. RESUMO E CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE	63

EXTRATO

SILVA, Dalza Gomes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2000.
Levantamento de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* e resistência de clones de *Coffea canephora* var. Conillon à ferrugem. Orientador: Laércio Zambolim. Conselheiros: Francisco Xavier Ribeiro do Vale e Antonio Alves Pereira.

Esta pesquisa foi conduzida no período de março de 1995 a agosto de 1999, em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Tecidos/BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em três ensaios experimentais, cujos objetivos foram: detectar a ocorrência e a frequência de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* em *Coffea canephora* var. Conillon e *Coffea arabica*, de culturas procedentes do estado do Espírito Santo e Minas Gerais; avaliar a resistência de clones de *C. canephora* var. Conillon à ferrugem, componentes de três variedades clonais recomendados para o estado do Espírito Santo; e verificar a variabilidade genética desses clones, empregando marcadores RAPD. No primeiro ensaio foram utilizadas 139 culturas de *H. vastatrix* e inoculadas no conjunto de clones diferenciadores desenvolvidos no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro, em Portugal, observando-se os tipos de reações apresentados pelas plantas diferenciadoras. No segundo ensaio avaliou-se a resistência de 33 clones da var. Conillon, em quatro repetições, sendo nove com ciclo de maturação precoce da variedade EMCAPA-8111 (02, 03, 26, 29, 36, 104-A, 104-B, 110-B e

154); 13 com ciclo de maturação médio da variedade EMCAPA-8121 (07, 11, 14, 16, 19, 109-A, 110-A, 112, 120, 128, 132, 149 e 201); e 11 com ciclo de maturação tardio da variedade EMCAPA-8131 (31, 45, 46, 49, 99, 100, 106, 116, 139, 143 e 153), às raças I, II, III e XIII de *H. vastatrix*. Empregou-se uma escala de notas de 1 a 6, sendo que os valores de 1 a 3 corresponderam a reações de resistência e de 4 a 6, reações de suscetibilidade. No terceiro ensaio avaliou-se a variabilidade genética por meio de marcadores RAPD, de 12 clones (02, 139, 03, 07, 11, 14, 100, 104-A, 104-B, 110-A, 153 e 201), que apresentaram instabilidade de reação quando inoculados com as quatro raças de *H. vastatrix*, e de cinco clones (36, 45, 46, 109-A, 110-B), que apresentaram reação uniforme quando inoculados com as quatro raças do patógeno. Os resultados mostraram que a raça II prevaleceu em 137 culturas, sendo que, em duas culturas procedentes dos municípios de Coimbra e Viçosa, no estado de Minas Gerais, em 1995, obtidas de *C. arabica* constatou-se a raça III. As três variedades clonais são constituídas por clones resistentes e suscetíveis às quatro raças de *H. vastatrix*, sendo que os clones 132, 149, 201 (ciclo intermediário), 100 e 143 (ciclo tardio) mostraram reação de resistência às quatro raças do patógeno, enquanto que os clones 110-B (ciclo precoce), 110-A, 112 (ciclo intermediário), 31, 45, 106 e 116 (ciclo tardio) mostraram reação de suscetibilidade. Os 17 clones avaliados por meio de RAPD formaram grupos distintos, não observando-se polimorfismo intraclones, com exceção do indivíduo 21, correspondente à repetição I do clone 104-A, o qual formou isoladamente o grupo 16, mostrando-se divergente dos demais. Os clones 104-A e 104-B formaram um único grupo, assim como os clones 110-A e 110-B.

ABSTRACT

SILVA, DALZA Gomes, O.S. Universidade Federal de Viçosa, December 2000.
Rising of physiologic races of *Hemileia vastatrix* and resistance of clones of *Coffea canephora* var. Conillon to the rust. Adviser: Laércio Zambolim.
Committee Members: Francisco Xavier Ribeiro do Vale and Antônio Alves Pereira.

This research was conducted from March 1995 to August 1999 in the greenhouse at the Department of Phytopathology and in the laboratory at the Molecular Biology and Tissue Culture/BIOAGRO of the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Three experimental assays were carried out to detect the occurrence and frequency of the physiological races of *Hemileia vastatrix* in *Coffea canephora* var. Conillon and *Coffea arabica* of cultures originated from the states of Espírito Santo and Minas Gerais; to assess the resistance to rust of *C. canephora* var. Conillon, components of three clonal varieties recommended for the state of Espírito Santo; and to verify the genetic variability of these clones using RAPD markers. For the first assay, 139 *H. vastatrix* cultures were used and inoculated in the set of differentiating clones developed at the “Center of Research on Coffee Rust” in Portugal, observing the reaction types presented by the differentiating plants. For the second assay, the resistance of 33 Conillon variety clones races to the races I, II, III and XIII of *H. vastatrix* was evaluated, in four repetitions, with nine being of the variety EMCAPA – 8111 (02, 03, 26, 29, 36, 104-A, 104-B, 110-B and 154) with early ripening cycle; 13 of the variety

EMCAPA – 8121 (07, 11, 14, 16, 19, 109-A, 110-A, 112, 120, 128, 132, 149 and 201) with intermediary ripening cycle, and 11 of the variety EMCAPA – 8131 (31, 45, 46, 49, 99, 100, 106, 116, 139, 143, and 153) with late ripening cycle. A grade scale of 1 to 6 was used, with the values from 1 to 3 corresponding to resistance reactions and values from 4 to 6 to susceptibility reactions. In the third assay, genetic variability was evaluated by means of RAPD markers of 12 clones (02, 139, 03, 07, 11, 14, 100, 104-A, 104-B, 110-A, 153 and 201), which presented reaction instability when inoculated by the four *H. vastatrix* races and of 5 clones (36, 45, 46, 109-A, 110-B), which presented uniform reaction when inoculated by the 4 pathogen races. The results showed that race II predominated in 137 cultures with race III being found in two cultures from Coimbra and Viçosa, MG obtained from *C. arabica* in 1995. The three clonal varieties consisted of clones resistant and susceptible to the 4 *H. vastatrix* races, with clones 132, 149, 201 (intermediary cycle), 100 and 143 (late cycle) showed resistance to the 4 pathogen races, while clones 110-B (early cycle), 110-A, 112 (intermediary cycle), 31, 45, 106 and 116 (late cycle) showed susceptibility. The 17 clones assessed by means of the RAPD formed distinct groups, without intraclonal polymorphism being observed, except for individual 21, corresponding to repetition 1 of clone 104-A, which was formed isolatedly (group 16), diverging from the rest. The clones 104-A and 104-B formed a single group, as well as the clones 110-A and 110-B.

1. INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade agrícola de grande importância econômica para o desenvolvimento do Brasil, que desde o final do século XIX ocupa a posição de maior produtor e exportador de café do mundo.

As duas espécies de cafeeiros exploradas comercialmente são *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café robusta) representando, respectivamente, 70 e 30% da produção mundial de café (MATIELLO, 1998).

O cultivo de cafeeiros diplóides ($2n = 22$ cromossomos), especialmente a espécie *Coffea canephora*, iniciou-se a partir de 1870, ocasião em que as plantações de *Coffea arabica*, ao sul da Ásia, foram seriamente afetadas pela epidemia de ferrugem causada por *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Como resultado das introduções de espécies diplóides, surgiram os híbridos interespecíficos resultantes de cruzamentos naturais e artificiais com *C. arabica*, utilizados para o cultivo ou em programas de melhoramento, visando, além de outras características, a resistência às doenças, especialmente à ferrugem alaranjada (BETTENCOURT e RODRIGUES JR., 1988).

A produção mundial de café robusta apresentou aumento significativo na década de 50, após o surgimento do café solúvel (MALTA, 1986) e, atualmente, a produção média é de 27 milhões de sacas/ano, representando 30% da produção. Deste total, 67% é produzido na Indonésia, Brasil, Vietnã e Costa do Marfim. No

Brasil, 70% da produção de café robusta concentra-se no estado do Espírito Santo e o percentual restante está distribuído nos estados de Rondônia, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Rio de Janeiro e outros (MATIELLO, 1998).

A alogamia e a auto-esterelidade de *C. canephora* são características responsáveis pela alta variabilidade genética, encontrada entre indivíduos, contribuindo para a formação de lavouras heterogêneas em relação a características agrônomicas e à resistência a patógenos (BRAGANÇA et al., 1993).

Além da existência de variabilidade em *C. canephora*, outro aspecto a ser considerado em programas de melhoramento para obtenção de variedades resistentes é a variabilidade do patógeno. Entretanto, são escassas as informações a respeito da prevalência de raças fisiológicas no patossistema *H. vastatrix* × *C. canephora* nos principais municípios capixabas produtores de café.

A ferrugem causada por *H. vastatrix* é uma das principais doenças do cafeeiro, podendo ocasionar perdas na produção estimadas em 30% nas variedades de *C. arabica*, principalmente em anos de alta carga de frutos (ZAMBOLIM et al., 1997). No entanto, para as variedades de *C. canephora*, as perdas ainda não foram estimadas, porém, considerando que nas variedades de café robusta ocorre maior retenção de folhas doentes, a manutenção do inóculo por um maior período de tempo pode aumentar a severidade da doença com perdas consideráveis na produção.

Os sintomas da ferrugem podem ser observados na face inferior das folhas, onde aparecem manchas de coloração amarelo-pálida, inicialmente pequenas, com 1 a 3 mm de diâmetro, que evoluem atingindo até 2 cm de diâmetro, quando então apresentam aspecto pulverulento, correspondendo aos uredíniosporos do fungo, de coloração amarelo-alaranjada característica da doença. Na face superior das folhas, correspondendo aos limites da pústula na face inferior, as manchas são cloróticas amareladas que, posteriormente, tornam-se necrosadas (ZAMBOLIM et al., 1997).

Considerando a falta de informações a respeito de prevalência de raças de *H. vastatrix* no estado do Espírito Santo e da resistência dos clones das variedades clonais ao patógeno, este trabalho teve como objetivos:

1. Detectar a ocorrência e prevalência de raças fisiológicas de *H. vastatrix* nos principais municípios produtores do estado do Espírito Santo e em alguns municípios do Estado de Minas Gerais;
2. Determinar a resistência à ferrugem, de clones componentes de três variedades clonais de *C. canephora*, recomendadas para o estado do Espírito Santo.
3. Verificar a existência de variabilidade genética intraclones de *C. canephora* var. Conilon, por meio de marcadores RAPD.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A ferrugem alaranjada, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. e Br., é uma das doenças mais importantes deste século para a cultura do café, pois em todas as regiões onde se estabeleceu, causou perdas significativas na produção de cafeeiros.

O fungo pertence ao filo Basidiomycota, classe Teliomycetes, ordem Uredinales e família Pucciniaceae. O gênero foi descrito em 1869 por Berkeley e Broom, baseando-se na característica típica dos uredíniosporos, os quais apresentam a parede lisa do lado interno ao soro e verrugosa do lado externo. Duas espécies causam danos de importância econômica ao cafeeiro, a *Hemileia vastatrix* Berk. e Br. (1869), agente causal da ferrugem alaranjada ou ferrugem da folha do cafeeiro, de ocorrência generalizada nas regiões produtoras de café, e a *Hemileia coffeicola* Maubl. e Rog. (1934), agente da ferrugem amarela, cinza ou pulverulenta (RODRIGUES JR., 1990), ainda não relatada no Brasil.

Os principais danos causados pela ferrugem alaranjada são a desfolha precoce e morte de ramos produtivos e, conseqüentemente, a redução da produtividade dos cafeeiros, observada nos anos subseqüentes às incidências elevadas da doença. As intensas e freqüentes desfolhas dos cafeeiros provocam secas de ramos ponteiros e laterais que, sem dúvida, reduzem a vida útil produtiva da lavoura (ZAMBOLIM et al., 1997).

Os sintomas da ferrugem do cafeeiro podem ser observados na face inferior das folhas, onde ocorrem manchas ou pústulas alaranjadas ou vermelho alaranjadas de soros urediniospóricos, mais ou menos redondas, com diâmetro de 1 cm ou mais. A formação de pústulas é uma característica distintiva para esta ferrugem, quando comparada com *H. coffeicola* que não as produz. A parte superior das folhas infectadas torna-se clorótica sobre a área das pústulas, tornando-se necróticas com o tempo. Esporadicamente, observam-se os sintomas em frutos e extremidades de ramos das brotações novas (RODRIGUES JR., 1990).

Durante o ciclo de vida de *H. vastatrix*, são produzidos três tipos de esporos: urediniosporos, teliosporos e basidiosporos. Os urediniosporos são unicelulares e formados nas extremidades de pedicelos que atravessam o estômato, formando aglomerados de vários esporos, que ficam comprimidos uns contra os outros, adquirindo forma variável, geralmente de seção triangular. São produzidos em grande quantidade e constituem a fase assexuada ou repetitiva da ferrugem (RODRIGUES JR., 1990).

Os teliosporos, menos comum, ocorrem em condições de campo, no final do inverno, no mês de agosto, num período seco e frio, como constatado por COUTINHO et al. (1995). São formados entre os urediniosporos ou em soros separados, porém sempre após a formação dos urediniosporos. Os teliosporos são pedicelados de parede lisa, esféricos ou napiformes, com uma papila no ápice que, ao germinarem *in situ*, produzem um promicélio de quatro células, cada uma delas originando um terceiro tipo de esporo, denominado basidiosporo.

RODRIGUES JR. et al. (1980) verificaram que urediniosporos, morfológicamente indistinguíveis dos que germinam normalmente, podem apresentar uma germinação anormal, caracterizada pela emissão de um único tubo germinativo, idêntico ao promicélio da germinação dos teliosporos, podendo ou não formar esterigmas. Os autores observaram que esse tipo de urediniosporo ocorre especialmente no outono e inverno, adquirindo comportamento semelhante ao dos teliosporos (teliosporos uredinóides).

Até o momento, não se conhece um hospedeiro intermediário que seja infectado pelos basidiósporos, os quais também não infectam plantas de café. Segundo RODRIGUES JR. (1990), nenhum pesquisador obteve sucesso na determinação da função deste tipo de esporo, no ciclo de vida desta ferrugem, em virtude das dificuldades encontradas no seu isolamento. Embora seja fácil a obtenção do promicélio, nem sempre se consegue basidiosporos separados dos respectivos esterigmas ou em quantidade suficiente para permitir manipulação.

Segundo RODRIGUES JR. (1990), a ferrugem alaranjada do cafeeiro é autoécia, uma vez que se originou e co-evoluiu na África Tropical (Etiópia) com seu hospedeiro, não adquirindo heteroecismo como um modo de sobrevivência e adaptação. Entretanto, existe a possibilidade de ser uma ferrugem de ciclo longo com aécio que se assemelha a urédias e sem espermogônias identificáveis.

A disseminação do patógeno é realizada por meio de ventos, chuvas, insetos, animais e mudas contaminadas. Dentro de uma planta, a chuva exerce o papel mais importante, tanto pelo respingo das gotas, de uma folha para outra, como pelo escorrimento das gotas da face superior a inferior das folhas, arrastando o inóculo (DOENÇAS..., 1981).

O controle da ferrugem com fungicidas protetores ou sistêmicos é eficiente a curto ou médio prazo, porém a utilização de variedades resistentes constitui o método mais econômico a longo prazo, sem causar prejuízos ao meio ambiente (PEREIRA, 1995).

A obtenção de variedades de cafeeiros com resistência durável à ferrugem tem sido dificultada pela grande variabilidade genética de *H. vastatrix*, característica muito comum à maioria de patógenos biotróficos, especialmente os causadores de ferrugens. Portanto, faz-se necessário o conhecimento prévio das raças fisiológicas predominantes na região onde se desenvolvem os programas de melhoramento, e onde se pretende introduzir determinado tipo de resistência.

A ocorrência de especialização fisiológica de *H. vastatrix* foi constatada pela primeira vez por MAYNE (1932), na Índia, ao observar que uma cultura era virulenta à variedade Coorg, mas não a Kent's, enquanto que outra atacava indistintamente as duas variedades, admitindo, assim, a existência de dois genes

responsáveis pela resistência nas seleções locais de café arábica. Posteriormente, utilizando quatro diferenciadores (Coorg, Kent's, S 288.19 e S 353.7), MAYNE identificou quatro raças fisiológicas do patógeno, designadas de 1, 2, 3 e 4. A demonstração da existência da relação entre genes de ataque e de defesa, respectivamente, no patógeno e no hospedeiro, foi realizada por FLOR (1942 e 1955) no patossistema linho \times *Melampsora linii* e demonstrada em cafeeiro \times *H. vastatrix* por NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT (1967), permitindo inferir os genótipos das raças de *H. vastatrix*. Posteriormente, D'OLIVEIRA (1954, 1957), REYS (1957), D'OLIVEIRA e RODRIGUES JR. (1961), RODRIGUES JR. et al. (1975) e LOPES e GODINHO (1976) identificaram 30 raças de *H. vastatrix* de amostras coletadas em regiões cafeeiras de vários países, utilizando um conjunto de clones diferenciadores, composto por cinco seleções de *C. arabica*, seis híbridos tetraplóides de *C. arabica \times *Coffea* spp. e seis seleções de *Coffea* spp. (RODRIGUES JR. et al., 1975). Os autores verificaram que as raças identificadas por MAYNE (1932) como 1, 2 e 4 correspondem, respectivamente, às raças II, I e VIII, identificadas no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), porém a raça 3, correspondente à IX, não foi estabelecida (RODRIGUES JR. et al., 1975).*

Atualmente, o modelo utilizado para explicar a teoria gene-a-gene de Flor assume a existência de uma interação do tipo receptor-elicitor, em que o gene de resistência do hospedeiro é responsável pela síntese de uma proteína receptora que reage especificamente com uma molécula elicitora produzida pelo gene *avr* no patógeno (PARLEVLIET, 1997). Portanto, a presença de um único gene de avirulência no genótipo de uma raça, correspondente ao gene de resistência no hospedeiro, é suficiente para que ocorra o reconhecimento e, conseqüentemente, o fenótipo de resistência.

São conhecidas 32 raças fisiológicas de *H. vastatrix*, com predominância das raças II (58,2%), raça I (14,4%), raça III (8,9%) e raça XV (3,6%) (BETTENCOURT e RODRIGUES JR., 1988). A predominância da raça II, com genótipo de virulência v_5 , é atribuída à homogeneidade genética apresentada

pelas variedades comerciais de arábica, que possuem o gene de resistência S_H5 , com sua ampla distribuição e suscetibilidade a esta raça.

A raça II foi a primeira a ser caracterizada no Brasil após a constatação da ferrugem, e rapidamente foi disseminada para os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. A prevalência dessa raça em todas as amostras coletadas nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais foi constatada por CHIACHIO (1973).

Em mistura de inóculo coletado sobre cafeeiro Conillon no Estado do Espírito Santo, foram identificadas no CIFC, em 1972, as raças II (v_5) e XV (v_4 , v_5) (CHAVES e PEREIRA, 1980).

Em São Paulo, RIBEIRO et al. (1975) identificaram as raças II, III e XV e ESKES (1983), as raças XVII, X, I XXIII e XXIV. Anteriormente, ESKES et al. (1980) verificaram a ocorrência de três novas raças isoladas de ‘Conillon’ (isolados 10, 11 e 12), capazes de anularem os genes de resistência de *C. canephora* a *H. vastatrix*. O isolado 11 superou a resistência de plantas moderadamente resistentes, enquanto que os isolados 10 e 12 mostraram-se altamente virulentos relacionadas a duas outras plantas, quase imunes em relação à raça II.

Em Minas Gerais, FONSECA (1979) identificou as raças I e III em amostras de cafeeiros Geisha e KP 432, provenientes de Caratinga e CHAVES e PEREIRA (1980) identificaram as raças XXIV e XXIII, provenientes da cultivar Bourbon Vermelho do município de Ponte Nova. CARDOSO (1986) identificou 11 raças fisiológicas do patógeno (I, II, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXIII e XXIV, XXV ou XXXI) em culturas coletadas em ensaios de progênies de Catimor de alguns municípios de Minas Gerais, e de culturas procedentes de Campinas (SP), sendo o primeiro relato da ocorrência da raça XVI no Brasil. Portanto, até o momento, foram detectadas no Brasil 12 raças fisiológicas de *H. vastatrix*: I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXIII e XXIV, XXV ou XXXI (CARDOSO, 1986 e CARDOSO et al., 1988).

A importância da raça XVI reside no fato de que ela possui uma composição genética, $v_1v_2v_3v_4v_5$, que compromete todas as combinações entre os

genes de resistência do hospedeiro de S_H1 a S_H5 , isolados ou em combinações. Por outro lado, a raça XXV, com genótipo de virulência $v_{2,5,6}$ anula o gene de resistência S_H6 , de *Coffea canephora* (ESKES, 1989).

Existem poucos relatos de ocorrência de raças fisiológicas de *H. vastatrix* em *C. canephora*. HOLGUIN et al. (1993) estudaram o comportamento de vários isolados do patógeno, procedentes da África e Indonésia, coletados em *C. canephora*, em Camarões, Costa do Marfim e Guiné; no Congusta e Kouillon, de Madagascar; e Catimor, da Indonésia. Alguns clones de *C. canephora* da Costa do Marfim, Caturra Amarelo e Matari apresentaram reação de suscetibilidade aos isolados africanos, enquanto que genótipos de Congusta e Catimor foram resistentes. Os isolados de Madagascar provocaram reação de suscetibilidade a alguns clones de *C. canephora*, mas foram avirulentos a Caturra Amarelo. Porém, os isolados da Indonésia mostraram um amplo espectro de virulência, atacando Caturra Amarelo, Matari, vários genótipos de Catimor, *C. canephora* e em alguns genótipos descendentes do Híbrido de Timor 832/1. Observou-se que isolados coletados em *C. canephora*, na África, foram menos agressivos e causaram reações variáveis, mais do que os isolados em Catimor na Indonésia, quando foram inoculados em Caturra Amarelo e Matari. Os isolamentos adaptados a *C. canephora* e seus derivados mostraram uma maior agressividade que parece estar correlacionada com o acúmulo de genes de virulência, que é oposto ao fenômeno observado em *C. arabica*.

De acordo com ESKES (1989), as raças fisiológicas de *H. vastatrix* podem ser agrupadas de acordo com a virulência aos diferentes grupos de plantas diferenciadoras, principalmente aquelas de *C. arabica*, de populações híbridas (*C. arabica* × *Coffea* sp.) e espécies diplóides. No primeiro grupo as 14 raças variam em virulência aos seis diferenciadores de *C. arabica*: 849/1(Matari), 63/1 (Bourbon), 128/2 (Dille e Alghe), 32/1 (DH 1/6), 33/1 (S 288-23) e 635/2 (S 12 Kaffa). O diferenciador Matari não possui gene de resistência conhecido, enquanto os outros cinco possuem os genes S_H1 , S_H2S_H5 , S_H3S_H5 , S_H4 e S_H5 , respectivamente. A raça II apresenta o gene v_5 e as demais apresentam esse gene em combinação com um ou mais dos genes v_1 , v_2 , v_3 e v_4 . No segundo grupo as

raças variam em virulência aos híbridos interespecíficos diferenciadores. A raça XIII é a única com virulência ao Híbrido Kawisari (CIFC 644/18) do grupo fisiológico M, resultante do cruzamento de *C. liberica* × *C. arabica*. A raça XXIX ($v_5, 6,7,8,9$) é a que apresenta maior espectro de virulência. Ainda não foi detectada nenhuma raça capaz de superar a resistência do diferenciador CIFC 832/1 (Híbrido de Timor). O terceiro grupo de raças mostra variações de virulência aos diferenciadores de *C. congensis* e *C. canephora*. Seis raças são virulentas ao diferenciador CIFC 263/1 (*C. congensis*) e nenhuma possui o gene de virulência v_5 , mostrando reações de suscetibilidade moderada ou resistência moderada aos diferenciadores compatíveis de *C. arabica*.

Finalmente, no quarto grupo, ESKEs (1989) inclui as raças VI e XVIII virulentas somente aos clones CIFC 269/3 - *C. racemosa* e CIFC 168/2 - *C. excelsa*, respectivamente. Portanto, avirulentas a *C. arabica* e a segregantes tetraplóides dos híbridos resultantes do cruzamento de *C. arabica* com outras espécies de *Coffea*.

De acordo com o espectro de reação a 30 raças fisiológicas de *H. vastatrix* inoculadas, o germoplasma de cafeeiro (elevado número de introduções de diversas regiões do mundo, abrangendo cerca de 20 espécies do gênero *Coffea*) foi classificado no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) em 40 grupos fisiológicos, denominados por letras do alfabeto grego e romano e por números (BETTENCOURT, 1981).

Dentre os 40 grupos fisiológicos caracterizados, 16 grupos (O, S, T, U, V, X, Y, Z, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) foram sintetizados no CIFC por hibridação de clones portadores de diferentes combinações dos genes S_{H1} a S_{H6} . Em cafeeiros de *C. arabica* originários da Etiópia e em plantas da população derivada do cafeeiro Kent's, foram definidos 10 grupos ($\beta, \alpha, \gamma, E, I, C, D, J, L, W$). Nos híbridos interespecíficos *C. arabica* × *C. canephora* e *C. arabica* × *C. liberica* caracterizaram-se cinco grupos (A, 1, 2, 3 e 4 ou R) em cafeeiros de Híbrido de Timor ou de seus derivados, 2 (G e H) das seleções da Estação Experimental de Balehonnur, na Índia, e 1 (M) de Híbrido Kawisari. Nas espécies diplóides *C.*

canephora, *C. congensis*, *C. excelsa* e *C. racemosa* definiram-se seis grupos: F, N, B, K, P e Q (BETTENCOURT, 1981).

Segundo BETTENCOURT (1981), entre os grupos fisiológicos 1, 2, 3 e 4 ou R de cafeeiros de Híbrido de Timor e seus derivados que segregaram para suscetibilidade a *H. vastatrix*, o grupo 1 apresenta reação de suscetibilidade somente à raça XXIX (v_{5,6} ?), enquanto o grupo 4 ou R é suscetível às raças XXII (v_{5,6}), XXV(v_{2,5,6}), XXVI(v_{4,5,6}), XXVIII(v_{2,4,5,6}), XXIX(v_{5,6,?}) e XXXI(v_{2,5,6,?}); e moderadamente suscetível às raças XXVII (v_{1,4,6,?}) e XXXII (v_{6,?}). O grupo 2 mostra-se suscetível à raça XXX(v_{5,?}) e moderadamente suscetível à raça XXIX(v_{5,6,?}), enquanto o grupo 3 é suscetível às raças XXIX(v_{5,6,?}) e XXXI(v_{2,5,6,?}).

Ao grupo A, caracterizado por apresentar resistência a todas as raças conhecidas de *H. vastatrix*, pertencem os híbridos derivados do cruzamento entre *C. arabica* × *C. canephora*, como o Híbrido de Timor e o Icatú, e em algumas espécies diplóides tais como *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. eugenioides*, *C. congensis* e *C. zamguebariae*. Por outro lado, os grupos E, F, N e β pertencem todas as plantas suscetíveis a todas as raças conhecidas do patógeno. Ao grupo E pertencem todos os cafeeiros cultivados na América Latina e a maior parte das plantas dessa espécie das outras regiões cafeeiras (BETTENCOURT e RODRIGUES JR., 1988).

A disponibilidade de fontes de resistência a doenças é uma das principais preocupações do melhoramento genético, visando esta característica. A procura por fontes de resistência a *H. vastatrix* em cafeeiros arábica iniciou-se logo após a epidemia da ferrugem do cafeeiro no Ceilão. Verificou-se que dentro da espécie *C. arabica*, a maioria das plantas eram geneticamente semelhantes e suscetíveis ao patógeno, provavelmente pela autofertilidade dessa espécie e ausência do patógeno no Yemen, o centro de dispersão de *C. arabica*, onde a seleção natural foi conduzida para características de qualidade, produtividade e resistência à seca (RODRIGUES JR. et al., 1975). Por esta razão, diversas introduções da espécie arábica e de espécies diplóides foram realizadas em todas as regiões produtoras com o objetivo de se encontrar resistência ao patógeno.

A primeira planta de *C. arabica* com resistência a *H. vastatrix* foi descoberta na Índia, em 1911, nas plantações de Sr. Kent. As sementes desta planta originou a cultivar Kent, amplamente cultivada em vários países. Em 1928, Cramer selecionou na Abyssinia algumas árvores que foram introduzidas em Java, com bom desempenho em regiões de baixa altitude, com crescimento vigoroso e alta resistência à ferrugem. No Quênia foram introduzidos cafeeiros etíopes, graças à ação dos Oficiais das Forças do Exército do Leste da África, originando as coleções Harar, Geisha, Amphillo, Dalle Mixed, Dilla, Dilla e Alghe, Gimma Mbuni e Gimma Galla Sidamo (BETTENCOURT e RODRIGUES JR., 1988).

Nas décadas de 60 e 50 a FAO organizou missões à Etiópia com a finalidade de organizar coleções de cafeeiros arábicos resistentes à ferrugem, enquanto que expedições patrocinadas pelo Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) à Etiópia, em 1966 e ao Quênia, em 1977, organizaram coleções de germoplasmas de cafeeiros, sem, contudo, dar prioridade a genótipos resistentes à ferrugem, obtendo materiais de grande valor no melhoramento dessa espécie (BETTENCOURT e RODRIGUES JR., 1988).

Dentre as espécies diplóides introduzidas da África, a espécie *C. canephora* se destacou pela resistência à ferrugem, maior vigor e produtividade em comparação à *C. arabica*. Do cruzamento natural ou artificial das espécies diplóides com *C. arabica*, surgiram os híbridos interespecíficos, porém improdutivos, apresentando muitos frutos anormais. No entanto, foram muito úteis como fonte de resistência no melhoramento do cafeeiro, principalmente o Híbrido de Timor, resultante do cruzamento natural entre *C. arabica* × *C. canephora*. As características deste híbrido, tais como, maior produção em relação a outros híbridos, fenótipo semelhante ao arábica, autofertilidade, número de cromossomos ($2n = 44$), qualidade de bebida regular e menor porcentagem de cafeína comparado ao arábica e robusta, foram importantes na sua escolha como fonte de resistência à ferrugem em programas de melhoramento genético (RODRIGUES JR. et al., 1975).

Conforme discutido por CHAVES (1976), o Híbrido de Timor é constituído por uma população de plantas das quais 90% pertencem ao grupo fisiológico A, resistente a todas as raças do patógeno conhecidas, além de plantas dos grupos R e E, este último suscetível à maioria das raças conhecidas, inclusive as raças I e II. Segundo BETTENCOURT e CARVALHO (1968) e CARVALHO e MÔNACO (1971), os genes provenientes da espécie arábica foram rapidamente suplantados com o surgimento de raças compatíveis do patógeno. Das 12 raças de *H. vastatrix* constatadas no Brasil, a grande maioria possui genótipo de virulência v_1 , v_2 , v_4 e v_5 isolados ou combinados, que anulam os genes de resistência, respectivos S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} , oriundos dos arábicas da Etiópia. Por outro lado, os genes de resistência identificados em *C. canephora*, (S_{H6} a S_{H9}) e *C. liberica* (S_{H3}) têm proporcionado resistência com durabilidade apreciável em várias regiões cafeeiras onde têm sido testados.

Os trabalhos pioneiros de MAYNE (1932, 1936, 1939) constituíram os fundamentos do melhoramento genético do cafeeiro, visando resistência à ferrugem. Posteriormente, vários autores (NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT e CARVALHO, 1968 e BETTENCOURT e NORONHA-WAGNER, 1971) estudaram a base genética da interação *Coffea* × *Hemileia vastatrix* e verificaram que se ajustava ao modelo gene-a-gene de FLOR (1942 e 1955). Dessa forma foi possível inferir o genótipo dos clones diferenciadores e das raças que os atacam.

NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT (1967) identificaram quatro genes simples e dominantes, denominados S_{H1} , S_{H2} , S_{H3} e S_{H4} , condicionando resistência à ferrugem nas diferentes espécies de *Coffea*. Posteriormente, BETTENCOURT e CARVALHO (1968), BETTENCOURT e NORONHA-WAGNER (1971), BETTENCOURT et al. (1980), BETTENCOURT e LOPES (1982) e BETTENCOURT (1983) identificaram os genes S_{H5} , S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} . Segundo BETTENCOURT (1981 e 1983), os genes S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} estão presentes em *C. arabica*, o gene S_{H3} em *C. liberica* e os S_{H5} , S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} estão presentes no Híbrido de Timor, seus derivados e outros descendentes de *C. canephora*. Portanto, são conhecidos nove genes que

conferem resistência ao hospedeiro (S_{H1} a S_{H9}) e os alelos recessivos de avirulência correspondente no patógeno v_1 a v_9 .

PEREIRA (1995), analisando a herança da resistência à ferrugem nas populações de três combinações resultantes do cruzamento de Catuaí com seleções de Híbrido de Timor e quatro de Mundo Novo com Híbrido de Timor, verificou que em seis das sete combinações estudadas, a resistência foi condicionada por três genes dominantes de segregação independente, portanto, com uma taxa de segregação, na geração F_2 de 63 cafeeiros resistentes para um suscetível. Apenas em uma população a resistência foi conferida por um único gene dominante, numa segregação na geração F_2 , de três cafeeiros resistentes para um suscetível.

ESKES (1989) sugere que genes maiores e menores de dominância incompleta estão presentes nos derivados de Híbrido de Timor, cuja relação com os genes S_{H6} a S_{H9} é desconhecida.

Nenhuma análise tem sido apresentada para a herança da resistência dos diferenciadores das espécies diplóides, os cafeeiros dos grupos N, B, K, P e Q (ESKES, 1989).

Em *C. canephora*, estudos genéticos sobre resistência à ferrugem são limitados, mas indicam uma herança complexa. De acordo com BETTENCOURT e RODRIGUES JR. (1988), de uma maneira geral *C. canephora* é uma espécie resistente a *H. vastatrix*, mas os resultados de inoculações de raças fisiológicas do patógeno indicaram que algumas populações são altamente suscetíveis, outras totalmente resistentes, e ainda aquelas que apresentam um tipo de reação heterogênea, com um ataque moderado do patógeno. ESKES (1983) observou diferenças consideráveis na severidade de doença entre indivíduos de 68 plantas da variedade Conillon. Apenas um indivíduo foi altamente suscetível, enquanto a maioria apresentou reação intermediária e poucos apresentaram níveis elevados de resistência.

Os cruzamentos realizados entre plantas de Conillon com diferentes níveis de resistência indicaram que algumas progênies possuem resistência oligogênica dominante e outras, uma herança poligênica. Os genótipos com

níveis altos ou intermediários de resistência incompleta foram cruzados com *C. arabica* cv. Catuaí. A segregação de plantas na geração F₁, para o tipo de reação, sugeriu a presença de um ou mais genes maiores em um cruzamento e genes menores em outros (BETTENCOURT e RODRIGUES JR., 1988). Estes resultados foram confirmados por LASHERMES et al. (1994) em plantas oriundas de haplóides duplos (DH). Dentro de diferentes famílias de DH, os tipos de reações variaram de alta resistência a alta suscetibilidade, sugerindo resistência poligênica quantitativa e alto nível de heterozigose dos clones parentais envolvidos nos mecanismos de resistência. Os mesmos autores concluíram que somente via haploidia é possível a obtenção de linhas isogênicas, garantindo a análise de características complexas como sistema de incompatibilidade, resistência a ferrugem e conteúdo de cafeína, em uma espécie diplóide e auto-incompatível, como *C. canephora*. Os DH são particularmente apropriados para detectar efeitos aditivos de “loci” de características quantitativas (QTLs), ligados a marcadores moleculares.

O melhoramento genético do cafeeiro arábica no Brasil é realizado no estado de São Paulo, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), e no Paraná, no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), que lançaram os cultivares “Icatú” (*C. canephora* × *C. arabica* cv. Bourbon Vermelho e retrocruzado com Mundo Novo) e “IAPAR 59” (Sarchimor), respectivamente, ambos resistentes à ferrugem (SERA et al., 1984). Em Minas Gerais, a UFV/EPAMIG vem desenvolvendo um programa de melhoramento que teve início em 1970/71, através de introduções de material básico e de variedades resistentes cultivadas em outros países, formando um banco de germoplasma representativo dos principais grupos de reações, porém os trabalhos de melhoramento têm se concentrado em fontes de resistência originárias do grupo fisiológico A (PEREIRA, 1995). A avaliação de genótipos de cafeeiros Catimor (Caturra Vermelho × Híbrido de Timor) e outros genótipos resistentes à ferrugem (PEREIRA, 1995) resultou na variedade Oeiras.

No estado do Espírito Santo, no programa de melhoramento genético de *C. canephora* da Empresa Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão

Rural (EMCAPER) adota-se a técnica de multiplicação por estaquia de plantas matrizes, utilizada por CARVALHO e BRAGANÇA (1990) ao selecionarem plantas da variedade Conillon em lavouras comerciais nos municípios produtores da região norte daquele Estado, objetivando maior uniformidade de maturação, melhor qualidade de grãos e maior produtividade. Os clones obtidos foram submetidos a ensaios de avaliação de suas características durante quatro colheitas e agrupados em três variedades: ‘EMCAPA 8111’, ‘EMCAPA 8121’ e ‘EMCAPA 8131’, com o ciclo de maturação precoce, médio e tardio, respectivamente (BRAGANÇA et al., 1993).

Segundo ANDRADE NETO et al. (1995) e FONSECA (1996), as variedades clonais são mais produtivas, possuem melhor qualidade de grãos, ciclo diferenciado de maturação, permitindo colheita escalonada, maior uniformidade de maturação e maior produtividade. No entanto, esta metodologia pode reduzir a base genética dessa variedade, uma vez que as variedades clonais são constituídas por misturas de 10 a 16 clones.

Atualmente, além do melhoramento por meio de propagação assexuada, os pesquisadores da EMCAPER iniciaram um trabalho de seleção recorrente nas populações experimentais EMCAPA 8112 (maturação precoce - 10 clones), EMCAPA 8122 (maturação intermediária - 16 clones) e EMCAPA 8132 (maturação tardia - 11 clones), objetivando ampliar a base genética e a obtenção de híbridos e variedades sintéticas em café Conillon (FERRÃO, 1999). Segundo LASHERMES et al. (1994), as variedades e híbridos sintéticos têm baixo custo de produção e são mais facilmente distribuídos, comparados às variedades clonais.

A seleção recorrente é um método de melhoramento amplamente utilizado em programas de melhoramento para diferentes espécies alógamas, que consiste na seleção de plantas desejadas, avaliações e recombinações das progênes superiores, para formação das populações subseqüentes (FEHR, 1987). Na Costa do Marfim, o melhoramento de *C. canephora* envolve um esquema de seleção recorrente recíproca que explora a boa performance de cruzamentos entre duas populações geneticamente diferentes, os grupos Guineano e Congolês. O

ganho genético de produção das árvores selecionadas foi de aproximadamente 60%, comparado à média de produção do clone mais produtivo utilizado como controle (LEROY et al., 1997).

A análise da diversidade genética em populações de *Coffea canephora* é, portanto, bastante útil, fornecendo informações necessárias à aplicação da seleção recorrente. Neste aspecto, os marcadores moleculares apresentam-se como uma técnica bastante eficiente para esses estudos.

Marcador molecular é qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, que pode ou não corresponder a regiões expressas do genoma. As diversas técnicas de biologia molecular hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética em nível de seqüência de DNA permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações em estudos de genética e no melhoramento de plantas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Dentre as técnicas disponíveis, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) foi desenvolvida a partir da utilização de oligonucleotídeos iniciadores de seqüência arbitrária, mais curtos que os até então empregados em PCR, para dirigir a reação de amplificação de segmentos do DNA genômico na presença de uma DNA polimerase termo-estável (Taq DNA polimerase) e sob uma alternância cíclica de temperaturas como na reação em cadeia da polimerase (PCR) (WILLIAMS et al. (1990). Essa técnica dispensa o conhecimento prévio das seqüências a serem amplificadas, possibilitando a obtenção de marcadores em nível de DNA, mesmo para espécies para as quais estudos genéticos detalhados não estão disponíveis.

OROZCO-CASTILLO et al. (1994) utilizaram com sucesso a metodologia de marcadores RAPD na detecção de polimorfismo entre espécies de cafeeiros e entre genótipos de *C. arabica*. O perfil de RAPD foi consistente, distinguindo claramente os genótipos etíopes e os sub-grupos de *C. arabica*, Typica e Bourbon. Por meio da análise de RAPD, as diferenças morfológicas e a

origem geográfica dos genótipos foram confirmados. Observou-se que os marcadores RAPDs foram capazes de identificar introgressão interespecífica natural entre *C. canephora* e os acessos de *C. arabica*, Rume Sudan RS-510, assim como as introgressões artificiais como no caso de Catimor T 5175.

LASHERMES et al. (1996a) confirmaram a estreita base genética de cultivares comerciais de *C. arabica*, por meio de marcadores RAPD. Entretanto, a ampla diversidade genética observada dentro da coleção de germoplasma analisada, confirmou a importância das missões de coletas aos centros de origem do cafeeiro.

OROZCO-CASTILLO et al. (1996) estudaram as relações taxonômicas de dezoito acessos de 11 espécies de *Coffea*, empregando marcadores RAPD e “primers” de sequência específicas de mitocôndrias e cloroplastos, com o objetivo de criar subsídios para o melhoramento genético, baseado na transferência de gene alienígena. A análise dos produtos RAPD amplificados agruparam as espécies em três grupos: no primeiro grupo, *C. pseudozanguebariae*, *C. sessiliflora* e *C. racemosa*; no segundo grupo, *C. canephora*, *C. liberica*, *C. brevipes* e *C. congensis*; e no terceiro grupo, *C. humilis*, *C. arabica*, *C. eugenioides* e *C. stenophylla*. Os resultados foram consistentes com o fenótipo de DNA de cloroplastos, com a origem geográfica das espécies e a maior similaridade de *C. eugenioides* com *C. arabica*.

PAILLARD et al. (1996) construíram um mapa de ligação molecular de *C. canephora*, utilizando uma população de haplóides duplos, baseando-se em marcadores RFLP e RAPD, com o objetivo de ser empregado em estudos genéticos e análise de “locus” de características quantitativas (QTLs).

LASHERMES et al. (1996b) confirmaram, por meio de marcadores moleculares, que a auto-incompatibilidade gametofítica em *C. canephora* é governada por um único “locus” S. Os autores verificaram que esse “locus” está associado com um marcador RFLP, g1069, localizado no grupo de ligação 9, do mapa genético construído por PAILLARD et al. (1996), sendo o primeiro gene mapeado do genoma do cafeeiro. A disponibilidade de um marcador RFLP ligado ao “locus” S será particularmente útil em programas de seleção baseados em

marcadores, facilitando a introgressão de autofertilidade de espécies selvagens para *C. canephora*.

TEIXEIRA et al. (1999) avaliaram com marcadores RAPD a distância genética de 38 genótipos de cafeeiros, confirmando a variação interespecífica entre as espécies de *Coffea*, sendo que a maior distância genética de *C. arabica* foi calculada para *C. racemosa*, seguida de *C. canephora* e *C. congensis*. observado em trabalhos anteriores.

Os resultados das análises de divergência genética no gênero *Coffea*, mostrado por marcadores RAPD, confirmaram a importância das introduções de cafeeiros, cujo objetivo principal foi promover a ampliação da diversidade genética, principalmente da espécie *C. arabica*. Os marcadores de DNA serão muito úteis no melhoramento do cafeeiro, uma espécie perene com período de vida longo, principalmente, na formação de populações base para seleção recorrente, em estudos filogenéticos, na identificação de clones, na detecção de variação somaclonal e na transferência de características agronômicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho constou de estudos realizados em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Tecidos/BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, no período de 1995 a 1999.

3.1. Identificação de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em culturas obtidas em *Coffea canephora* e *Coffea arabica*

3.1.1. Obtenção e multiplicação das culturas de *H. vastatrix*

Foram coletadas 232 amostras de folhas ao acaso, com pústulas de *H. vastatrix*, no período de junho de 1995 a julho de 1997. No estado do Espírito Santo foram amostradas lavouras comerciais e jardins clonais de *C. canephora* constituídos de três variedades clonais, em 17 municípios e lavouras experimentais de *C. arabica*, no município de Venda Nova do Imigrante. Em Minas Gerais foram amostradas lavouras comerciais e experimentais de *C. arabica* em cinco municípios do Vale do Piranga. As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos de papel-pardo, devidamente identificados e transportados para o laboratório em caixas de isopor.

Os uredíniosporos foram removidos das folhas utilizando-se pincel de pêlo de camelo macio (Tigre[®] n^o 6), efetuando-se imediatamente a inoculação em plântulas de Catuaí Vermelho (LCH2077-2-5-44), no par de folhas bem desenvolvidas, porém de aspecto ainda tenro. Sempre que a quantidade de uredíniosporos permitia, realizava-se, simultaneamente, a inoculação nos clones diferenciadores.

3.1.2. Técnica de inoculação e preservação do inóculo

A inoculação foi realizada baseando-se na técnica recomendada por D'OLIVEIRA (1954, 1957) e empregada por CARDOSO (1986) e TAMAYO (1988). Com auxílio de pincel macio marca Tigre[®] n^o 6 distribuiu-se, aproximadamente, 1,0 mg de uredíniosporos na face abaxial de folhas desenvolvidas de mudas de Catuaí Vermelho (UFV-2144) que, em seguida, foram aspergidas com água destilada. As mudas foram transferidas para câmara de nevoeiro à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de aproximadamente 100% e ausência de luz, por um período de 72 horas. Após este período, as mudas foram levadas para câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro, à temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 25 dias e, em seguida, mantidas na casa de vegetação, em divisória de madeira, até a esporulação. Os uredíniosporos recolhidos foram acondicionados em ampolas de vidro com tampa de algodão, envolvidos em papel alumínio e mantidos em dessecador, contendo na parte inferior solução aquosa de ácido sulfúrico com densidade de 1,8 na concentração de 32,6% (V/V) à temperatura de 5°C , em geladeira. O período de armazenamento dos uredíniosporos, nesta condição, foi de no máximo três meses, conforme recomendação de ZAMBOLIM e CHAVES (1974).

3.1.3. Identificação de raças fisiológicas de *H. vastatrix*

Para se identificar a(s) raça(s) fisiológica(s) de *H. vastatrix* presentes nas culturas amostradas, foram realizadas duas inoculações em épocas diferentes, em

clones diferenciadores (Quadro 1), desenvolvidos no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, empregando a técnica descrita no item 3.1.2.

Quadro 1 - Clones diferenciadores utilizados na caracterização de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix*, com os respectivos genes de resistência e grupos fisiológicos

Clones diferenciadores	Genes de resistência	Grupos fisiológicos
134/4 (512 Kaffa)	S _H 1,4	I
1006/10 (KP 532)	S _H 1,2,5	L
1343/269 (H. de Timor)	S _H 5,6,7,8,9,?	R
H 420/10	S _H 6 ?	1
33/1 (S 288 -23)	S _H 3,5	G
H 151/1 (33/1 x 110/5)	S _H 2,4,5	Y
H 152/3 (32/1 x 110/5)	S _H 3,4,5	X
H 419/20	S _H ?	3
635/3 (S 12 Kaffa)	S _H 1,4,5	W
H 147/1	S _H 2,3,4,5	T
832/1 (H. de Timor)	S _H 5,6,7,8,9,?	A
110/5 (54 Agaro)	S _H 4,5	J
87/1 (Geisha)	S _H 1,5	C
32/1 (DK 1/6)	S _H 2,5	D
644/18 (H. Kawisari)	S _H ?	M
128/2 (Dilla e Alghe)	S _H 1	α
HW 17/12	S _H 1,2,4,5	O

3.1.4. Avaliação das reações nos clones diferenciadores

A avaliação das interações patógeno-hospedeiro foi realizada semanalmente, sendo a primeira e a última avaliação aos 20 e 60 dias após a inoculação, respectivamente, empregando a escala de tipos de reações (Quadro 2) adotadas pelo CIFC, proposta por D'OLIVEIRA (1954-57). Para a identificação de raças fisiológicas, considerou-se como reação de resistência o clone, que apresentou grau variando de i até 0 e reação de suscetibilidade 1, 2, 3, 4 e X.

Quadro 2 - Escala de avaliação dos tipos de reações induzidas por *Hemileia vastatrix* Berk. e Br. em cafeeiros diferenciadores de raças fisiológicas

Grau	Descrição
i	imune, sem qualquer sinal de infecção.
fl.	“flecks”, reação de hipersensibilidade, às vezes difícil de ser observada macroscopicamente, mas visíveis microscopicamente.
;	pontuações necróticas, visíveis macroscopicamente, situadas no ponto de penetração do fungo ou dispersas pela área de infecção.
T	pequena tumefação no ponto de penetração do fungo, bem visível à lupa.
0	clorose mais ou menos intensa na área de infecção, às vezes acompanhada de pequenos pontos necróticos, mas sem a formação de soros urediniosporíferos.
1	raros soros urediniosporíferos, sempre muito pequenos, às vezes somente distinguíveis à lupa, em áreas predominantemente cloróticas, por vezes acompanhada de necrose.
2	pústulas urediniosporicas pequenas ou médias, difusas, mas bem visíveis macroscopicamente, em áreas intensamente cloróticas.
3	pústulas urediniospóricas médias ou grandes, circundadas por um halo clorótico.
4	grandes pústulas urediniospóricas, sem verdadeira hipersensibilidade, mas podendo apresentar leve clorose na margem de infecção (altamente congenial ou suscetível).
X	reação heterogênea, pústulas urediniospóricas de tamanho muito variável, com lesões cloróticas ou necróticas, sem formação de urediniosporos, incluindo na aparência diversos tipos ou graus de infecção com expressões de congenialidade e incongenialidade.

Fonte: D'OLIVEIRA (1954, 1957).

3.2. Avaliação da resistência de clones de *Coffea canephora* var. Conillon à *Hemileia vastatrix*

3.2.1. Obtenção e condução das mudas

Os clones de *C. canephora* das variedades clonais, recomendadas para o estado do Espírito Santo, foram obtidos de plantas matrizes em lavouras comerciais nos municípios da região Norte, obedecendo os seguintes critérios eliminatórios: idade superior a seis anos; ausência de sintomas de mancha manteigosa (*Colletotrichum coffeanum* Noack); e infecção de ferrugem inferior a 15% e produção superior à média da lavoura. Considerou-se, ainda, arquitetura e vigor das plantas e tipo e tamanho das folhas e tipo e época de maturação dos frutos. Os clones foram multiplicados por estaquia e reavaliados quanto ao enraizamento. Após ensaios de campo, foram selecionados os melhores clones e agrupados de acordo com a época de maturação de frutos, os quais formaram as variedades clonais EMCAPA 8111, EMCAPA 8121 e EMCAPA 8131 (BRAGANÇA et al., 1993).

Para obtenção das mudas dos clones a serem avaliadas, utilizaram-se ramos ortotrópicos novos, que crescem verticalmente na planta, os quais foram mantidos imediatamente após a coleta, em baldes com água até o preparo das estacas, efetuado no mesmo dia. Procederam-se à eliminação dos ramos plagiotrópicos, à individualização dos internódios e ao corte parcial das folhas, deixando-se 1/3 do limbo foliar. O tamanho das estacas foi de 4 a 5 cm, sendo o corte superior de secção reta e o inferior em forma de bisel para proporcionar maior enraizamento. Antes do plantio, as estacas receberam um tratamento por imersão em suspensão de benomyl a 0,035% por 2 min. Efetuou-se o plantio das estacas em sacolas de polietileno preto com 10 × 20 × 0,006 cm, contendo substrato tratado previamente com brometo de metila (80 cc/m³), preparado na proporção de 70% de terra de camada subsuperficial; 30% de esterco de curral; 0,25% de superfosfato simples; 0,05% de cloreto de potássio; e 0,1% de calcário/m³, tratado previamente com brometo de metila. As sacolas foram

mantidas em viveiros, sob um sistema de microaspersão regulado para funcionar a irrigação 30 segundos a cada cinco minutos.

Após quatro meses de enviveiramento, quando as mudas apresentaram dois a três pares de folhas, foram transferidas para a casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), onde foram transplantadas para vasos de 3 litros de capacidade, contendo substrato constituído de terra de camada subsuperficial e esterco de curral curtido, na proporção de 3:1, adubado com 1,5 kg de NPK na formulação 4-14-8 por m³ de substrato, previamente tratado com brometo de metila (80 cc/m³). Foram efetuados tratamentos fitossanitários para controle de cochonilha, ácaro, pulgão e adubações com solução nutritiva para correção de deficiências de micronutrientes.

3.2.2. Avaliação das reações de clones de *C. canephora* var. Conillon a *H. vastatrix*

Para avaliação da reação à ferrugem, clones de *C. canephora* var. Conilon foram inoculados com as raças fisiológicas I(v₂ v₅), II(v₅), III(v₁v₅) e XIII (v₅, η) de *H. vastatrix*, identificadas a partir de amostras de uredíniosporos, procedentes de Caratinga (MG), Linhares (ES), Lavras (MG) e Viçosa (MG), respectivamente. A porcentagem de germinação das culturas do patógeno variou de 32,5 a 42,5%. Um par de folhas jovens e bem desenvolvido de cada planta foi marcado com uma fita plástica e a inoculação realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.1.2. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 72 horas e, posteriormente, transferidas para câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro, à temperatura de 23 ± 1°C, onde permaneceram durante o período de 60 dias, até a avaliação final do experimento.

Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 33 clones e quatro repetições, utilizando a linhagem LCH2077-2-5-44 de Catuaí Vermelho como testemunha.

As avaliações iniciaram-se aos 18 dias após a inoculação e, posteriormente, a cada oito dias, num total de seis avaliações. Foi empregada uma escala de notas adaptada por TAMAYO (1988) das escalas de D'OLIVEIRA (1954, 1957), ESKES (1983) e ABREU (1988), descrita no Quadro 3.

Quadro 3 - Descrição da escala de avaliação dos tipos de reações induzidas por *Hemileia vastatrix* Berk. e Br.

Grau*	Descrição das reações
1	Ausência de sintomas
2	Manchas cloróticas pequenas (até 1 mm de diâmetro). Reação de hipersensibilidade. Ausência de esporulação nas urédias.
3	Manchas cloróticas medianas (1-3 mm de diâmetro). Ausência esporulação nas urédias.
4	Manchas cloróticas medianas (1-3 mm de diâmetro). Poucos uredíniosporos; menos de 25% de urédias esporuladas.
5	Manchas cloróticas grandes (maior que 3 mm de diâmetro). Presença nítida de uredíniosporos; 25-50% de urédias esporuladas.
6	Manchas cloróticas grandes (maior que 3 mm de diâmetro). Uredíniosporos abundantes; mais de 50% de urédias esporuladas.

Fonte: TAMAYO (1988).

* Graus 1, 2 e 3 = reação de resistência; e 4, 5 e 6 = reação de suscetibilidade.

3.3. Estudo da variabilidade genética de clones de *Coffea canephora* var. Conillon por meio de marcadores RAPD

No ensaio 'Avaliação da resistência de clones de *C. canephora* var. Conillon à *H. vastatrix*', observou-se que alguns clones apresentavam reação de resistência e suscetibilidade diferenciado entre as repetições de cada tratamento, quando inoculados com as raças fisiológicas I, II, III e XIII, confirmada após

duas repetições do ensaio. Portanto, o presente ensaio foi proposto com o objetivo de verificar a variabilidade genética inter e intraclones da var. Conillon, por meio de marcadores RAPD.

Avaliaram-se as quatro repetições de 12 clones (02, 139, 03, 07, 11, 14, 100, 104-A, 104-B, 110-A, 153 e 201) que apresentaram variabilidade de reação a *H. vastatrix*, sendo avaliados oito indivíduos dos clones 03 e 07, em função da variabilidade observada, quando inoculados com as raças II e III e III e XIII, respectivamente. Selecionaram-se, ainda, cinco clones (36, 45, 46, 109-A e 110-B) que apresentaram reação uniforme quando inoculados com as quatro raças do patógeno. No total, foram avaliados 76 indivíduos.

3.3.1. Extração do DNA dos clones de *C. canephora* var. Conillon

Para a extração do DNA foram empregadas folhas jovens, não completamente expandidas, coletadas no momento das extrações. Aproximadamente, 200 mg de cada amostra foram maceradas em almofariz de porcelana, contendo N₂ líquido e transferidos para tubos de prolipropileno, com 600 µL do tampão de extração (2% de CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% polyvinylpyrrolidone e 0,2% β-mercaptoetanol, sendo este último adicionado imediatamente antes do uso), previamente aquecido a 65°C.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C, durante 60 min, sendo levemente agitados a cada 10 min. Ao sobrenadante obtido foi adicionado volume igual de CIA (clorofórmio: isoamílico, na proporção de 24:1), invertendo os tubos diversas vezes. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 12.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e extraído mais uma vez com clorofórmio/isoamil, sendo os ácidos nucléicos precipitados com igual volume de isopropanol mantido a -20°C, durante 14 h. O precipitado foi sedimentado por centrifugação a 12.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% durante 3 min. O etanol foi descartado e o precipitado novamente lavado com etanol 95%, por igual período de tempo. Após

descartar o etanol, o precipitado foi ressuspensionado com em 500 µl de Tris-EDTA pH 8,0. Os tubos foram, em seguida, incubados em banho-maria a 65°C durante 5 min. Em seguida, foram adicionados 3 µL de RNase em cada tubo, e estes incubados em banho-maria durante 1 hora a 37°C, depois a 65°C por 5 min. Após este período, foram adicionados 50 µL de acetato de sódio (NaOAc 3 M pH 7,0) e 500 µL de isopropanol a -20°C. Os tubos foram mantidos por 14 h a 4°C. Após este período, foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 min. e descartado o sobrenadante. Em seguida, efetuou-se o tratamento do DNA com 1,0 mL etanol 70% por três minutos, repetindo-se a etapa com etanol 95% pelo mesmo período. Após descartar o sobrenadante, adicionaram-se 300 µL de Tris-EDTA pH 8,0 aos tubos, os quais foram incubados em banho-maria 65°C por 5 minutos. Após ressuspensão do DNA, os tubos foram mantidos a 4°C.

3.3.2. Processo de obtenção de marcadores RAPD

As reações de amplificação foram conduzidas, com algumas modificações de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990). Elas foram realizadas em tubos de polietileno num volume final de 25 µL, cada uma contendo Tris-HCl 10 mM/L (pH 8,0), KCl 50 mM/L, MgCl₂ 2 mM/L, desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 0,1 mM/L de cada, oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) 0,2 µM/L, taq polimerase 1 unidade e DNA 25 ng. O processo de amplificação foi realizado em termociclador “Perkin Elmer modelo 9.600”, utilizando-se um programa de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 35°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por 7 minutos a 72°C e finalizando com 4°C até a retirada das amostras do equipamento.

Foram utilizados 14 “primers” de 10 nucleotídeos, adquiridos na “Operon Technologies” (Califórnia, EUA) (Quadro 4).

Quadro 4 - Seqüência de nucleotídeos de 14 ‘primers’ que geraram padrões de polimorfismo entre os 76 indivíduos de *C. canephora* analisados

Código do ‘primer’	Seqüência de nucleotídeos
OPA-01	5' CAGGCCCTTC
OPA-07	5' GAAACGGGTG
OPA-09	5' GGGTAACGCC
OPA-10	5' GTGATCGCAG
OPA-18	5' AGGTGACCGT
OPB-05	5' TGC GCCCTTC
OPB-12	5' CCTTGAGGCA
OPE-20	5' AACGGTGACC
OPH-04	5' GGAAGTCGCC
OPJ-01	5' CCCGGCATAA
OPJ-04	5' CCGAACACGG
OPJ-05	5' CTCCATGGGG
OPJ-06	5' TCGTTCCGCA
OPK-02	5' GTCTCCGCAA

Após a amplificação, a cada amostra foram adicionados 3 μ L de corante (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%) e os fragmentos de DNA obtidos, separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% em tampão TBE (Tris base 54 g, Ácido Bórico 27,5 g e EDTA 0,5 M pH 8,0 20 ml), a 100 volts, durante 3 horas, e então corados numa solução de Brometo de Etídeo a 5 μ g/ml. Os padrões de bandas foram visualizados, fotografados e armazenados no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II, da Stratagene. Os RAPDs foram registrados como presença ou ausência de bandas.

O experimento foi executado com duas repetições, sendo computadas somente bandas polimórficas, cujos resultados foram consistentes nas duas repetições.

3.3.3. Análise estatística dos dados

3.3.3.1. Avaliação da resistência dos clones de *C. canephora* var. Conillon

O comportamento final dos clones, em relação às raças I, II, III e XIII de *H. vastatrix*, teve como base a última data de avaliação, 60 após a inoculação, utilizando-se a estimativa do intervalo de confiança (IC) do grau médio de doença de cada clone, a 5% ($\alpha = 5\%$) de significância (GOMES, 1985).

Foram considerados resistentes, os clones que apresentaram média do grau de doença menor que 4 e como suscetíveis, média maior ou igual a 4.

3.3.3.2. Avaliação da variabilidade genética de clones de *C. canephora* var. Conillon

Foram avaliadas a presença ou a ausência de bandas no gel, simbolizados pelas notas 1 (um) e 0 (zero), respectivamente, computando-se bandas polimórficas, diretamente sobre as fotografias, obtidas após eletroforese em gel de agarose. Os dados foram transferidos para uma planilha eletrônica para cálculo e obtenção de uma matriz das distâncias genéticas. Por meio de programa estatístico GENES, foi realizada a análise de agrupamento dos indivíduos de cada clone, adotando-se como medida de dissimilaridade o complemento aritmético de Jaccard e, como técnica de agrupamento, o método de Tocher. Para a construção de dendrograma das distâncias genéticas, foi empregado o programa STATISTICA.

O complemento aritmético de Jaccard é dado por

$$J = a/a + b = c$$

em que

$a = 1 - 1$: número de coincidência do tipo “1” e “1”;

$b = 1 - 0$: número de discordância do tipo “ 1” e “0”;

$c = 0 - 1$: número de discordância do tipo “0” e “1”.

sendo que 1 (um) significa a presença da banda; e 0 (zero) a ausência da banda.

O complemento aritmético expresso por DJ é dado por $DJ = 1 - J$.

O método de Tocher adota o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos. Este método requer a obtenção da matriz de dissimilaridade, sobre a qual é identificado o par de indivíduos mais similar, que formarão o grupo inicial. A partir daí é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos, adotando-se o critério anteriormente citado.

A entrada de um indivíduo em um grupo sempre aumenta o valor médio da distância dentro desse grupo, por meio da comparação entre o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e um nível máximo permitido, que pode ser estabelecido arbitrariamente, ou adotar, como tem sido geralmente feito, o valor máximo da medida de dissimilaridade encontrado no conjunto das menores distâncias envolvendo cada indivíduo (CRUZ e REGAZZI, 1994).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em alguns municípios dos estados do Espírito Santo e Minas Gerais

Das 232 amostras de uredíniosporos de *H. vastatrix* obtidas em lavouras de *C. canephora* e *C. arabica*, foram estabelecidas 139 culturas em Catuaí Vermelho (LCH2077-2-5-44). O insucesso no estabelecimento de 93 culturas foi causado pela oxidação das folhas em algumas amostras, durante o percurso do local de coleta até ao laboratório e em outras a quantidade de inóculo não foi suficiente para a infecção e colonização dos tecidos do hospedeiro multiplicador (Quadro 5).

A raça II foi constatada em 137 culturas, sendo 107 procedentes de amostras coletadas no estado do Espírito Santo, em *C. canephora* e *C. arabica*, e 30 em Minas Gerais, em *C. arabica*. Os resultados foram confirmados após duas inoculações na série de clones diferenciadores usada no CIFC. Das amostras coletadas em Minas Gerais, em 1995, nos municípios de Viçosa e Coimbra foi identificada a raça III portadora dos alelos v_1v_5 que confere reação de suscetibilidade nos clones CIFC 128/2 - Dilla e Alghe (S_H1) e CIFC 87/1-Geisha ($S_H1,5$), além dos cafeeiros do grupo β , E, F e N, conforme apresentado no Quadro 6.

Quadro 5 - Culturas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. estabelecidas nos estados do Espírito Santo e Minas Gerais a partir de amostras de uredíniosporos, coletadas em lavouras cafeeiras, no período de 1995 a 1997

Municípios/estados	Espécies	Número de culturas			Total
		1995	1996	1997	
Águia Branca (ES)	<i>C. canephora</i>	3	-	3	6
Alegre (ES)	<i>C. canephora</i>	2	4	-	6
Baixo Guandú (ES)	<i>C. canephora</i>	-	-	1	1
Barra de São Francisco (ES)	<i>C. canephora</i>	3	-	3	6
Colatina (ES)	<i>C. canephora</i>	3	-	3	6
Itaguaçu (ES)	<i>C. canephora</i>	3	-	3	6
Itarana (ES)	<i>C. canephora</i>	3	-	3	6
Jaguaré (ES)	<i>C. canephora</i>	2	-	6	8
João Neiva (ES)	<i>C. canephora</i>	2	-	8	10
Linhares (ES)	<i>C. canephora</i>	4	-	11	15
Marilândia (ES)	<i>C. canephora</i>	2	-	-	2
Rio Bananal (ES)	<i>C. canephora</i>	5	-	-	5
Santa Teresa (ES)	<i>C. canephora</i>	-	-	3	3
São Domingos do Norte (ES)	<i>C. canephora</i>	2	-	3	5
São Gabriel da Palha (ES)	<i>C. canephora</i>	2	-	3	5
São Mateus (ES)	<i>C. canephora</i>	-	-	6	6
Valério (ES)	<i>C. canephora</i>	1	-	-	1
Venda Nova do Imigrante (ES)	<i>C. arabica</i>	-	10	-	10
Coimbra (MG)	<i>C. arabica</i>	1	-	-	1
Paula Cândido (MG)	<i>C. arabica</i>	1	-	1	2
Porto Firme (MG)	<i>C. arabica</i>	2	-	-	2
São Miguel do Anta (MG)	<i>C. arabica</i>	-	-	1	1
Viçosa (MG)	<i>C. arabica</i>	4	-	22	26
Total					139

Quadro 6 - Raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* identificadas nos municípios do estado do Espírito Santo e Minas Gerais, em 1995/1996/1997

Município/estado	Ano de coleta	Espécies	Nº de culturas ¹	Raças identificada	Ocorrência (%)
Águia Branca (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
Alegre (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	02	Raça II	100
Barra de São Francisco (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
Colatina (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
Itaguaçu (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
Itarana (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
Jaguare (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	02	Raça II	100
João Neiva (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	02	Raça II	100
Linhares (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	04	Raça II	100
Marilândia (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	02	Raça II	100
Rio Bananal (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	05	Raça II	100
São Domingos do Norte (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	02	Raça II	100
São Gabriel da Palha (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	02	Raça II	100
Valério (ES)	1995	<i>C. canephora</i>	01	Raça II	100
Coimbra (MG)	1995	<i>C. arabica</i>	01	Raça III	100
Paula Cândido (MG)	1995	<i>C. arabica</i>	01	Raça II	100
Porto Firme (MG)	1995	<i>C. arabica</i>	02	Raça II	100
Viçosa (MG)	1995	<i>C. arabica</i>	04	Raça II	75
	1995			Raça III	25
Venda N. do Imigrante (ES)	1996	<i>C. arabica</i>	10	Raça II	100
Alegre (ES)	1996	<i>C. canephora</i>	04	Raça II	100
Águia Branca (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
Baixo Guandú (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	01	Raça II	100
Barra de São Francisco (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
Colatina (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
Itaguaçu (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
Itarana (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
João Neiva (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	08	Raça II	100
Jaguare (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	06	Raça II	100
Linhares (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	11	Raça II	100
Santa Teresa (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
São Domingos do Norte (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
São Gabriel da Palha (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	03	Raça II	100
São Mateus (ES)	1997	<i>C. canephora</i>	06	Raça II	100
Paula Cândido (MG)	1997	<i>C. arabica</i>	01	Raça II	100
São Miguel do Anta (MG)	1997	<i>C. arabica</i>	01	Raça II	100
Viçosa (MG)	1997	<i>C. arabica</i>	22	Raça II	100

1. 1995 = 45; 1996 = 14; e 1997 = 80.

A raça II apresenta uma importância relevante no melhoramento genético do cafeeiro, visando resistência a *H. vastatrix*, pois sua prevalência indica a presença do gene S_H5 no hospedeiro, o que o torna suscetível a todas as raças que possuem o alelo recessivo de avirulência v₅. No Brasil, na ocasião da constatação da ferrugem, na Bahia foi confirmada a presença da raça II em todas as culturas analisadas. De acordo com SCHIEBER e ZENTMYER (1984), essa raça foi responsável pelo estabelecimento do patógeno nos cafezais dos outros estados do país e de outros países da América do Sul.

A prevalência da raça II, nas culturas coletadas em *C. arabica*, está de acordo com as informações de RODRIGUES JR. et al. (1975), os quais afirmam que a predominância desta raça deve-se à homogeneidade genética das cultivares de café arábica. Por outro lado, a presença da raça III, nos cafeeiros da espécie *C. arabica*, indica a presença do gene S_H1 associado ao S_H5.

A ocorrência da raça II em 100% das amostras coletadas nos cafeeiros da variedade Conillon, indica, também, a prevalência do gene S_H5 nas plantas amostradas. No entanto, segundo RODRIGUES JR. et al. (1975), ocorre em *C. canephora* plantas do grupo fisiológico A e F, resistentes e suscetíveis ao patógeno, respectivamente, e plantas com resistência parcial a algumas raças, pertencentes aos grupos fisiológicos Q, P, K e B. Em lavouras de *C. canephora*, formadas por mudas oriundas de sementes, essa segregação ocorre com alta frequência, devido à alogamia e auto-incompatibilidade apresentados por essa espécie.

Existem poucos relatos de ocorrência de raças fisiológicas de *H. vastatrix* em *C. canephora*. Em 1972 foi identificada a raça XV em amostras coletadas em cafeeiros da variedade Conillon, no estado do Espírito Santo (CHAVES e PEREIRA, 1980). ESKES (1983) constatou a ocorrência de três raças de *H. vastatrix* (Is. 2, Is. 10 e Is. 11) que superaram a resistência de genes desconhecidos da variedade Conillon, da coleção de germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

HOLGUIN et al. (1993) estudaram o comportamento de vários isolados de *H. vastatrix*, procedentes da África e Indonésia, coletados em algumas

variedades de *C. canephora*. Os autores observaram que os isolados mostraram reação diferenciada quando inoculados em *C. canephora*, Catimor, Catuaí Amarelo, Matari e em alguns descendentes do Híbrido de Timor. Observou-se que isolados coletados em *C. canephora*, na África, foram menos agressivos e apresentaram maior variabilidade do que os isolados obtidos em Catimor, na Indonésia, quando foram inoculados em Caturra Amarelo e Matari.

MONTAGNON et al. (1994), na Costa do Marfim, verificaram que em clones do grupo Guienenses de *C. canephora*, com baixa incidência de ferrugem em 1989, sofreram um ataque severo da doença em 1991, indicando a presença de uma nova raça do patógeno.

Os resultados desse trabalho indicam a necessidade de realização de amostragem sistemática e freqüente de culturas de *H. vastatrix* nas regiões produtoras de café Conillon, com o objetivo de identificar novas raças e verificar a prevalência destas no tempo. CHAVES e PEREIRA (1980), RODRIGUES JR. et al. (1975) e BETTENCOURT (1981) afirmam que a freqüência e distribuição de raças fisiológicas desse patógeno estão estritamente correlacionadas com a diversidade de genótipos no campo, pois nestas condições há maior pressão de seleção e, assim haverá uma maior probabilidade de ocorrência de novas raças.

4.2. Avaliação da resistência de clones de *Coffea canephora* var. Conilon à *H. vastatrix*, por meio de inoculações artificiais

O grau médio de doença e o intervalo de confiança, para cada um dos clones da variedade Conillon, aos 60 dias após a inoculação, em relação às quatro raças de *H. vastatrix*, na terceira repetição do ensaio, estão representados graficamente nas Figuras 1, 2, 3 e 4. O intervalo de confiança mostra a variabilidade de reação de cada clone em relação às quatro raças do patógeno inoculadas. Foram considerados os resultados da terceira repetição do ensaio, por serem mais consistentes, uma vez que foi observada variação quanto aos tipos de reações entre as repetições de cada tratamento.

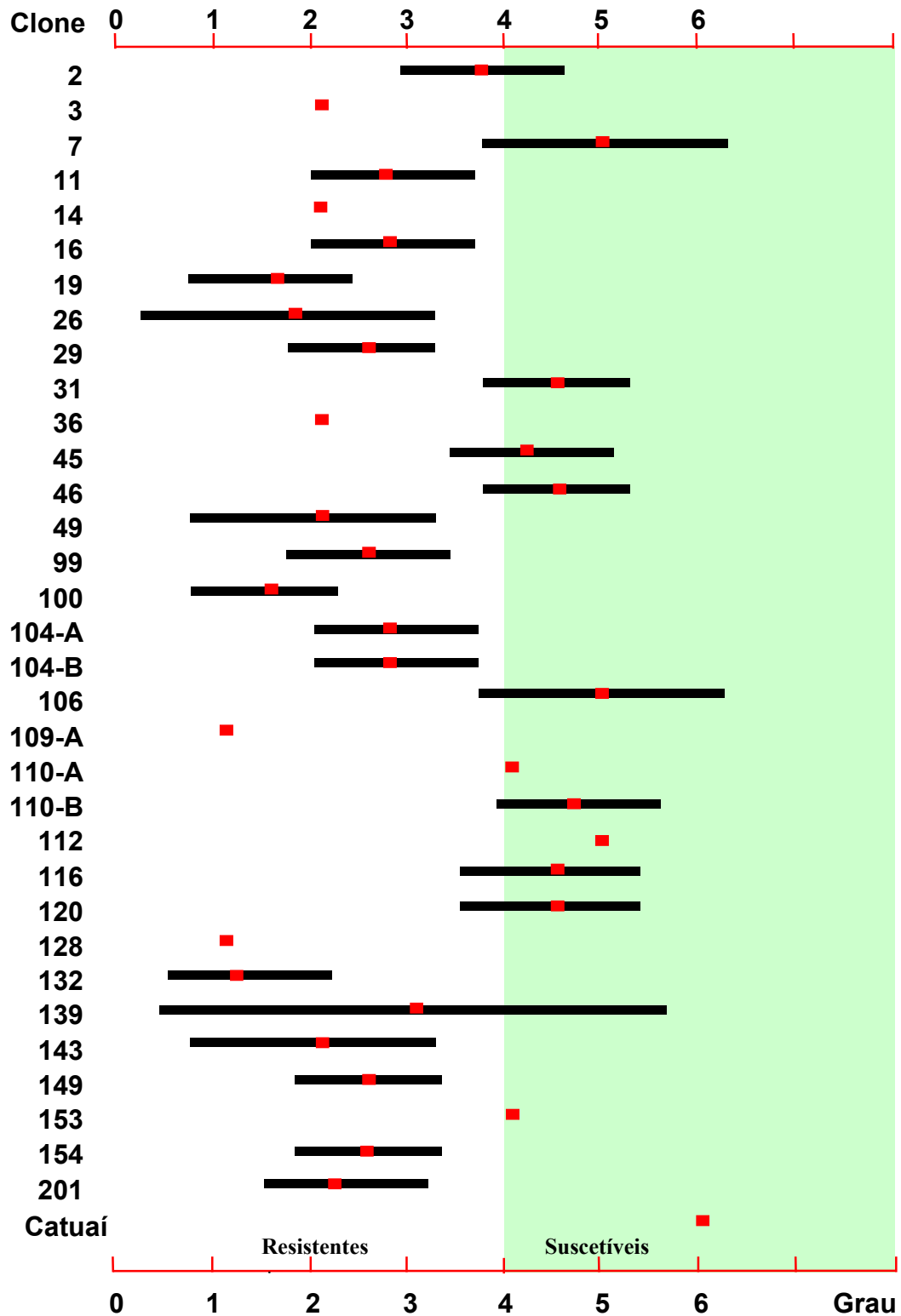


Figura 1 - Representação gráfica do comportamento dos clones em relação à raça I, expresso pelo intervalo de confiança do grau médio de doença ($t < 0,05$), aos 60 dias após a inoculação.

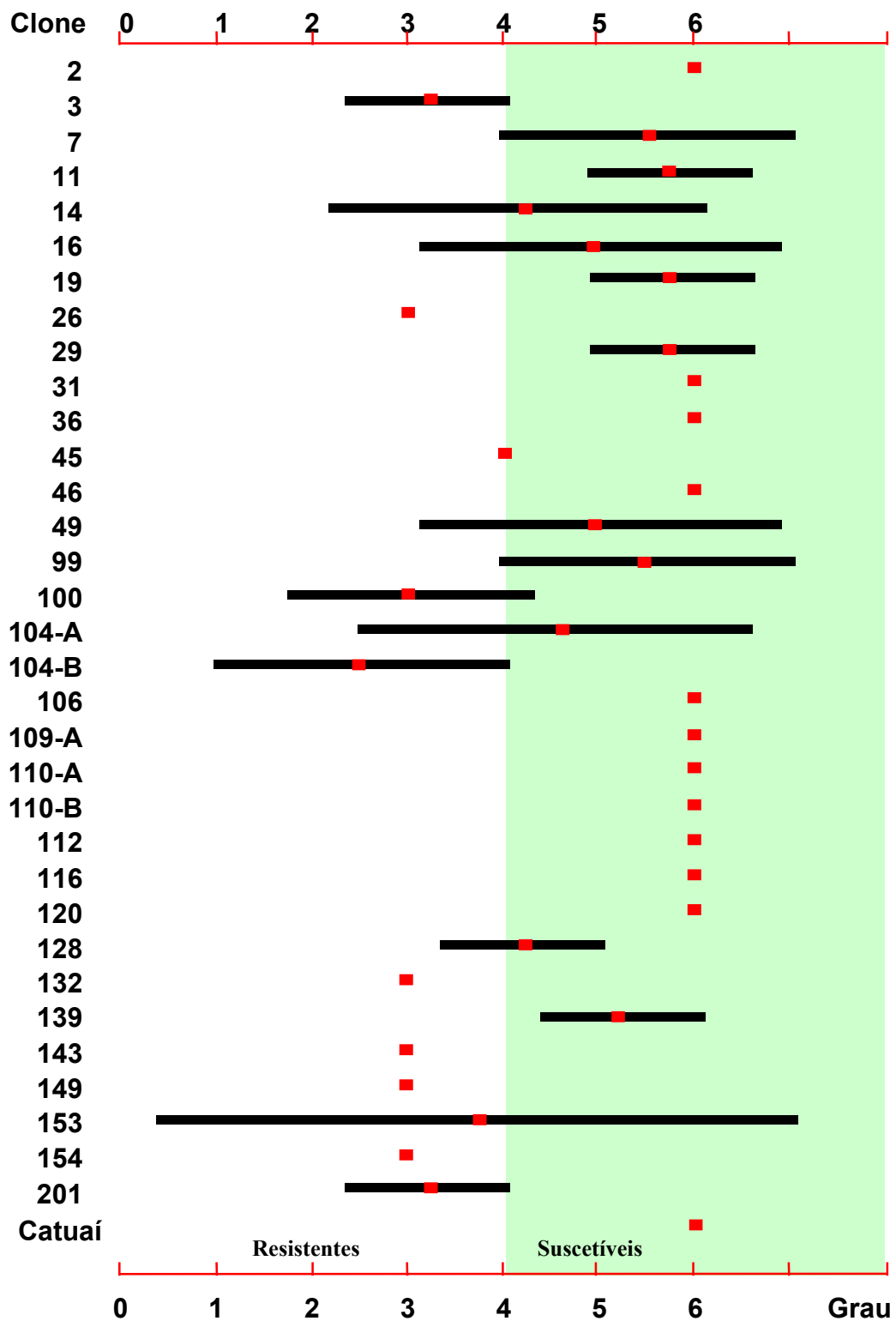


Figura 2 - Representação gráfica do comportamento dos clones em relação à raça II, expresso pelo intervalo de confiança do grau médio de doença ($t < 0,05$), aos 60 dias após a inoculação.

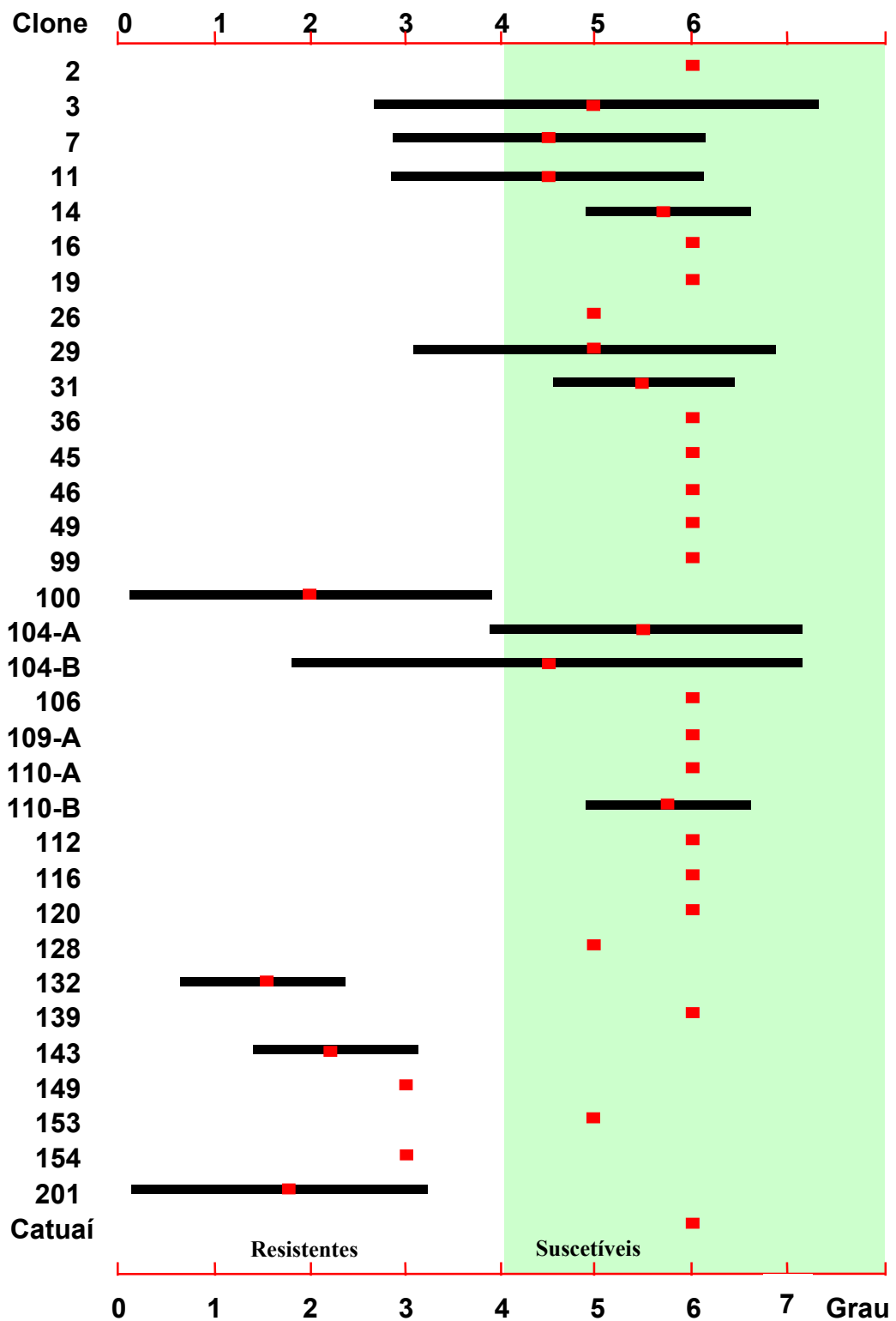


Figura 3 - Representação gráfica do comportamento dos clones em relação à raça III, expresso pelo intervalo de confiança do grau médio de doença ($t < 0,05$), aos 60 dias após a inoculação.

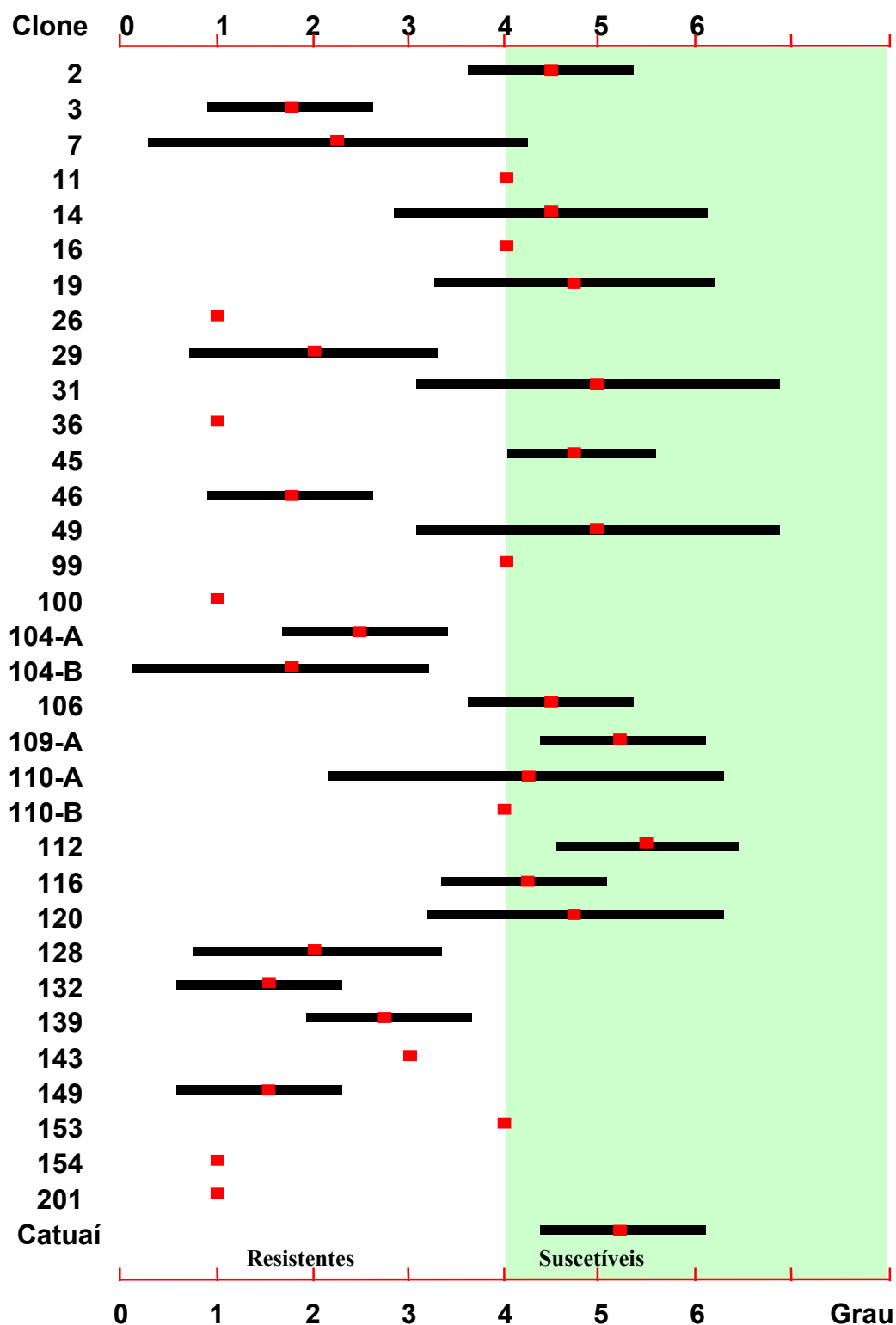


Figura 4 - Representação gráfica do comportamento dos clones em relação à raça XIII, expresso pelo intervalo de confiança do grau médio de doença ($t < 0,05$), aos 60 dias após a inoculação.

Neste experimento considerou-se como resistentes os clones que apresentaram grau médio de doença inferior a 4, e, como suscetíveis, os clones que apresentaram grau médio de doença maior ou igual a 4.

Os clones de *C. canephora* var. Conilon apresentaram graus médios de doença diferenciados para as quatro raças de *H. vastatrix* estudadas. Dos 33 clones analisados, 66,7; 30,3; 18,2; e 48,5% apresentaram grau médio inferior a 4, quando inoculados com as raças I, II, III e XIII, respectivamente, sendo, portanto, considerados resistentes às respectivas raças do patógeno.

Considerando o grau médio de doença, 66,7% dos clones inoculados com a raça I (Figura 1) comportaram-se como resistentes, entretanto observou-se uma variação de grau médio de doença entre os clones e de valores de nota atribuída a cada repetição. Dentre as quatro repetições do clone 02, uma planta apresentou reação de resistência (nota 3) e três plantas, reação de suscetibilidade (nota 4). Comportamento contrário foi observado no clone 139, que apresentou três plantas com reação de resistência (duas notas 3 e uma nota 1) e uma planta com reação de suscetibilidade (nota 5).

Com relação à raça II (Figura 2), 30,3% dos clones comportaram-se como resistentes. O grau médio para resistência variou de 2,5 a 3,75, enquanto para suscetibilidade, variou de 4 a 6. Entretanto, 18,2% dos clones apresentaram reações de resistência e suscetibilidade entre as repetições. Os clones 03, 99 e 201 apresentaram três repetições com reação de resistência e uma repetição com reação de suscetibilidade. Por outro lado, os clones 14, 104-A e 153 apresentaram três repetições com reação de suscetibilidade e uma repetição com reação de resistência.

Quando os clones foram inoculados com a raça III, encontrou-se um menor número de plantas resistentes (18,2%). Observou-se maior homogeneidade de reações para resistência e suscetibilidade. Dos 33 clones avaliados, 12% apresentou variação para resistência e suscetibilidade entre as repetições. Nos clones 07 e 11 observou-se que uma planta apresentou reação de resistência (notas 3 e 4), reação de suscetibilidade (notas 5 e 6). No clone 03, três plantas

foram suscetíveis (notas 5 e 6) e uma planta resistente (nota 3). No clone 104-B, observaram-se duas plantas resistentes (notas 3) e duas suscetíveis (notas 6).

Com relação à raça XIII, 48,5% dos clones apresentaram reação de resistência. Observou-se instabilidade de reações, em 6% dos clones inoculados. No clone 07, três plantas mostraram-se resistentes (notas 1 e 2) e uma planta suscetível (nota 4). Ao contrário, no clone 110-A, encontraram-se três plantas suscetíveis (notas 4 e 6) e uma planta resistente (nota 3).

Considerando a média dos graus de reações de resistência (média inferior a 4) e de suscetibilidade (média maior ou igual a 4), de acordo com a escala de notas, os clones 100, 132, 143, 149, 154 e 201 foram resistentes, enquanto que os clones 31, 45, 106, 110-A, 110-B, 112, 116 e 120, suscetíveis a todas as quatro raças inoculadas.

Analisando o comportamento dos clones que compõem as variedades clonais, observa-se no Quadro 7 que na variedade EMCAPA 8111, composta por nove clones de ciclo de maturação precoce, apenas o clone 110-B apresentou reação de suscetibilidade à raça I. Por outro lado, cinco clones foram suscetíveis à raça II, oito clones foram suscetíveis à raça III e dois, suscetíveis à raça XIII.

Dos 13 clones de ciclo de maturação intermediária que compõem a variedade EMCAPA 8121 (Quadro 8), quatro foram suscetíveis à raça I, dez às raças II e III e oito, à raça XIII.

O comportamento da variedade EMCAPA 8131, com relação às raças fisiológicas de *H. vastatrix*, pode ser observado no Quadro 9. Dos 11 clones que compõem esta variedade, seis, oito, nove e sete clones foram suscetíveis às raças I, II, III e XIII, respectivamente. O clone 153 apresentou um desvio-padrão de 2,06, quando inoculado com a raça II, mostrando variações entre as repetições.

Os resultados indicaram que as variedades clonais são compostas por clones resistentes e suscetíveis às raças de *H. vastatrix* estudadas. A variabilidade de reações observadas entre as repetições de alguns clones, quando inoculados com as referidas raças fisiológicas de *H. vastatrix*, mostrada pela diferenciação nas respostas à infecção e pelo desvio-padrão das notas da escala de avaliação, foi confirmada após três repetições desse ensaio, sugerindo a necessidade de investigação da pureza genética dos clones por meio de marcadores moleculares.

Quadro 7 - Comportamento de clones pertencentes à variedade EMCAPA 8111, avaliados pela média do grau de doença e desvio-padrão, 60 dias após a inoculação, com as raças fisiológicas I, II, III e XIII de *H. vastatrix*

Clones	Raças			
	I	II	III	XIII
02	3,75 ± 0,50 ^a	6,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	4,50 ± 0,58*
03	2,00 ± 0,00	3,25 ± 0,50	5,00 ± 1,41*	1,75 ± 0,50
26	1,75 ± 0,96	3,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00*	1,00 ± 0,00
29	2,50 ± 0,58	5,75 ± 0,50*	5,00 ± 1,15*	2,00 ± 0,82
36	2,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	1,00 ± 0,00
104-A	2,75 ± 0,50	4,50 ± 1,29*	5,50 ± 1,00*	2,50 ± 0,58
104-B	2,75 ± 0,50	2,50 ± 1,00	4,50 ± 1,73*	1,75 ± 0,96
110-B	4,75 ± 0,50*	6,00 ± 0,00*	5,75 ± 0,50*	4,00 ± 0,00*
154	2,50 ± 0,58	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

* Clones suscetíveis às raças fisiológicas de *H. vastatrix*, inoculadas.

^a Desvio-padrão dos valores atribuídos às reações, nos diferentes intervalos de avaliação.

Alguns clones apresentaram graus intermediários de doença, avaliados pela nota 4 da escala de avaliação, que corresponde a menos de 25% de urédias esporuladas. Este tipo intermediário de reação foi verificada por ESKES (1983) nessa variedade, sugerindo que se trata de resistência incompleta, manifestada por uma menor esporulação do patógeno.

De acordo com os conceitos de van der PLANK (1984), a resistência do hospedeiro a patógenos pode ser do tipo vertical e horizontal. Em cafeeiros, inicialmente, foi observado resistência do tipo vertical, com a constatação dos genes S_H1 a S_H9. A resistência chamada vertical é qualitativa, pouco duradoura, específica e envolve mecanismos cuja herança é governada por genes simples, dominantes e fáceis de manipular. Posteriormente, com a avaliação de progênies descendentes de hibridizações de *C. arabica* com cafeeiros de genótipos mais complexos e descendentes do Híbrido de Timor, vários autores observaram a

Quadro 8 - Comportamento de clones pertencentes à variedade EMCAPA 8121, avaliados pela média do grau de doença e desvio-padrão, 60 dias após a inoculação, com as raças fisiológicas I, II, III e XIII de *H. vastatrix*

Clones	Raças			
	I	II	III	XIII
07	5,00 ± 0,82 ^a	5,50 ± 1,00*	4,50 ± 1,00*	2,25 ± 1,26
11	2,75 ± 0,50	5,75 ± 0,50*	4,50 ± 1,00*	4,00 ± 0,00*
14	2,00 ± 0,00	4,25 ± 1,26*	5,75 ± 0,50*	4,50 ± 1,00*
16	2,75 ± 0,50	5,00 ± 1,15*	6,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*
19	1,50 ± 0,58	5,75 ± 0,50*	6,00 ± 0,00*	4,75 ± 0,96*
109-A	1,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	5,25 ± 0,50*
110-A	4,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	4,25 ± 1,26*
112	5,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	5,50 ± 0,58*
120	4,50 ± 0,58*	6,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	4,75 ± 0,96*
128	1,00 ± 0,00	4,25 ± 0,50*	5,00 ± 0,00*	2,00 ± 0,82
132	1,25 ± 0,50	3,00 ± 0,00	1,50 ± 0,58	1,50 ± 0,58
149	2,50 ± 0,58	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	1,50 ± 0,58
201	2,25 ± 0,50	3,25 ± 0,50	1,75 ± 0,96	1,00 ± 0,00

* Clones suscetíveis às raças fisiológicas de *H. vastatrix*, inoculadas.

^a Desvio-padrão dos valores atribuídos às reações, nos diferentes intervalos de avaliação.

Quadro 9 - Comportamento de clones pertencentes à variedade EMCAPA 8131, avaliados pela média do grau de doença e desvio-padrão, 60 dias após a inoculação, com as raças fisiológicas I, II, III e XIII de *H. vastatrix*

Clones	Raças			
	I	II	III	XIII
31	4,50 ± 0,58* ^a	6,00 ± 0,00*	5,50 ± 0,58*	5,00 ± 1,15*
45	4,25 ± 0,50*	4,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	4,75 ± 0,50*
46	4,50 ± 0,58*	6,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	1,75 ± 0,50
49	2,00 ± 0,82	5,00 ± 1,50*	6,00 ± 0,00*	5,00 ± 1,15*
99	2,50 ± 0,58	5,50 ± 1,00*	6,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*
100	1,50 ± 0,58	3,00 ± 0,82	2,00 ± 1,15	1,00 ± 0,00
106	5,00 ± 0,82*	6,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	4,50 ± 0,58*
116	4,50 ± 0,58*	6,00 ± 0,00*	6,00 ± 0,00*	4,25 ± 0,50*
139	3,00 ± 1,63	5,25 ± 0,50*	6,00 ± 0,00*	2,75 ± 0,50
143	2,00 ± 0,82	3,00 ± 0,00	2,25 ± 0,50	3,00 ± 0,00
153	4,00 ± 0,00*	3,75 ± 2,06	5,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*

* Clones suscetíveis às raças fisiológicas de *H. vastatrix*, inoculadas.

^a Desvio-padrão dos valores atribuídos às reações, nos diferentes intervalos de avaliação.

presença de resistência do tipo horizontal. Esta se caracteriza por ser quantitativa, mais duradoura, não-específica e governada por poligenes, por apresentar o mesmo nível de proteção a todas as raças do patógeno.

Segundo van der PLANK (1984), a resistência horizontal atua na redução da taxa de infecção, retardando a penetração, reduzindo o tamanho das pústulas e aumentando o período latente. É controlada, geralmente, por sistemas poligênicos aparentemente de efeitos aditivos que exercem diferentes funções na planta e que não apresentam interação com o patógeno, advindo daí, seu caráter de resistência permanente, porém, em geral, incompleta.

No cafeeiro, conforme discutido por CHAVES (1976), alguns híbridos como o Híbrido de Timor e o Icatú podem apresentar ao lado da resistência

vertical complexa, altos níveis de resistência horizontal. Este fato foi preconizado por vários autores (ROBINSON, 1976; PARLEVLIET, 1979; FRY, 1982), os quais afirmam que nem sempre resistências duradouras são governadas por poligenes.

Segundo CHAVES (1976), os primeiros indícios da existência de resistência horizontal, associada à resistência vertical, foram apresentados por BETTENCOURT (1983). Progênies com os fatores S_{H1} e S_{H4} , provenientes da Etiópia, e S_{H3} , originário da Índia (*C. liberica*), apresentaram plantas que, embora atacadas pela raça correspondente de *Hemileia vastatrix*, não foram, aparentemente, muito atingidas pela doença.

A variação entre plantas dos tipos de reações raça-específica foi observada por ESKES (1983), na variedade Conillon, no entanto resistência do tipo horizontal foi verificada por CADENA-GOMEZ e BURITICÁ-CÉSPEDES (1980), baseando-se na suscetibilidade da maioria dos genótipos analisados, à raça II de *H. vastatrix*.

A suscetibilidade dos clones da variedade Conillon, às raças de *H. vastatrix*, sugere a necessidade de seleção assistida por inoculações de raças desse patógeno, predominantes na região para qual os materiais estão sendo selecionados. Neste trabalho, verificaram-se a predominância da raça II no estado do Espírito Santo e a suscetibilidade de 70% dos clones selecionados para essa região a essa raça.

Outro aspecto a ser considerado são as condições climáticas da região, pois o desenvolvimento da ferrugem do cafeeiro é afetado por vários fatores como a temperatura, o molhamento foliar e a altitude. ALFONSI et al. (1977) observaram que na presença de altas temperaturas, em torno de 34,6°C, mesmo em ótimas condições de umidade, os níveis de infecção estabilizaram em torno de 0,2 pústulas/folha. Nos meses, cuja temperatura média oscilou em torno de 19,8-22,2°C, o nível de infecção atingiu 2,3 pústulas/folha, mesmo sob forte seca. MÔNACO et al. (1973) estudaram o efeito das altas temperaturas, em condições controladas, sobre o desenvolvimento e a esporulação de *H. vastatrix*. As plântulas inoculadas foram submetidas a tratamentos térmicos de 40°C por quatro

horas, durante quatro dias sucessivos. Os sintomas não evoluíram além do estágio de flecks, enquanto nas testemunhas a evolução da doença ocorreu normalmente. De acordo com MATIELLO (1998), na região norte do estado do Espírito Santo, as condições de temperatura e umidade são, na maior parte do ano, desfavoráveis à ferrugem. As temperaturas são muito altas de novembro a março, com média de 25,5°C, quando existe umidade. As temperaturas elevadas paralisam o desenvolvimento de lesões e inibem a esporulação, enquanto chuvas muito fortes e descontínuas lavam os esporos das folhas. No período de março a setembro, quando as temperaturas são mais amenas e favoráveis, com média de 22°C, a precipitação pluviométrica é reduzida, não favorecendo a ocorrência da doença. Porém, se houver chuvas neste período, a doença pode evoluir. Este aspecto deve ser cuidadosamente analisado, uma vez que regiões como o sul da Bahia, Rondônia e Amazonas apresentam áreas aptas ao desenvolvimento do cafeeiro Conillon, como também à ocorrência de epidemia de ferrugem. Portanto, a recomendação de clones para estas regiões deve ser analisada cuidadosamente.

4.3. Diversidade genética de clones de *Coffea canephora* var. Conillon, analisada por meio de marcadores RAPD

A análise de diversidade genética entre clones de Conillon foi realizada por meio de marcadores RAPD, os quais são capazes de detectar diferenças em nível de DNA, utilizando-se como iniciadores oligonucleotídeos com 10 pares de bases.

A reação de PCR gerou produtos de amplificação RAPD constantes ou monomórficos e variáveis ou polimórficos, os quais são muito úteis em estudos de taxonomia e sistemática. Porém, no presente trabalho, foram considerados somente os produtos variáveis ou polimórficos. Dos 20 “primers” utilizados, 14 geraram 29 bandas polimórficas consistentes, ou seja, geradas em ambas repetições das reações de amplificação. Em média, cada “primer” gerou dois “loci” polimórficos. Exemplo do nível de polimorfismo detectado é apresentado na Figura 5, gerado pelo “primers” OPJ-12.

As plantas geneticamente próximas foram agrupadas, utilizando-se o método de agrupamento de Tocher, CRUZ e REGAZZI (1994), baseando-se na distância de dissimilaridade de Jaccard. Cada grupo é estabelecido nesta técnica, adotando-se o critério em que a distância média intragrupo é inferior a qualquer distância intergrupo, de tal forma que existe homogeneidade dentro e heterogeneidade entre grupos.

Pelo método de agrupamento de Tocher, foi possível agrupar as 76 plantas da var. Conillon, pertencentes a 17 clones, em 16 grupos (Quadro 10), sendo que cada clone formou um grupo, porém a planta 21, correspondente à repetição I do clone 104-A, formou isoladamente, o grupo 16.

Os clones 104-A e 104-B formaram o grupo 6, assim como os clones 110-A e 110-B, o grupo 11. No entanto, com relação aos clones 104-A e 104-B, que pertencem à variedade EMCAPA 8111, de ciclo de maturação precoce, quando inoculados com as raças fisiológicas de *H. vastatrix*, apresentaram reação diferenciada. Quando inoculados com as raças I e XIII, mostraram-se como resistentes, e com a raça III, suscetíveis. Porém, quando inoculados com a raça II, o clone 104-A mostrou-se suscetível e o 104-B, resistente. Com relação aos clones 110-A e 110-B, ambos foram igualmente suscetíveis às quatro raças do patógeno, porém, o clone 110-A pertence à variedade precoce EMCAPA 8111 e o clone 110-B à variedade de ciclo de maturação intermediária, EMCAPA 8121.

Analisando o dendrograma (Figura 6), com base nas porcentagens de dissimilaridade observa-se que, a 60% de distância genética estimada, as plantas analisadas formaram três grupos. O primeiro, grupo A, com dezesseis indivíduos representando quatro clones (109-A, 36, 46 e 45); o segundo, grupo B, com 35 indivíduos representando oito clones (11, 07, 201, 153, 110-B, 110-A, 104-B e 104-A) e o terceiro, grupo C, com 25 indivíduos representados por cinco clones (02, 139, 03, 14, 100 e um indivíduo do clone 104-A).

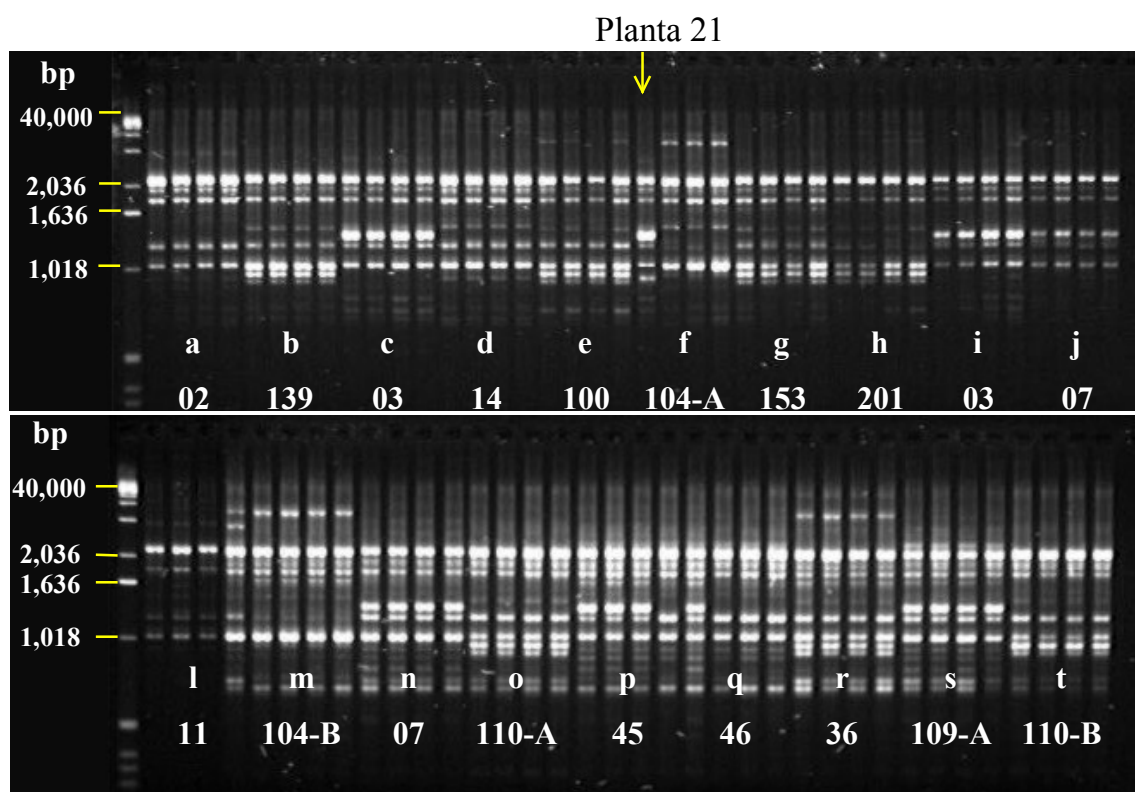


Figura 5 - Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) obtido com o “primer” OPB-12 para 76 indivíduos de 17 clones de *Coffea canephora* var. Conillon. A seqüência dos indivíduos partindo da esquerda para a direita é a seguinte: (a) clone 02; (b) clone 139; (c) clone 03; (d) clone 14; (e) clone 100; (f) clone 104-A; (g) clone 153; (h) clone 201; (i) clone 03; (j) clone 07; (l) clone 11; (m) clone 104-B; (n) clone 07; (o) clone 110-A; (p) clone 45; (q) clone 46; (r) clone 36; (s) clone 109-A; (t) clone 110-B e DNA marcador de peso molecular 1 kb “Ladder”. A seta indica polimorfismo mais evidente, da repetição I do clone 104-A.

Quadro 10 - Agrupamento de indivíduos da variedade Conillon de *Coffea canephora* pelo método de Tocher

Grupo	Indivíduos/Clones
1	1, 2, 3, 4 (clone02)
2	5, 6, 7, 8 (clone 139)
3	9, 10, 11, 12, 33, 34, 35, 36 (clone 03)
4	13, 14, 15, 16 (clone 14)
5	17, 18, 19, 20 (clone 100)
6	22, 23, 24 (clone 104-A); 45, 46, 47, 48 (clone 104-B)
7	25, 26, 27, 28 (clone 153)
8	29, 30, 31, 32 (clone 201)
9	37, 38, 39, 40, 49, 50, 51, 52 (clone 07)
10	41, 42, 43, 44 (clone 11)
11	53, 54, 55, 56 (clone110-A); 73, 74, 75, 76 (clone 110-B)
12	57, 58, 59, 60 (clone 45)
13	61, 62, 63, 64 (clone 46)
14	65, 66, 67, 68 (clone 36)
15	69, 70, 71, 72 (clone 109-A)
16	21(repetição I, clone 104-A)

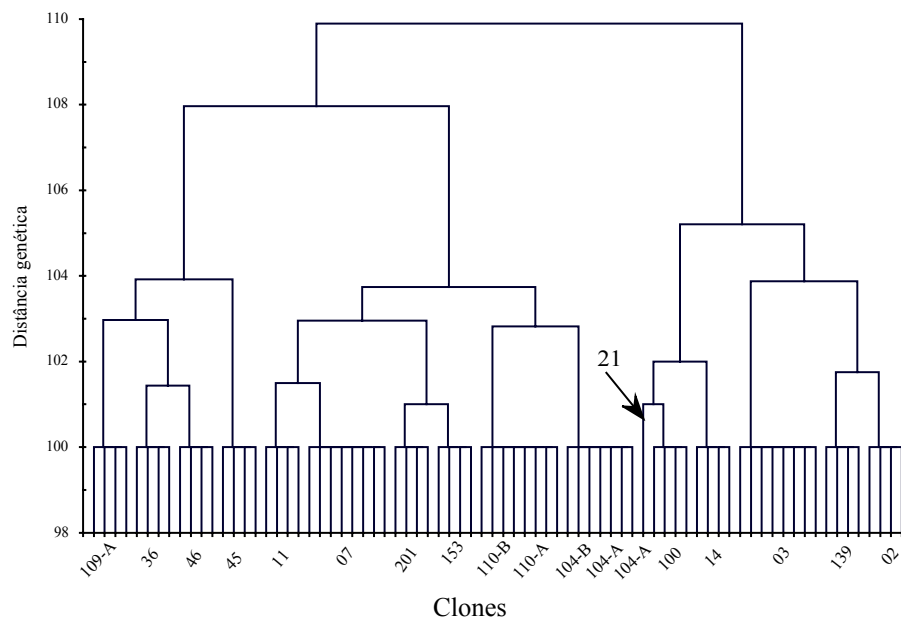


Figura 6 - Dendrograma representando distâncias genéticas, estimadas entre 76 indivíduos de 19 clones de *Coffea canephora* var. Conillon e baseadas em 29 marcadores polimórficos RAPD, gerados por 14 “primers” de 10 oligonucleotídeos.

O indivíduo 21, correspondente à primeira repetição do clone 104-A, formou um grupo isolado, conforme observado pelo método de agrupamento (Quadro 10). Essa diferença foi causada por nove “loci” polimórficos, com presença de bandas na planta 21 e ausência nas demais repetições, e por um locus com presença de banda na planta 21, porém ausentes nos demais indivíduos desse clone. Sugere-se a hipótese de que essa planta seja oriunda de uma quimera setorial do clone 104-A.

RAPD é uma técnica muito eficaz na identificação de espécies e de variedades, na análise de parentesco e no mapeamento genético. Ela tem sido muito útil em cafeeiros, no estudo de diversidade genética, como demonstram os trabalhos de OROZCO-CASTILLO et al. (1994, 1996) e o LASHERMES et al.

(1996a), assim como na construção de mapa genético para *C. canephora* (PAILLARI et al., 1996).

Os resultados desse experimento mostram a diversidade entre os clones da variedade Conillon e a homogeneidade intraclones dessa variedade, não demonstrando variação somaclonal ou misturas de plantas, com exceção do clone 104-A. Porém, a variação nos tipos de reações apresentados, quando inoculados com as raças de *H. vastatrix*, pode ser causada por genes não ligados a esses marcadores, localizados em regiões não amplificadas do genoma.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Estabeleceu-se em Catuaí Vermelho linhagem UFV 2144 de *C. arabica*, 139 culturas de *H. vastatrix*, procedentes de alguns municípios dos estados do Espírito Santo e Minas Gerais, obtidas, no período de 1995 a 1997, em cafeeiros da espécie *Coffea canephora* e *Coffea arabica*. Para a identificação de raças fisiológicas do patógeno, essas culturas foram inoculadas em clones diferenciadores, obtidos no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro, em Portugal, mantidos no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, empregando-se escala de avaliação recomendada por D'OLIVEIRA (1954, 1957). A raça II prevaleceu em 137 culturas, sendo que, em duas culturas procedentes dos municípios de Coimbra e Viçosa, em 1995, constatou-se a raça fisiológica III.

Foram avaliados, quanto aos tipos de reação às raças I, II, III e XIII de *H. vastatrix*, 33 clones de *Coffea canephora* componentes de variedades clonais, sendo nove com ciclo de maturação precoce da variedade 'EMCAPA 8111' (02, 03, 26, 29, 36, 104-A, 104-B, 110-B e 154); 13 com ciclo de maturação médio da variedade 'EMCAPA 8121' (07, 11, 14, 16, 19, 109-A, 110-A, 112, 120, 128, 132, 149 e 201), e 11 de ciclo de maturação tardio da variedade 'EMCAPA 8131' (31, 45, 46, 49, 99, 100, 106, 116, 139, 143 e 153). Empregou-se escala de graus de doença de 1 a 6, adaptada por TAMAYO (1998), em que graus médios de

doença menores que 4, correspondem à resistência e maiores ou iguais a 4 correspondem à suscetibilidade. Utilizou-se o intervalo de confiança do grau médio de doença como medida de estabilidade de reação dos clones em relação às raças inoculadas. Os resultados mostraram que as três variedades clonais são constituídas por clones resistentes e suscetíveis às quatro raças de *H. vastatrix*. Os clones 132, 149, 201 (ciclo intermediário), 100 e 143 (ciclo tardio) mostraram reação de resistência às quatro raças do patógeno, enquanto que os clones 110-B (ciclo precoce), 110-A, 112 (ciclo intermediário), 31, 45, 106 e 116 (ciclo tardio) mostraram reação de suscetibilidade.

Observou-se que alguns clones apresentavam reação de resistência e suscetibilidade, diferenciado entre as repetições de cada tratamento, quando inoculados com as raças fisiológicas I, II, III e XIII, confirmada após três repetições do ensaio. Portanto, o presente ensaio foi proposto com o objetivo de verificar a variabilidade genética inter e intraclones da var. Conillon, por meio de marcadores RAPD.

Avaliou-se as quatro repetições de 12 clones (02, 139, 03, 07, 11, 14, 100, 104-A, 104-B, 110-A, 153 e 201) que apresentaram variabilidade de reação a *H. vastatrix*, sendo avaliados oito indivíduos dos clones 03 e 07, em função da variabilidade observada, quando inoculados com as raças II e III, e III e XIII, respectivamente. Selecionou-se também, cinco clones (36, 45, 46, 109-A, 110-B), que apresentaram reação uniforme quando inoculados com as quatro raças do patógeno, totalizando 76 indivíduos. Pelo método de agrupamento de Tocher, os 76 indivíduos formaram 16 grupos. As quatro repetições de cada clone formaram grupos distintos, porém, o indivíduo 21, correspondente à repetição I do clone 104-A, formou isoladamente o grupo 16, mostrando-se divergente dos demais. Os clones 104-A e 104-B formaram um grupo, assim como os clones 110-A e 110-B, outro grupo, indicando que são muito próximos geneticamente. Os 'primers' utilizados não foram capazes de detectar diferenças entre os clones quando se considera o ciclo de maturação, da mesma forma que não foi possível confirmar diferenças intraclones observadas, quando inoculados com as raças do patógeno.

Pode-se concluir, neste trabalho, que no estado do Espírito Santo e Minas Gerais, no período de 1995 a 1997, houve predominância da raça II de *H. vastatrix* em *C. canephora* var. Conillon e *C. arabica*, nas regiões amostradas.

Os clones que compõem as variedades clonais EMCAPA 8111, EMCAPA 8121 e EMCAPA 8131, são constituídas por clones suscetíveis e resistentes às raças I, II, III e XIII de *H. vastatrix*. Os resultados do presente indicam que a variedade Conillon, cultivada no estado do Espírito Santo, é portadora do gene S_H5.

Por meio de marcadores RAPD, não foi possível detectar diferenças intraclones da variedade Conillon que apresentaram instabilidade de reações a *H. vastatrix*. Da mesma forma, não foi possível diferenciar clones de diferentes ciclos de maturação.

A resistência de clones da variedade Conillon à ferrugem do cafeeiro deve ser estudada mais detalhadamente, com vistas à obtenção de clones com maior nível e durabilidade de resistência a *H. vastatrix*. A continuidade de estudos nesta linha de pesquisa é de fundamental importância para a elucidação desse fenômeno de variabilidade de reação dos clones de cafeeiros da var. Conillon. Um maior número de “primers” e de clones deve ser utilizado em estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. S. **Resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros descendentes do híbrido de Timor.** Viçosa: UFV, 1988. 68p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- ALFONSI, R.R., ORTOLANI e FIGUEIREDO, P. Condições climáticas e níveis de infecção da ferrugem do cafeeiro em *C. arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 5, 1977, Guarapari, ES. **Resumos...** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro do Café, 1977. p.108-109.
- ANDRADE NETO, A.P.M., BRAGANÇA, S.M., FONSECA, A.F.A., SARAIVA, J.S.T. Variedades. In: COSTA, E.B., COSTA, E.B. da, SILVA, A.E.S. da, ANDRADE NETO, A.P.M., DAHER, F.A. de (eds.). **Manual técnico para a cultura do café no estado do Espírito Santo.** Vitória, ES: SEAG, ES, 1995. p.15-41.
- BETTENCOURT, A.J., CARVALHO, A. Melhoramento visando a resistência do cafeeiro à ferrugem. **Bragantia**, v.27, n.4, p.35-68, 1968.
- BETTENCOURT, A.J. Características agronômicas de seleções derivadas de cruzamentos entre híbridos de timor e as variedades Caturra, Villa Sarchi e Catuaí. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEIRO, 1983, Oeiras. **Trabalhos...** Oeiras, Portugal, 1983. p.353-373.
- BETTENCOURT, A.J. **Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de fatores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L.** Lisboa: Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro, CIFC/IICT, 1981. 93p.

- BETTENCOURT, A.J., LOPES, J. Fatores genéticos que condicionam a resistência do híbrido de Timor à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. In: COLOQUIO ASSOCIATION SCIENTIFIQUE INTERNATIONALE DU CAFE, 10, 1982, Salvador. **Resumos...** Salvador: 1982. p.56.
- BETTENCOURT, A.J., RODRIGUES JR., C. J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. In: CLARKE, R.J., MACRAE, R. (Eds.). **Coffee**. Londres: Elsevier Applied Science. Agronomy, v.4, p.199-234, 1988.
- BETTENCOURT, A.J., NORONHA,-WAGNER, M., LOPES, J. Fator genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (híbrido de Timor) a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. **Broteria Genética**, v.1, p.53-58, 1980.
- BETTENCOURT, A.J., NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. **Agronomia Lusit.**, v.31, p.285-292, 1971.
- BRAGANÇA, S.M., FONSECA, A.F.A., SILVEIRA, J.S.M., FERRÃO, R.G., CARVALHO, C.H.S. **EMCAPA 8111, EMCAPA 8121, EMCAPA 8131. Primeiras variedades clonais de café conillon lançadas para o Espírito Santo**. Vitória, ES: EMCAPA, 1993. (Comunicado técnico, 68).
- CADENA-GÓMEZ, G., BURITICÁ-CÉSPEDES, P. Expresion de resistencia horizontal a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) en *Coffea canephora* variedad Conilon. **CENICAFÉ - Centro Nacional de Investigaciones de Café**, v.31, p.3-27. 1980.
- CARDOSO, R.M.L. **Novas raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no Brasil, Métodos de identificação, e detecção de grupos fisiológicos em cafeeiros derivados do híbrido de Timor**. Viçosa: UFV, 1986. 102p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1986.
- CARDOSO, R.M.L., ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. coletada do germoplasma de *Coffea arabica* L. no estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Bras.**, v.13, p.343-346. 1988.
- CARVALHO, A., MÔNACO, L.C. Melhoramento do cafeeiro visando a resistência à ferrugem alaranjada. **Ciência e Cultura**, v.23, n.2, p.141-146, 1971.
- CARVALHO, C.H.S., BRAGANÇA, S.M. **Seleção de clones de café Conillon (*Coffea canephora*) para o estado do Espírito Santo**. Vitória, ES: EMCAPA, 1990. (Pesquisa em andamento, 56).

- CHAVES, G.M. Melhoramento do cafeeiro visando a obtenção de cultivares resistentes a *Hemileia vastatrix* Berk. e Br. **R. Ceres**, v.23, p.321-332, 1976.
- CHAVES, G.M., PEREIRA, A.A. Identificação de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. In: EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. **Resumos de trabalhos realizados pelo Sistema Estadual de Pesquisas Agropecuárias**. Belo Horizonte: 1980. p.170-74.
- CHIACHIO, F.P.B. **Identificação de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., em materiais provenientes dos estados da Bahia e Espírito Santo**. Viçosa: UFV, 1973. 49p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1973.
- COUTINHO, T.A., RIJKENBERG, F.H.J., VAN ASCH, M.A.J. Teliospores of *Hemileia vastatrix*. **Mycol. Res.**, v.99, p.932-934, 1995.
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1994. p.302.
- DOENÇAS do cafeeiro. In: **CULTURA do café**: manual de recomendações. 4. ed. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1981. (Boletim, 4).
- D'OLIVEIRA, B. As ferrugens do cafeeiro. Oeiras, Junta de Investigações do Ultramar, CIFIC, s.d., 61p. **Separata da Revista do Café Português**, v.1, n.4, p.5-12; v.2, n.5, p.5-13; v.2, n.6, p.5-13; v.2, n.7, p.9-17; v.2, n.80, p.5-22; v.4, n.16, p.5-15; 1954-1957. (Separata 3).
- D'OLIVEIRA, B., RODRIGUES JR., C. O problema das ferrugens do cafeeiro. **Revista do Café Português**, v.8, p.5-50. 1961.
- ESKES, A.B. Resistance. In: KUSHALAPPA, A.C., ESKES, A.B. (Eds.). **Coffee rust: epidemiology, Resistance and management**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.171-291.
- ESKES, A.B. Characterization of incomplete resistance to *Hemileia vastatrix* in *Coffea canephora* cv Kouillon. **Euphytica**, v.32, p.639-648, 1983.
- FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**. New York: MacMillan Publishing, 1987. 526p.
- FERRÃO, R.G., FONSECA, A.F.A., FERRÃO, M.A.G. Programa de melhoramento genético de café robusta no Brasil. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS - GENÉTICA E MELHORAMENTO DO CAFEEIRO, 3, 1999. **Anais...** Lavras: 1999. p.50-65.

- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v.32, p.653-669, 1942.
- FLOR, H.H. Host parasite interaction in flax-rust, its genetic and other implications. **Phytopathology**, v.45, p.680-685, 1955.
- FONSECA, A.F. Propagação assexuada de *Coffea canephora* no estado do Espírito Santo. In: WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS. PAIVA, R. (Ed.). Lavras: UFLA, 1996. p.31-34.
- FONSECA, S.E.A. **Resistência não-específica em cultivares de *Coffea arabica* L. e progênies de “Catimor” a raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.** Viçosa: UFV, 1979. 42p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1979.
- FRY, W.E. **Principles of plant disease management**. New York: Accademic Press, 1982. 378p.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 11. ed. Piracicaba: ESALQ, 1985. 446p.
- HOLGUIN, F., BIEYSSE, D., ESKES, A., MULLER, R. Étude de la virulence et de l'agressivité d'isolats d'*Hemileia vastatrix* Berk. et Br. collectés sur *Coffea canephora* et Catimor. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR DE CAFÉ, 5, 1993, Montpellier. **Colloque...** Montpellier: 1993. p.281-292.
- LASHERMES, P., COUTURON, E., CHARRIER, A. Doubled haploids of *Coffea canephora*: development, fertility and agronomic characteristics. **Euphytica**, v.74, n.1/2, p.149-157. 1994.
- LASHERMES, P., TROUSLOT, P., ANTHONY, F., COMBES, M.C., CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, v.87, p.59-64. 1996a.
- LASHERMES, P., COUTURON, E., MOREAU, N., PAILLARD, M., LOUAN, J. Inheritance and genetic mapping of self incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.458-462, 1996b.

- LEROY, T., MONTAGNON, C., CILAS, C., YAPO, A., CHARMETANT, P.,
ESKES, A.B. Reciprocal recurrent selection applied to *coffea canephora*
Pierre. III. Genetic gains and results of first cycle intergroup crosses.
Euphytica, v.95, p.347-354, 1997.
- LOPES, J., GODINHO, I.L. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix*
Berk. et Br. **Garcia de Orta**, v.3, n.1/2, p.13-16, 1976.
- MALTA, M.M. Brasil - novo produtor de café robusta. In: SEMINÁRIO
INTERNACIONAL DE CAFÉ ROBUSTA, 1, 1986, Vitória, ES. **Anais...**
Vitória: SEAG, 1986. p.19-28.
- MATIELLO, J.B. **Café conillon**. Rio de Janeiro: MMA/SDR/PROCAFÉ/PNFC,
1998. 162p.
- MAYNE, W.W. **Annual Report of the Coffee Scientific Officer**. Mysore:
Coffee Experimental Station, 1936. 21p. (Bulletin 14).
- MAYNE, W.W. **Annual Report of the Coffee Scientific Officer**. Mysore:
Coffee Experimental Station, 1939. 16p. (Bulletin 19).
- MAYNE, W.W. Physiological specialization of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.
Nature, v.129, p.510, 1932.
- MÔNACO, L.C., RIBEIRO, I.J.A., SOBRINHO, A. Comportamento diferencial
de genótipos ao ataque da ferrugem das folhas do cafeeiro. **Ciência e
Cultura**, v.41, n.6, p.247, 1973. (Resumos).
- MONTAGNON, C., LEROY, T., KÉBÉ, I., ESKES, A.B. Importance de la
rouille orangée et facteurs impliqués dans l'évaluation de la résistance au
champ de *Coffea canephora* en Côte-D'Ivoire'. **Café-Cacao-Thé**, v.38, n.2,
p.103-112, 1994.
- NORONHA-WAGNER, M., BETTENCOURT, A.J. Genetic study of the
resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. 1. Identification and behavior of four
factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic
races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany**, v.45, p.220-224,
1967.
- OROZCO-CASTILLO, C., CHALMERS, K.J., POWELL, W., WAUGH, R.
RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within
the genus *Coffea*. **Plant Cell Reports**, v.15, p.337-341, 1996.
- OROZCO-CASTILLO, C., CHALMERS, K.J., WAUGH, R., POWELL, W.
Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using
RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.87, p.934-940, 1994.

- PAILLARD, M., LASHERMES, P., PÉTIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.41-47, 1996.
- PARLEVLIET, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance private. In: Resistência de plantas a doenças. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30, 1997, Poços de Caldas. **Palestras...** Poços de Caldas: 1997. p.7-15.
- PARLEVLIET, J.E. The multiline approach in cereals to rusts: aspects, problems and possibilities. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, v.39, n.1, p.22-29, 1979.
- PEREIRA, A.A. **Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor.** Viçosa: UFV, 1995. 66p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- REYS, T.T. Uma nova raça fisiológica de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. **Revista do Café Português**, v.4, n.16, p.12-15, 1957.
- RIBEIRO, I.J.A., SUGIMORI, M.H., MORAES, S.A., MÔNACO, L.C. Raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.1, p.19-22, 1975.
- ROBINSON, R.A. **Plant pathosystems.** Berlin: Springer Verlag, 1976. 184p.
- RODRIGUES JÚNIOR, C.J., BETTENCOURT, A.J., RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.13, p.49-70, 1975.
- RODRIGUES JÚNIOR., C.J. Coffee rusts: History, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, p.5-9, 1990.
- RODRIGUES JÚNIOR., C.J., RIJO, L., MEDEIROS, E.F. Germinação anômala dos uredósporos de *Hemileia vastatrix*, o agente causal da ferrugem alaranjada do cafeeiro. **Garcia de Orta**, Sér. Est. Agron., v.7, p.17-20, 1980.
- SCHIEBER, E., ZENTMYER, G.A. Distribution and spread of coffee rust in Latin America. In: FULTON, R.H. (ed.). **Coffee rust in the Americas.** New York: 1984. p.1-14.
- SERA, T., CARDOSO, R.M.L., ANDROCIOLI FILHO, A. Melhoramento do cafeeiro para resistência à ferrugem *Hemileia vastatrix* nas progênes derivadas do cruzamento entre cultivares de *Coffea arabica* e o híbrido de Timor, no estado de Paraná, Brasil. In: SIMOPOSIÓ SOBRE FERRUGENS DO CAFEIEIRO, 1984, Oeiras, Portugal. **Anais...** Portugal: 1983. p.409-413.

- TAMAYO, P.J. **Resistência de progênies de Catimor a oito raças de *Hemileia vastatrix* Berk et Br.** Viçosa: UFV, 1988. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- TEIXEIRA, T.A. Fingerprint of coffee tree differential hosts of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 3, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina:, 1999. p.75.
- van der PLANK, J.E. Horizontal and vertical resistance. In: van der PLANK, J.E. **Disease resistance in plants.** 2.ed. New York: INC, 1984. 194-206p.
- WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, L.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Uromyces phaseoli typica* Arthur. **Experientiae**, v.17, n.7, p.151-184, 1974.
- ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., PEREIRA, A.A., CHAVES, G.M. Café. In: VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas.** Viçosa: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília, DF, 1997. p.83-179.

APÊNDICE

APÊNDICE

Quadro 1A - Média, desvio-padrão e intervalo de confiança de graus de doença, de 33 clones de *C. canephora* var. Conillon e linhagem LCH 2077-2-5-44 de Catuaí Vermelho de *C. arabica*, quando inoculados com a raça I de *H. vastratrix*

Clones	Repetições				Média	Desvio-padrão	Limites	
	I	II	III	IV			Inferior	Superior
2	4	4	3	4	3,75	0,50	2,96	4,55
3	2	2	2	2	2	0,00	2,00	2,00
7	5	4	5	6	5	0,82	3,70	6,30
11	3	2	3	3	2,75	0,50	1,96	3,55
14	2	2	2	2	2	0,00	2,00	2,00
16	2	3	3	3	2,75	0,50	1,96	3,55
19	2	1	1	2	1,5	0,58	0,58	2,42
26	1	1	3	2	1,75	0,96	0,23	3,27
29	3	3	2	2	2,5	0,58	1,58	3,42
31	5	4	4	5	4,5	0,58	3,58	5,42
36	2	2	2	2	2	0,00	2,00	2,00
45	4	4	5	4	4,25	0,50	3,46	5,05
46	4	5	4	5	4,5	0,58	3,58	5,42
49	1	1	1	3	1,5	1,00	-0,09	3,09
99	2	2	3	3	2,5	0,58	1,58	3,42
100	1	2	1	2	1,5	0,58	0,58	2,42
104-A	3	3	2	3	2,75	0,50	1,96	3,55
104-B	3	3	3	2	2,75	0,50	1,96	3,55
106	5	4	5	6	5	0,82	3,70	6,30
109-A	1	1	1	1	1	0,00	1,00	1,00
110-A	4	4	4	4	4	0,00	4,00	4,00
110-B	5	5	4	5	4,75	0,50	3,96	5,55
112	5	5	5	5	5	0,00	5,00	5,00
116	5	5	4	4	4,5	0,58	3,58	5,42
120	5	5	4	4	4,5	0,58	3,58	5,42
128	1	1	1	1	1	0,00	1,00	1,00
132	1	1	2	1	1,25	0,50	0,46	2,05
139	3	3	5	1	3	1,63	0,40	5,60
143	2	1	2	3	2	0,82	0,70	3,30
149	2	2	3	3	2,5	0,58	1,58	3,42
153	4	4	4	4	4	0,00	4,00	4,00
154	3	2	2	3	2,5	0,58	1,58	3,42
201	3	2	2	2	2,25	0,50	1,46	3,05
Catuaí	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00

Quadro 2A - Média, desvio-padrão e intervalo de confiança de graus de doença, de 33 clones de *C. canephora* var. Conillon e linhagem LCH 2077-2-5-44 de Catuaí Vermelho de *C. arabica*, quando inoculados com a raça II de *H. vastratrix*

Clones	Repetições				Média	Desvio-padrão	Limites	
	I	II	III	IV			Inferior	Superior
2	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
3	3	3	3	4	3,25	0,50	2,46	4,05
7	3	6	6	6	5,25	1,50	2,87	7,64
11	6	6	3	6	5,25	1,50	2,87	7,64
14	3	6	3	4	4	1,41	1,75	6,25
16	4	4	6	6	5	1,15	3,16	6,84
19	6	6	5	6	5,75	0,50	4,96	6,55
26	3	3	3	3	3	0,00	3,00	3,00
29	6	6	5	6	5,75	0,50	4,96	6,55
31	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
36	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
45	4	4	4	4	4	0,00	4,00	4,00
46	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
49	4	4	6	6	5	1,15	3,16	6,84
99	4	6	6	6	5,5	1,00	3,91	7,09
100	2	3	4	3	3	0,82	1,70	4,30
104-A	5	4	3	6	4,5	1,29	2,45	6,55
104-B	3	3	1	3	2,5	1,00	0,91	4,09
106	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
109-A	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
110-A	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
110-B	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
112	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
116	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
120	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
128	4	4	5	4	4,25	0,50	3,46	5,05
132	3	3	3	3	3	0,00	3,00	3,00
139	6	5	5	5	5,25	0,50	4,46	6,05
143	3	3	3	3	3	0,00	3,00	3,00
149	3	3	3	3	3	0,00	3,00	3,00
153	4	4	1	6	3,75	2,06	0,47	7,03
154	3	3	3	3	3	0,00	3,00	3,00
201	3	3	4	3	3,25	0,50	2,46	4,05
Catuaí	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00

Quadro 3A - Média, desvio-padrão e intervalo de confiança de graus de doença, de 33 clones de *C. canephora* var. Conillon e linhagem LCH 2077-2-5-44 de Catuaí Vermelho de *C. arabica*, quando inoculados com a raça III de *H. vastratrix*

Clones	Repetições				Média	Desvio-padrão	Limites	
	I	II	III	IV			Inferior	Superior
2	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
3	5	6	6	3	5	1,41	2,75	7,25
7	3	5	5	5	4,5	1,00	2,91	6,09
11	5	3	5	5	4,5	1,00	2,91	6,09
14	6	5	6	6	5,75	0,50	4,96	6,55
16	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
19	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
26	5	5	5	5	5	0,00	5,00	5,00
29	4	4	6	6	5	1,15	3,16	6,84
31	5	5	6	6	5,5	0,58	4,58	6,42
36	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
45	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
46	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
49	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
99	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
100	1	3	1	3	2	1,15	0,16	3,84
104-A	4	6	6	6	5,5	1,00	3,91	7,09
104-B	3	6	3	6	4,5	1,73	1,75	7,25
106	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
109-A	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
110-A	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
110-B	6	6	5	6	5,75	0,50	4,96	6,55
112	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
116	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
120	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
128	5	5	5	5	5	0,00	5,00	5,00
132	1	2	1	2	1,5	0,58	0,58	2,42
139	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00
143	3	2	2	2	2,25	0,50	1,46	3,05
149	3	3	3	3	3	0,00	3,00	3,00
153	5	5	5	5	5	0,00	5,00	5,00
154	3	3	3	3	3	0,00	3,00	3,00
201	1	1	2	3	1,75	0,96	0,23	3,27
Catuaí	6	6	6	6	6	0,00	6,00	6,00

Quadro 4A - Média, desvio-padrão e intervalo de confiança de graus de doença, de 33 clones de *C. canephora* var. Conillon e linhagem LCH 2077-2-5-44 de Catuaí Vermelho de *C. arabica*, quando inoculados com a raça XIII de *H. vastratrix*

Clones	Repetições				Média	Desvio-padrão	Limites	
	I	II	III	IV			Inferior	Superior
2	5	5	4	4	4,5	0,58	3,58	5,42
3	1	2	2	2	1,75	0,50	0,96	2,55
7	4	2	1	2	2,25	1,26	0,25	4,25
11	4	4	4	4	4	0,00	4,00	4,00
14	6	4	4	4	4,5	1,00	2,91	6,09
16	4	4	4	4	4	0,00	4,00	4,00
19	6	5	4	4	4,75	0,96	3,23	6,27
26	1	1	1	1	1	0,00	1,00	1,00
29	3	2	2	1	2	0,82	0,70	3,30
31	4	6	6	4	5	1,15	3,16	6,84
36	1	1	1	1	1	0,00	1,00	1,00
45	4	5	5	5	4,75	0,50	3,96	5,55
46	1	2	2	2	1,75	0,50	0,96	2,55
49	4	4	6	6	5	1,15	3,16	6,84
99	4	4	4	4	4	0,00	4,00	4,00
100	1	1	1	1	1	0,00	1,00	1,00
104-A	2	3	2	3	2,5	0,58	1,58	3,42
104-B	2	1	1	3	1,75	0,96	0,23	3,27
106	4	5	4	5	4,5	0,58	3,58	5,42
109-A	6	5	5	5	5,25	0,50	4,46	6,05
110-A	3	4	4	6	4,25	1,26	2,25	6,25
110-B	4	4	4	4	4	0,00	4,00	4,00
112	6	5	5	6	5,5	0,58	4,58	6,42
116	4	4	5	4	4,25	0,50	3,46	5,05
120	6	5	4	4	4,75	0,96	3,23	6,27
128	3	1	2	2	2	0,82	0,70	3,30
132	2	1	2	1	1,5	0,58	0,58	2,42
139	3	3	2	3	2,75	0,50	1,96	3,55
143	3	3	3	3	3	0,00	3,00	3,00
149	1	2	1	2	1,5	0,58	0,58	2,42
153	4	4	4	4	4	0,00	4,00	4,00
154	1	1	1	1	1	0,00	1,00	1,00
201	1	1	1	1	1	0,00	1,00	1,00
Catuaí	5	5	5	6	5,25	0,50	4,46	6,05