

SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE PROGÊNIES DE RETROCRUZAMENTO E O GENITOR RECORRENTE COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES*

Antonio Carlos Baião de Oliveira¹ (baiao@iac.sp.gov.br), Ney Sussumu Sakiyama², Júlio César Mistro¹, Gerson Silva Giomo¹ e Luiz Carlos Fazuoli¹

¹APTA-Instituto Agrônomo de Campinas/Centro de Café 'Alcides Carvalho', ²Universidade Federal de Viçosa/Dep. Fitotecnica

Resumo

Este trabalho teve como principal objetivo utilizar a informação de 136 marcadores RAPD para identificar, em uma progênie de retrocruzamento, as plantas resistentes à ferrugem que apresentassem maior proporção do genoma do genitor recorrente. Utilizou-se uma população segregante RC₁ derivada do cruzamento entre uma linhagem do Híbrido de Timor e o 'Catuaí Amarelo IAC 30', este utilizado como genitor recorrente. As plantas RC₁ e os genitores foram inoculados com a raça II de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., para caracterizar fenotipicamente os indivíduos quanto a resistência/susceptibilidade a essa raça. Técnicas de análise multivariada foram empregadas para agrupar os indivíduos da população segregante e identificar aqueles mais semelhantes geneticamente ao genitor recorrente. Três plantas RC₁ resistentes à raça II de *H. vastatrix* e com similaridade genética ao 'Catuaí', muito acima da média esperada para o primeiro retrocruzamento, foram selecionadas para integrar os próximos ciclos de retrocruzamentos. Esses resultados indicaram a eficiência dos procedimentos adotados em identificar, na progênie, os genótipos com maior recuperação de genoma do genitor recorrente.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, seleção assistida, RAPD, resistência à ferrugem, análise multivariada

GENETIC SIMILARITY AMONG BACKCROSS OFFSPRING AND RECURRENT PARENT BASED MOLECULAR MARKERS

Abstract:

In this study, 136 RAPD markers were used to identify in a backcross offspring the rust resistant plants with the largest proportion of the recurrent parent genotype. A segregant RC₁ population, derived by crossing between one Híbrido de Timor line and Catuaí Amarelo IAC 30 cultivar, was used. This last one was the recurrent parent. RC₁ plants and parents were inoculated with the race II of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., and was made the individual phenotypic characterization regarding the resistance to that race. Multivariate analysis techniques were used to clustering each plant of the segregant population and to identify those plants with larger genetic similarity with the recurrent parent. Three BC₁ resistant plants to the *H. vastatrix* race II and exhibiting high ratio of recurrent parent genotype ('Catuaí'), above the expected average for BC₁ offsprings, were selected to integrate the next backcrosses cycles. These results indicated that the adopted procedures were efficient to identify in the progeny those genotypes with larger recovery of recurrent parent genome.

Key words: *Coffea arabica*, assisted selection, RAPD, rust resistance, multivariate analysis

Introdução

A introgressão de características de interesse econômico, de germoplasma exótico ou pouco trabalhado do ponto de vista agrônomo, para linhagens ou cultivares elites é preocupação quase constante dos melhoristas, responsáveis pelos vários programas de melhoramento genético vegetal, espalhados pelo mundo. Esta preocupação torna-se ainda maior, quando se trata da incorporação de resistência a moléstias, como a ferrugem alaranjada do cafeeiro. Esta doença é causada por um fungo (*Hemileia vastatrix* Berk. Et Br.) altamente agressivo e que desenvolve, com frequência, novas raças fisiológicas, que passam a atacar os materiais genéticos até então considerados resistentes (Várzea et al., 2002). Além disso, as principais cultivares de café plantadas no Brasil são completamente susceptíveis à ferrugem.

O método dos retrocruzamentos é um dos mais utilizados para transferir determinada característica para materiais elites, com o objetivo de corrigir algum "defeito" nestes, especialmente, quando a característica a ser transferida é de alta herdabilidade. O tamanho populacional necessário, neste método, deve ser tanto maior quanto maior o número de genes que se almeja transferir. Entretanto, o método se torna complexo para transferência de características quantitativas (Borém, 2001).

A proporção de genes do genitor doador é reduzida à metade após cada geração de retrocruzamentos. Conseqüentemente, a recuperação do genoma do genitor recorrente aumenta proporcionalmente a cada novo retrocruzamento. Assim, após seis gerações a recuperação esperada é de aproximadamente 99,0%. É importante ressaltar

*Trabalho parcialmente financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Cafê)

que este é um valor médio de recuperação, já que a cada geração há uma variação entre os indivíduos quanto ao número de genes do genitor recorrente que eles possuem. Neste contexto, o surgimento da tecnologia dos marcadores moleculares abriu oportunidades de se utilizar as informações geradas por essa tecnologia para favorecer a seleção, visto que esses marcadores permitem a identificação precisa dos indivíduos da população segregante, que são mais próximos geneticamente ao genitor recorrente em uma progênie de retrocruzamento. Os marcadores moleculares têm sido utilizados em vários programas de retrocruzamento, como em tomate (Yong e Tanksley, 1989), arroz (Ahmadi et al., 2001) e milho (Armstrong et al., 1992).

Este trabalho se propôs a estimar a similaridade genética entre plantas de uma progênie de retrocruzamentos e o genitor recorrente de um cruzamento original entre uma cultivar comercial de café e um material com baixa adaptação. O estudo objetivou também identificar na população segregante os indivíduos com a maior proporção do genitor recorrente (cultivar comercial) e que continham a característica de interesse, derivada do genitor doador, neste caso, resistência à ferrugem.

Material e Métodos

O material vegetal utilizado neste estudo foi composto por uma população segregante RC₁ de 59 plantas, oriunda do cruzamento entre uma linhagem do Híbrido de Timor, registrada com o número UFV 445-46, que é resistente à ferrugem, e o cultivar comercial Catuai Amarelo IAC 30, este usado como recorrente, o qual é susceptível à referida doença.

As plantas da progênie RC₁ e dos genitores foram genotipadas com 136 marcadores RAPD polimórficos, após a triagem com 1200 *primers* oligonucleotídeos de 10 bases da *Operon Technologies* (Kits OPA-OPZ, OPAA-OPAZ e OPBA-OPBH). Foi aproveitado apenas o polimorfismo em que a banda estava presente no genitor doador (Híbrido de Timor) e ausente no recorrente ('Catuai'). Este procedimento foi adotado para permitir a distinção das plantas com e sem a presença da marca, em razão do RAPD ser um marcador dominante. Para análise dos dados, foi gerada uma matriz a partir dos marcadores RAPD obtidos, atribuindo-se os escores 1 para presença da banda (genótipo heterozigoto) e 0 para ausência da banda (genótipo homozigoto recessivo). A matriz de dissimilaridade genética entre os indivíduos da progênie RC₁ e o 'Catuai' foi obtida a partir do complemento aritmético do índice de Jaccard, que foi utilizada para avaliar a diversidade genética entre esses genótipos, pelos métodos de agrupamento hierárquico do vizinho mais próximo (*Single Linkage*) e projeção das distâncias no plano cartesiano (Cruz et al., 2004). Os dados foram analisados no aplicativo computacional GENES (Cruz, 2001).

As plantas da população segregante RC₁ e dos genitores foram inoculadas com esporos da raça II de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., visando a caracterização fenotípica dessas plantas quanto à resistência à ferrugem. A técnica utilizada foi a de inoculação em discos de folhas, conforme descrito em Tamayo (1988).

As informações geradas foram utilizadas para identificar, na população segregante, as plantas com a maior proporção do genitor recorrente (Catuai) e resistentes à ferrugem, visando à seleção dessas plantas para integrar o próximo ciclo de retrocruzamento.

Resultados e Discussão

Os resultados da inoculação da população segregante RC₁, com esporos da raça II da ferrugem, revelaram a presença de graus variáveis de resistência/susceptibilidade dos indivíduos dentro da progênie. Foram observados desde plantas inteiramente resistentes (a maioria), que não exibiram nenhum sintoma da doença, até plantas (minoria) com alto grau de infestação, com esporulação intensa, assemelhando-se à testemunha susceptível (Catuai amarelo – IAC-30).

Dentre os 50 indivíduos da progênie RC₁ avaliada, classificados como resistentes à ferrugem, nas avaliações da inoculação, uma planta (20%) exibiu apenas 55% de recuperação do genitor recorrente ('Catuai'). Dez plantas recuperaram entre 62 e 65% do genoma de 'Catuai', doze plantas (24%) apresentaram 67 a 69% de bandas oriundas do genitor recorrente, enquanto a maioria das plantas resistentes, 16 (32%), recuperou entre 70 e 80% de genoma do 'Catuai' no primeiro retrocruzamento. Sete plantas (14%) apresentaram proporção de 81 a 85% do genoma do recorrente. No grupo das plantas que exibiram o maior percentual de recuperação do 'Catuai' estão uma (2%) com 88% e duas (4%) com 92% de genoma do genitor recorrente. A figura 1 ilustra uma amostra dessas plantas comparativamente ao 'Catuai'. Utilizando marcadores RAPD, Faleiro (1987) identificou três plantas resistentes à *Uromyces appendiculatus*, agente causador da ferrugem do feijoeiro, com percentual de recuperação do genitor recorrente muito acima da média populacional, em uma progênie do primeiro retrocruzamento.

As plantas susceptíveis à ferrugem da população RC₁ apresentaram percentuais de recuperação do genoma do Catuai em magnitudes acima de 72%, sendo que três dessas plantas apresentaram acima de 85% do genoma do genitor recorrente. Considerando-se as plantas como um todo, a maioria (36%) apresentou recuperação do genoma do recorrente entre 70 e 80%, que é a média esperada, na ausência de seleção (Fehr, 1987).

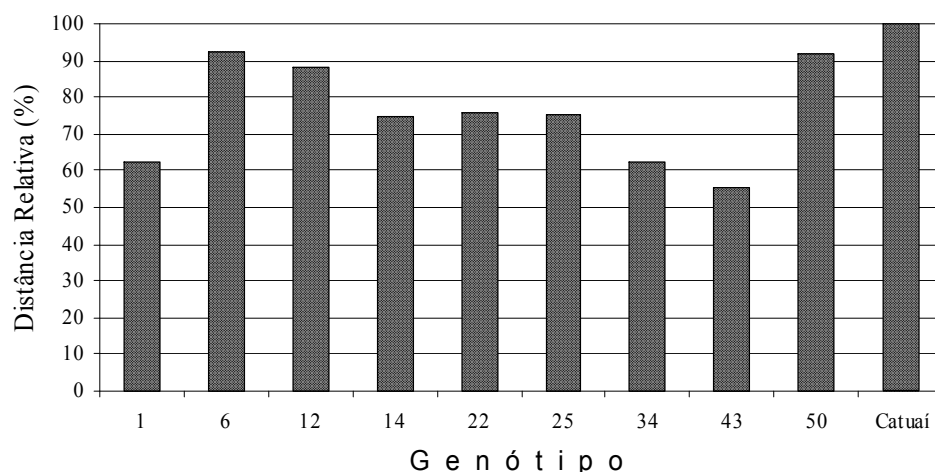


Figura 1. Distância genética relativa (%) de plantas de uma progênie RC₁, resistentes à raça II de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em relação ao genitor recorrente Catuaí Amarelo IAC 30, tendo como genitor doador dos genes de resistência o Híbrido de Timor UFV 445-46. As plantas 6, 12 e 50 foram selecionadas para integrar o próximo ciclo de retrocruzamento.

A figura 2 mostra um padrão de amplificação de fragmentos de DNA, de alguns indivíduos da população segregante RC₁, pela técnica RAPD, com o primer oligonucleotídeo OPA-17. A banda polimórfica, em destaque, é originária do genitor doador (Híbrido de Timor). Portanto, indivíduos com a presença da banda são mais próximos geneticamente desse genitor, enquanto, a ausência da banda denota indivíduos com maior proporção de genes do genitor recorrente ('Catuaí'). Esse tipo de abordagem foi adotado para todos os 136 marcadores polimórficos analisados, levando a conclusões seguras a respeito de quais indivíduos, dentro da população segregante, apresentavam maior proporção de genoma do genitor recorrente.

Em razão da grande similaridade fenotípica observada entre as plantas da população RC₁ avaliada neste trabalho, seria praticamente impossível identificar, nesta população, sem o suporte das informações de um grande número de marcadores neutros do ponto de vista fisiológico, como os marcadores de DNA, as plantas com maior proporção do genoma do cultivar comercial. Considerando que a média de recuperação do genoma de genitor recorrente no primeiro retrocruzamento é de 75,0%, pode-se atentar para a grande utilidade desse tipo de informação, como forma de acelerar a introgressão de genes de interesse, como no caso de genes condicionadores da resistência ao agente da ferrugem (*Hemileia vastatrix*), para cafeeiros arábicos.

A análise multivariada dos dados, empregando o coeficiente de similaridade de Jaccard, para gerar a matriz de distâncias genéticas, e a utilização de métodos de agrupamento, permitiu separar os indivíduos mais próximos geneticamente entre si e em relação ao genitor recorrente. Os métodos de agrupamento hierárquico do vizinho mais próximo (Figura 3) e projeção das distâncias no plano cartesiano (Figura 4) apresentaram basicamente os mesmos resultados e foram eficazes em indicar os indivíduos da população segregante mais próximos geneticamente do genitor recorrente. É importante ressaltar que o indivíduo número 33, que se localizou entre o grupo dos mais semelhantes ao 'Catuaí', apresentou susceptibilidade à raça II da ferrugem, nos testes de inoculação. Por isso, esse genótipo não foi selecionado para integrar os próximos ciclos de retrocruzamentos.

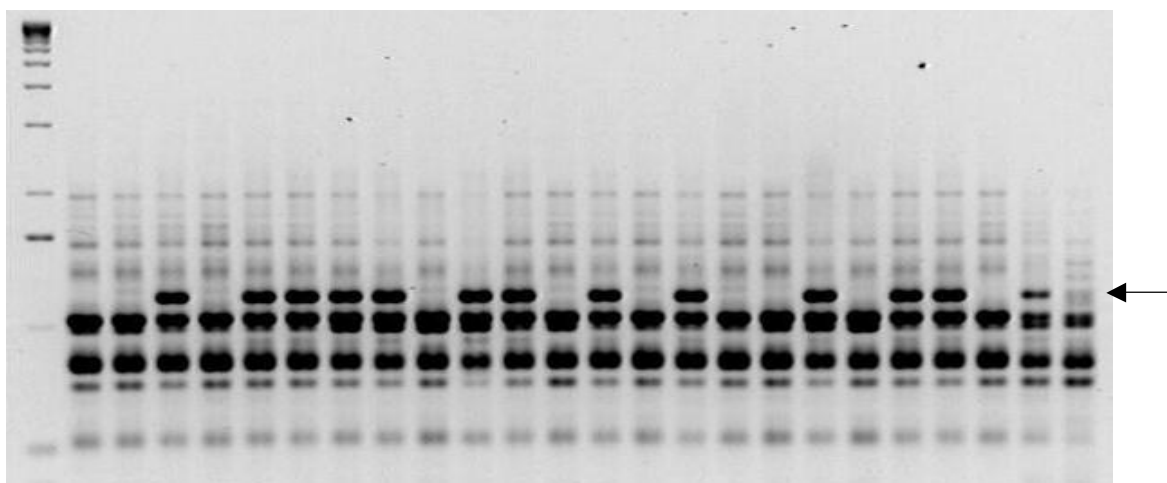


Figura 2. Exemplo da amplificação, pela técnica RAPD, de fragmentos de DNA genômico de uma progênie RC₁, oriunda do cruzamento entre 'Catuaí IAC 30' e uma linhagem do Híbrido de Timor (HT), com o primer de OPA-17. A primeira canaleta é um marcador de peso molecular. A seta mostra um marcador polimórfico, em que a banda foi originada do HT.

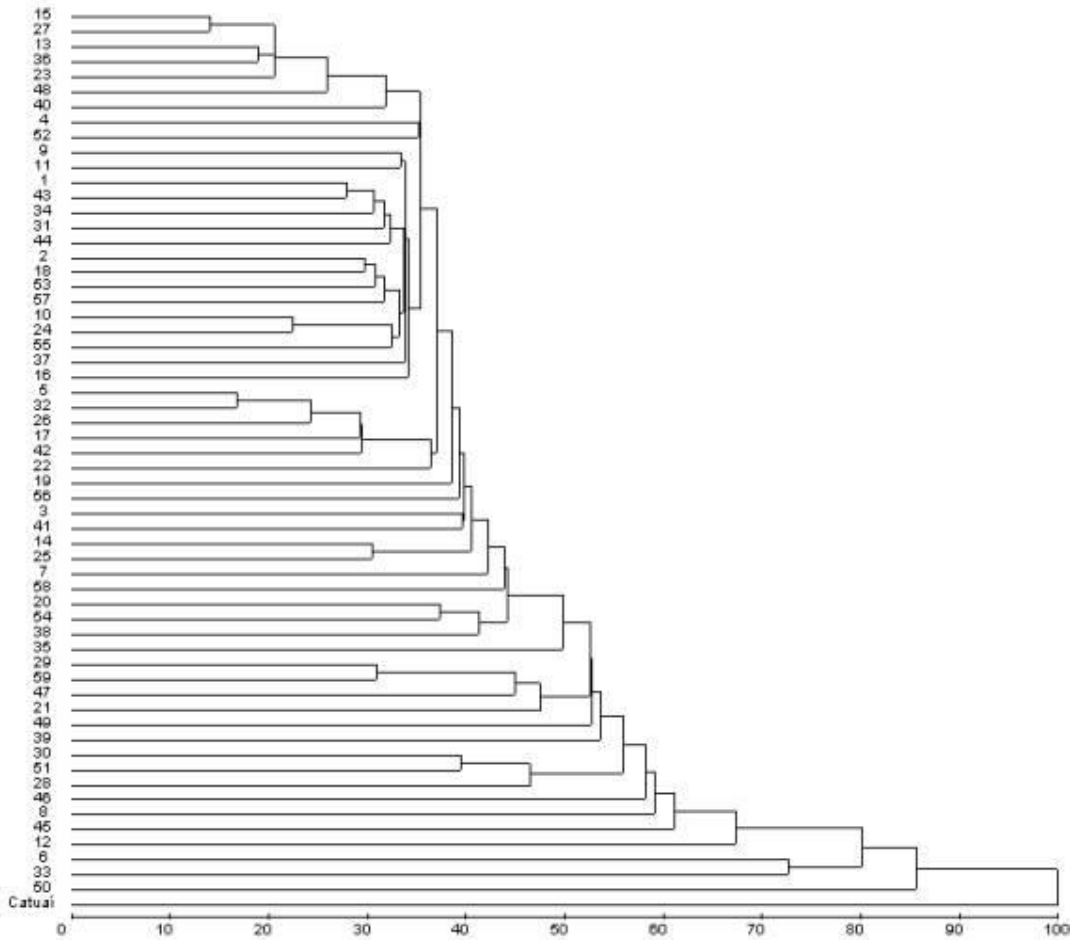


Figura 3. Dendrograma ilustrativo do padrão de similaridade entre o genitor recorrente ('Catuaí Amarelo IAC 30') e os 59 indivíduos da população segregante RC₁, obtido pelo método do vizinho mais próximo (*Single linkage*), com base na matriz de distâncias obtida do complemento aritmético do índice de Jaccard.

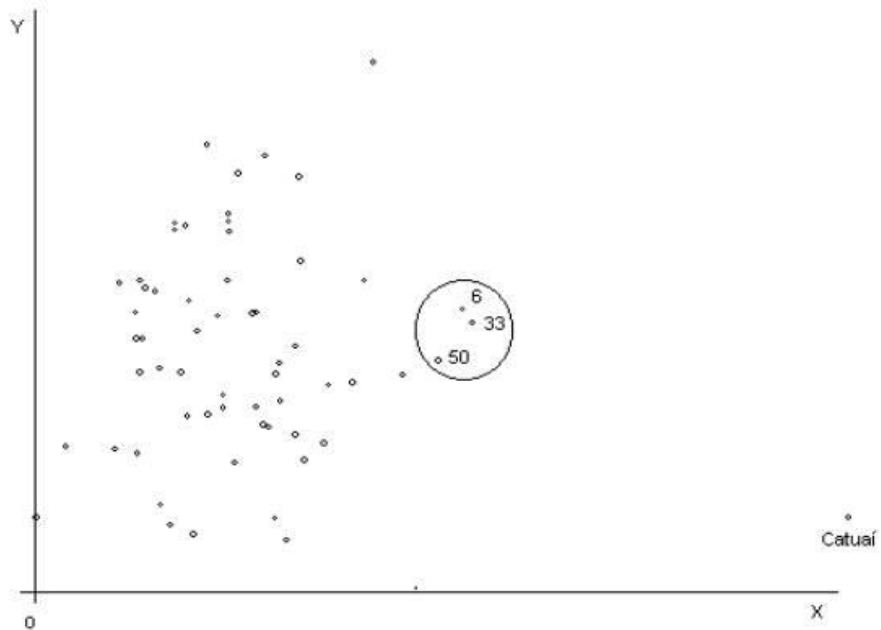


Figura 4. Projeção das distâncias genéticas no plano cartesiano dos 59 indivíduos da população segregante RC₁, em relação ao genitor recorrente ('Catuaí Amarelo IAC 30'), de acordo com a matriz de distâncias obtida do complemento aritmético do índice de Jaccard. Os indivíduos destacados são os de maior porcentagem de recuperação do 'Catuaí'.

Conclusões

- Os resultados do presente estudo permitiram concluir que os marcadores RAPD são ferramentas úteis como suporte para identificar, numa população de retrocruzamentos, os indivíduos contendo as maiores proporções de genoma do genitor recorrente;
- A utilização da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de retrocruzamentos, visando transferir resistência à ferrugem de um germoplasma pouco adaptado para cultivares comerciais, pode reduzir substancialmente o número de retrocruzamentos necessários.

Referências Bibliográficas

- Ahmadi N, Albar L, Pressoir G, Pinel A, Fargette D, Ghesquière A (2001) Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow motle virus. III. Analysis of QTL efficiency in introgressed progenies confirmed the hypothesis of complementary epistasis between two resistance *QTLs*. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 1084-1092.
- Armstrong GL, Romero-Severson J, Hodges TK (1992) Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 755-762.
- Borém A (2001) *Melhoramento de plantas*. Viçosa: UFV, 3.ed., 500p.
- Cruz CD (2001) *Programa GENES – versão Windows*. Viçosa: UFV, 642p.
- Cruz CD, Regazzi AJ, Carneiro PCS (2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, v1, 3.ed., 480p.
- Faleiro FG (1997) *Identificação de raças, diversidade genética de Uromyces appendiculatus var. appendiculatus e herança da resistência no feijoeiro*. Viçosa: UFV. (Tese M.S.).
- Fehr WR (1987) *Principles of cultivar development*. New York: MacMillan Publishing, 536p.
- Tamayo PJ (1988) *Resistência de progênies de Catimor a oito raças de Hemileia vastatrix Brek. Et Br*. Viçosa: UFV. 64p. (Tese M.S.).
- Várzea VMP, Rodrigues Jr. CJ, Silva MCML, Gouveia M, Marques DV, Guerra-Guimarães L, Ribeiro A (2002) Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: Zambolim, L. (Ed.). *O estado da arte de tecnologias na produção de café*. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, UFV. Pp.297-320.
- Yong ND & Tanksley SD (1989) Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 95-101.