

MARCADORES OPF-15₁₂₈₀ E OPC-09₁₁₂₀ LIGADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO CAFEIEIRO (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.)¹

Nara Sthefania TEDESCO (UFV, eg34469@correio.cpd.ufv.br); Ney S. SAKIYAMA (UFV, sakiyama@mail.ufv.br); Laércio ZAMBOLIM (UFV); Terezinha A. TEIXEIRA-CABRAL (UFV); Antônio A. PEREIRA (EPAMIG)

RESUMO : Uma população de plantas de café, pertencentes à geração segregante RC₁F₂, oriunda da autofecundação de uma planta RC₁ resultante do cruzamento entre Catuaí Vermelho (recorrente) e Híbrido de Timor (doador), foi estudada. Quanto à reação de resistência ou suscetibilidade à ferrugem do cafeeiro, esta população apresentou herança monogênica (proporção 3:1), utilizou-se a estratégia BSA (Bulked Segregant Analysis) com uso de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para se identificar marcador(es) ligado(s) ao gene de resistência. Foram identificados dois marcadores ligados ao gene de resistência à ferrugem do cafeeiro: o marcador OPC-09₁₁₂₀ e o marcador OPF-15₁₂₈₀.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência, *Hemileia vastatrix*, RAPD

ABSTRACT: A RC₁F₂ coffee population originated by selfing a RC₁ plant of a cross between Catuaí Vermelho (recurrent) and Timor Hybrid (donor) was studied. According to the resistance or susceptibility reaction to coffee rust, this population showed monogenic inheritance (a proportion of 3:1). BSA strategy (Bulked Segregant Analysis) using RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) was used to identify markers linked to the resistance gene. They were identified two markers linked to the resistance gene: the markers OPC-09₁₁₂₀ and OPF-15₁₂₈₀.

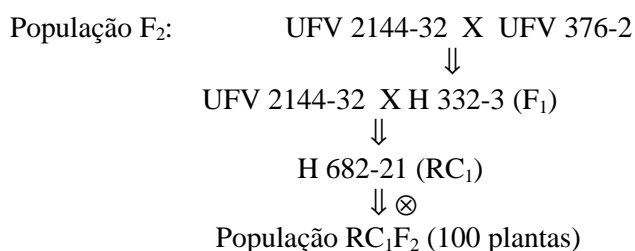
INTRODUÇÃO

PEREIRA (1995), estudou a herança da resistência às raças fisiológicas II e XXV de *H. vastatrix* em sete combinações resultantes de hibridações do Híbrido de Timor com cafeeiros das cultivares Catuaí e Mundo Novo. Os resultados analisados mostraram que a resistência a este fungo, nos descendentes de uma das introduções, é conferida por três genes de segregação independente e com dominância completa, e na descendência da outra introdução é controlada por um único gene com dominância completa. Diante dos resultados obtidos neste e em outros trabalhos, ficou destacado o elevado nível de resistência a *H. vastatrix* nas populações derivadas do Híbrido de Timor. Essa e outras características de interesse, aliadas à alta capacidade produtiva observada, em condições de campo, para as populações derivadas de cruzamento envolvendo Híbrido de Timor, ressaltam o potencial desse híbrido para o melhoramento genético do cafeeiro, visando à obtenção de cultivares resistentes à ferrugem (PEREIRA, 1995). O objetivo do presente trabalho foi o uso de marcadores de DNA, os quais são fatores genético-moleculares observados na forma de polimorfismo de fragmentos de DNA, no mapeamento de gene de resistência à ferrugem do cafeeiro, utilizando marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS *et al.*, 1990).

MATERIAL E MÉTODOS

A população utilizada no presente trabalho, é proveniente do cruzamento entre Híbrido de Timor CIFC 2234 (UFV 376-2) e Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44 (UFV 2144-32) do qual se obteve H 332-3 (híbrido F₁ - do campo de seleções de híbridos da UFV). Após obtenção do híbrido F₁, o mesmo foi utilizado num retrocruzamento com UFV 2144-32, originando a planta H 682-21, a qual por autofecundação resultou em uma população de 261 plantas, das quais utilizaram-se 100 plantas para o presente trabalho, conforme a seguir:

¹ APOIO: CNPq, FAPEMIG, FINEP, CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ.



Inoculação: A população de 100 plantas RC₁F₂, obtida por autofecundação do híbrido H 682-21 foi avaliada em condições de Câmara de Crescimento pela técnica de discos sendo colocados 20 discos, de cada indivíduo, pincelados com esporos do fungo, em um ger-box contendo uma esponja umedecida com água destilada. Extração de DNA: O DNA foi extraído de folhas jovens do cafeeiro, seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1990) com a adição de PVP-40 (solúvel) no tampão de extração. Após a extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro, corrido em gel de agarose 0,8 % e armazenado a 4°C. Na época da amplificação foi diluído em TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para uma concentração final de 10 ng/μL. Preparo de Bulks de DNA para identificação de marcadores RAPD: A análise de mistura de segregantes (BSA–Bulk Segregant Analysis), é um método rápido de identificação de marcadores ligados a uma região específica do genoma (MICHELMORE *et al.*, 1991). De uma população segregante RC₁F₂, dez plantas resistentes e dez plantas suscetíveis foram selecionadas para respectiva produção de bulk de DNA, sendo assim cada bulk, constituído por indivíduos idênticos para a característica de resistência (ou suscetibilidade) à ferrugem. De cada amostra de DNA das plantas escolhidas, foram adicionados em um novo tubo 100 μL, possuindo cada um dos dois bulks, ao final do preparo, 1000 μL de mistura de DNA numa concentração de 10 ng/μL em TE. Para composição do bulk R (resistente) foram selecionadas as plantas que apresentaram mais elevado nível de resistência à *H. vastatrix* de acordo com avaliação em casa de vegetação e, para compor o bulk S (susceptível) as plantas que apresentaram mais elevado nível de infecção pelo fungo. Os dois bulks de DNA foram usados para amplificação dos fragmentos com a finalidade de se identificar marcadores ligados aos fatores de resistência do doador, utilizando-se vários primers tomados ao acaso. Amplificação de fragmentos de DNA para obtenção de marcadores RAPD: Seiscentos e oitenta primers de dez bases, foram utilizados na amplificação dos fragmentos de DNA na tentativa de encontrar marcadores polimórficos entre os dois bulks. Cada reação obteve os seguintes componentes: 2,5 μL de KCl 50 mM; 2,5 μL de TRIS-HCl 10 mM; 2,0 μL de MgCl₂ 2 mM; 1,25 μL de dNTPs 100 μM; 1,0 μL de primer; 0,2 μM; 1,0 μL de *Taq* DNA polimerase 1 U e 2,5 μL de DNA 25 ng, somando um total de 25 μL por reação ao completar o volume com água ultra pura. A amplificação foi efetuada em termociclador Perkin Elmer 9600 programado para: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 1 minuto a 72°C e 1 ciclo de 7 minutos a 72°C. Análise por eletroforese dos fragmentos amplificados e visualização: A separação dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1,2% a 100 V por 4 horas. Após a eletroforese os fragmentos amplificados foram corados em uma solução de brometo de etídeo por 10 minutos e, em seguida, a solução foi substituída por água para eliminar, durante 40 minutos, o excesso do produto. O padrão molecular foi visualizado sob luz ultra-violeta e fotodocumentado. Análise de co-segregação: Primers apresentando banda polimórfica entre os bulks S e R foram utilizados para a análise de co-segregação na população segregante para a confirmação da ligação gênica existente entre os marcadores e o gene de resistência à ferrugem. Confecção do Mapa de Ligação: para confecção do mapa de ligação foi utilizado o programa MapMaker.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 40 dias de incubação, foi realizada a avaliação da reação de resistência/suscetibilidade, obtendo uma relação de 78 plantas resistentes para 22 plantas suscetíveis na população de 100 plantas, confirmando ser a resistência à ferrugem do cafeeiro uma característica controlada por um gene (3:1) de acordo com o teste de qui-quadrado (Tabela 1). Dos 680 primers testados, 36 resultaram em bandas polimórficas entre os bulks R (plantas resistentes) e S (plantas susceptíveis) sendo que, 18 apresentaram presença de banda no Híbrido de Timor e ausência no Catuaí e os outros 18 primers apresentaram o inverso. Os locos identificados foram OPC-09₁₁₂₀ e OPF-15₁₂₈₀. Após a análise de co-segregação em 20 plantas, foi realizada a análise de co-segregação na população de 100 plantas com ambos os locos OPC-09₁₁₂₀ e OPF-15₁₂₈₀, os quais apresentaram uma segregação de 3:1 pelo teste de qui-quadrado com um nível de significância de 5%.

Tabela 1). A análise de distâncias genéticas entre os marcadores encontrados e o gene de resistência à ferrugem do cafeeiro foi realizada pelo Programa MapMaker através do qual se obteve a melhor probabilidade de ligação entre o gene de resistência e os respectivos marcadores. O marcador OPF-15₁₂₈₀ está ligado ao gene de resistência a 8,3cM de distância e o marcador OPC-09₁₁₂₀ a 4,6cM do marcador OPF-15₁₂₈₀.

Mapa de ligação:

Gene 8,3 4,6
 ───────────────────┬──────────────────┬──────────────────
 Gene OPF-15₁₂₈₀ OPC-09₁₁₂₀

Tabela 1- Segregação dos marcadores pelo teste de qui-quadrado a um nível de significância de 5%.

Marcador	Quantidade de Plantas	Quantidade de Plantas	Hipótese	Qui-quadrado	Probabilidade (%)
Gene	78 (R)	22 (S)	3: 1	0.48	48.8422
OPC-09 ₁₁₂₀	79 (1)	21 (0)	3: 1	0.853	35.5611
OPF-15 ₁₂₈₀	81 (0)	19 (0)	3: 1	1.92	16.5857

(R): Plantas Resistentes; (S): Plantas Suscetíveis; (1): Presença de Banda e (0): Ausência de Banda

CONCLUSÃO

O gene de dominância à *Hemileia vastatrix* identificado no Híbrido de Timor CIFC 2234 (UFV 376-2), foi mapeado com os marcadores RAPD OPF-15₁₂₈₀ e OPC-09₁₁₂₀.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, (1):13-15.
- MICHELMORE, R. W., PARAN, I. & KESSELI, R. V. 1991. Identification of Markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregant populations. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 88: 9828-32.
- PEREIRA, A. A. 1995. Herança da Resistência a *Hemileia vastatrix* Berk et Br em Cafeeiros Derivados do Híbrido de Timor. Viçosa, MG, UFV, 66p (Tese M. S.).
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Researchs*, 18(22): 6531-6535.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425