

VALIDAÇÃO DE MARCADORES LIGADOS A RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO CAFEIEIRO (*Hemileiavastatrix*)¹

Fernanda Freitas de Oliveira²; Caroline Ariyoshi³; Luis Carlos Ramos⁴; Luiz Filipe Protasio Pereira⁵

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

²Mestranda em Genética e Biologia Molecular, UEL, Londrina-PR, fernandafreitasdeoliveira92@gmail.com

³ MS, UEL, Londrina-PR, carolineariyoshi@hotmail.com

⁴Pesquisador, Ph.D., IAC, Campinas-SP, lcramos@gmail.com

⁵Pesquisador, PhD, Embrapa Café, Londrina-PR, filipe.pereira@embrapa.br

RESUMO: A ferrugem alaranjada causada pelo fungo biotrófico *Hemileiavastatrix* é uma das principais enfermidades do cafeeiro, causando queda precoce das folhas o que leva a diminuição e prejuízos na produção. O melhoramento genético de cafeeiros visando à obtenção de cultivares resistentes é lento e a utilização de marcadores moleculares relacionados a resistência pode acelerar esse processo. O objetivo do presente estudo foi detectar a presença de dois marcadores (M19 e M20) que flanqueiam o gene de resistência à ferrugem (raça II) em uma população originada de Híbrido de Timor, em 47 genótipos de cafeeiro advindos do cruzamento entre *C. arabica* cv. Bourbon Vermelho e *C. canephora* cv. Robusta enviadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Trinta das 47 amostras apresentaram amplificação do marcador M19. Para o marcador M20, das 47 amostras, 41 amplificaram a banda específica e todas as amostras apresentaram algum tipo de banda, não específicas para a região. De todas as amostras, apenas 3 amostras (25, 44 e 45) não apresentaram banda para ambos os marcadores. As amostras 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 33, 34, 35, 43 não apresentaram o amplicon para o marcador M19 e as amostras 16, 19 e 26 não apresentaram amplicon para o marcador M20. Infelizmente, não foi possível correlacionar o resultado genotípico com a avaliação fenotípica de resistência à ferrugem. Os resultados demonstram a importância da caracterização e mapeamento de novos genes para resistência à ferrugem em cafeeiros em diferentes coleções e populações.

PALAVRAS-CHAVE: Ferrugem, genes de resistência à ferrugem, marcadores moleculares

VALIDATION OF MARKERS LINKED TO COFFEE RUST RESISTANCE (*Hemileiavastatrix*)

ABSTRACT: The leaf rust caused by the fungus biotrophic *Hemileiavastatrix* is a major disease of coffee, causing premature leaf fall which leads to decrease or loss of production. Genetic improvement of coffee in order to obtain resistant cultivars can be lengthy is slow and demand molecular studies of resistance genes identification. The objective of this study was to detect the presence of two markers (M19 and M20) flanking the rust resistance gene (class II) in 47 coffee genotypes generated from the crossing of *C. arabica* cv. Bourbon Red and *C. canephora* cv. Robust at the Agronomic Institute of Campinas (IAC) Thirty of the 47 samples showed amplification of the marker M19. For the marker M20 41 amplified specific bands. Only three samples (25, 44 and 45) did not show band for both markers, being probably susceptible to rust. Samples 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 33, 34, 35, 43 showed no amplicon M19 marker and for the samples 16, 19, and 26 did not show amplicon for the M20 marker. Unfortunately, it was not possible to correlate the genotypic results with the phenotypic evaluation for Rust resistance. The results demonstrate the the importance of discover and map new genes for rust resistance in coffee, in different coffee populations or collection.

KEYWORDS: rust, rust resistance gene, molecular markers

INTRODUÇÃO

O café é umas das mais importantes commodities agrícolas e é responsável por cerca de metade do total das exportações de países tropicais. A produção de *C. arabica* destaca-se em países como Brasil e Colômbia com cerca de 50% da produção global. Além disso, o café possui importância também em países não tropicais, visto que estes podem estar envolvidos no processo de industrialização e comercialização do grão (Mondegoet al., 2011).

A ferrugem alaranjada do café é a principal doença do cafeeiro, cujos danos causam queda precoce das folhas o que reduz a produção anual e podem levar a perdas de até 50% da produção (Walleret al., 2007; Zambolim et al., 2009; Capucho et al., 2013).

Dentre as formas alternativas de controle, destaca-se o cultivo de variedades resistentes que, no entanto, vem sendo quebrada pelo surgimento de novas raças, dificultando a obtenção de cultivares com resistência completa e durável. Porém vários genes de resistência em um mesmo genótipo dificultam esta quebra de resistência (Seraet al., 2010)

Em espécies do gênero *Coffea*, onde as informações disponíveis são escassas em nível molecular, a obtenção de marcadores ligados a principal doença desta cultura pode auxiliar tanto os programas de melhoramento assistido, como para o estabelecimento de estratégias de clonagem de genes de resistência a *H. vastatrix* (Diola, 2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 47 genótipos de uma população F2 obtidas a partir do cruzamento entre os parentais *C. arabica* cv. Bourbon Vermelho e *C. canephora* cv. Robusta enviadas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Esses genótipos vem sendo classificados, quanto sua resistência ou suscetibilidade, através de um teste visual no campo pelo IAC. Também foi extraído DNA de um cafeeiro originado do Híbrido de Timor, 832-2 para utilização de controle positivo na PCR. O DNA genômico foi isolado a partir de folhas pelo método descrito por Pereira et al. (2009). Aproximadamente 5g de folhas de café foram maceradas em nitrógeno líquido. Para 200mg do macerado, foram adicionados 700µL do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 100mM Tris-HCl pH 7,5; 20mM de EDTA pH 8,0; 1,4M NaCl; 1% de PVP) com adição de 2% de β-mercaptoetanol, seguida de incubação a 65°C por 30 minutos. Ao final deste período, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e foram adicionados 600µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). As amostras foram invertidas gentilmente por 5 minutos para a obtenção de uma emulsão que, posteriormente, foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foram adicionados 400µL de isopropanol a -20° C. As amostras foram colocadas a -20° C por aproximadamente 15 minutos, para precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm durante 5 minutos. O pellet foi lavado por 2 vezes com 500µL de etanol 70% , ficando imerso por 5 a 10 minutos a cada vez e em seguida lavado com 1000µL de etanol absoluto durante 3 minutos. O pellet foi secado e ressuspensionado com 30µL de água deionizada autoclavada. Após a extração verificou-se qualidade do DNA através de um gel de agarose 1% e a quantificação foi feita no NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Foram adicionados 2µL de RNase A à amostra, a qual foi incubada à 37°C por 1 hora. Através de nova análise do gel de agarose, as amostras foram diluídas para 100ng. µL⁻¹ Para a PCR foram testados oligonucleotídeos iniciadores desenhados para genótipos com introgressão de Híbrido de Timor a partir de marcadores SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*) que flanqueiam o locus de resistência à raça II, de acordo com o trabalho de Diola (2009) (Tabela 1).

Tabela 1. Relação das marcas que originaram os marcadores SCARs mais próximos e flanqueando o loci de resistência

Marcador	Sequência do primer Forward 5' → 3'	Sequência do primer Reverse 5' → 3'	Tamanho do amplicon (pb)
M19 EGTA/ETGA	CAAGCCGATCATAACTTATC	TGGTGGAGAATTCCTTCAG	533
M20 ETGC/EACA	CTGATACGGCAATCTTATC	GTAGATCTGGAAGCTCTTC	459

A amplificação dos SCARs foi realizada de acordo com Paran&Michelmore (1993) com modificações, através da técnica de PCRtouchdown, com 3 ciclos de 94°C por 30s, 66°C a 62°C de touchdown a cada ciclo por 30s e 72 °C por 60s, seguido de 28 ciclos a 94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 60s , em um volume final de 20µL, utilizando 20 ng de DNA genômico, Como controle positivo da PCR, utilizou-se o BAC de Híbrido de Timor relacionados aos loci de resistência. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,5%).

RESULTADO E DISCUSSÃO

O produto da PCR (marcador M19) apresentou o tamanho esperado de 533pb, de acordo com os resultados obtidos por DIOLA (2009). Também foi possível amplificar o clone BAC de HDT- CIFIC 832/2 correspondendo a região genômica de resistência à ferrugem. Trinta das 47 amostras apresentaram amplificação do marcador M19.

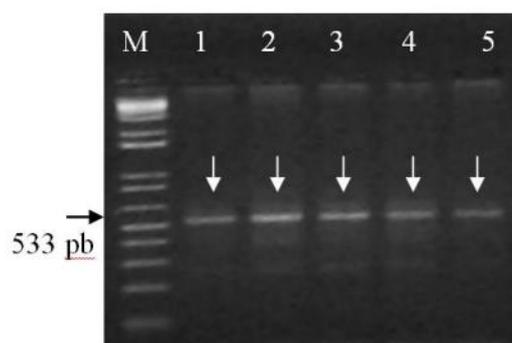


Figura 1. Amplificação da marca M19 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M, marcador; genótipos 1-5.

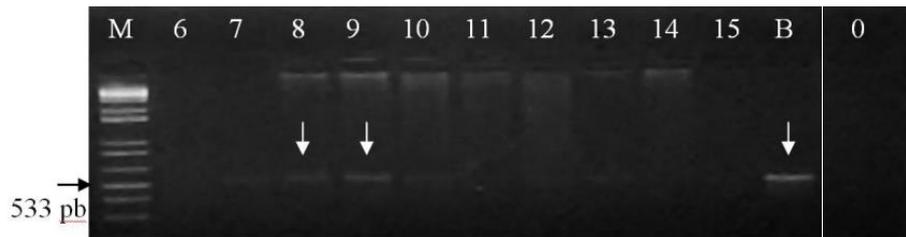


Figura 2. Amplificação da marca M19 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M:marcador; genótipos 6-15; B:clone BAC HDT- CIFC 832/2; 0: branco.

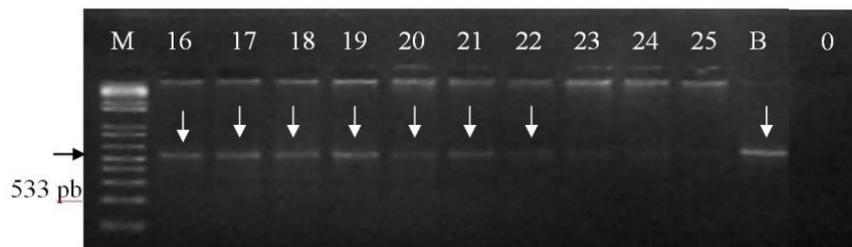


Figura 3. Amplificação da marca M19 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M:marcador; genótipos16-25; B:clone BAC HDT- CIFC 832/2; 0: branco.

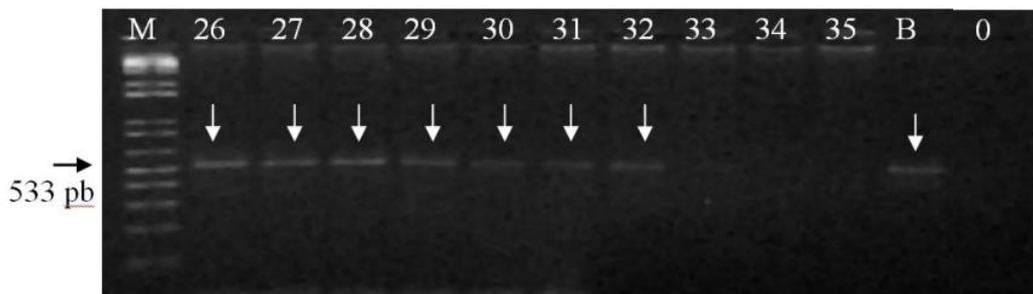


Figura 4. Amplificação da marca M19 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M:marcador; genótipos26-35; B:clone BAC HDT- CIFC 832/2; 0: branco.

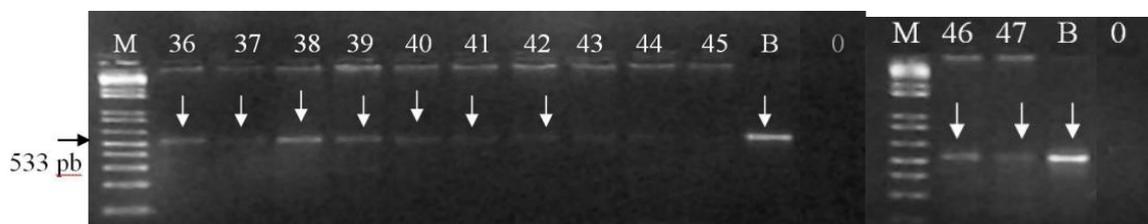


Figura 5. Amplificação da marca M19 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M: marcador; genótipos 36-47; B:clone BAC HDT- CIFC 832/2; 0: branco.

Das 47 amostras, 41 amplificaram bandas específicas para o marcador M20, todas as amostras apresentaram algum tipo de banda, no entanto não foram consideradas específicas para a região (Figura 6)

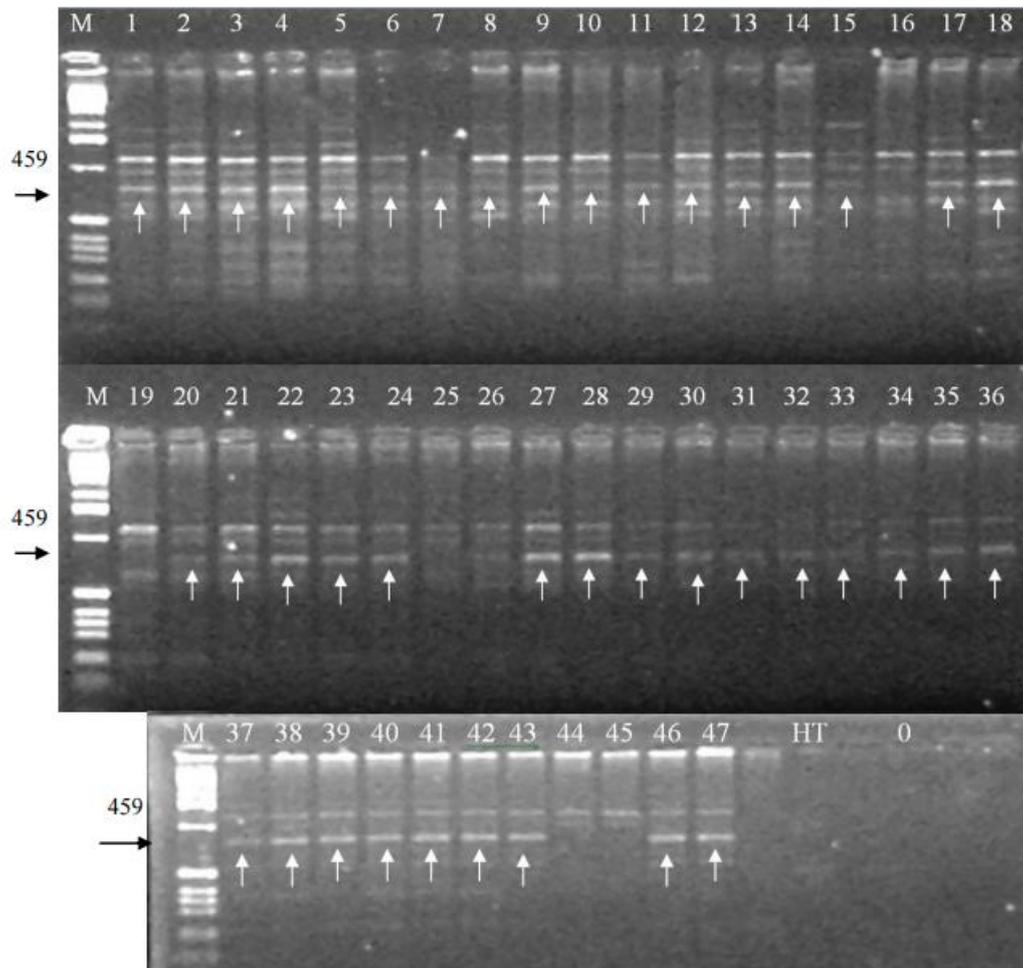


Figura 6. Amplificação da marca M20 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M: marcador; genótipos 1-47; HT: Híbrido de Timor; 0: branco.

CONCLUSÕES

De todas as amostras, apenas as amostras 25, 44 e 45 não apresentaram banda para ambos os marcadores. As amostras 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 33, 34, 35, 43 não apresentaram o polimorfismo para o marcador M19 e as amostras 16, 19 e 26 não apresentaram polimorfismo para o marcador M20. Entretanto, não foi possível correlacionar os dados genotípicos com a fenotipagem dos materiais, não sendo possível transpor os marcadores originados do trabalho de seleção com Híbrido de Timor, para a população de arabusta aqui estudada.

Os resultados demonstram a dificuldade de transpor marcadores em diferentes populações, demonstrando a importância da caracterização e mapeamento de novos genes para resistência à ferrugem em cafeeiros em diferentes coleções e populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAPUCHO, A.S.; ZAMBOLIM, L.; LOPES, U. M.; MILAGRES, N. S. Chemical control of coffee leaf rust in *Coffea canephora* cv. conilon. *Australasian Plant Pathol* 42:667–673. doi:10.1007/s13313-013-0242-y, 2013.
- DIOLA, V. Resistência à ferrugem do cafeeiro: mapeamento genético, físico e análise da expressão gênica em resposta a infecção de *H. vastatrix*. 103 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2009.
- MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F.; TOKUDA, E.K.; PARIZZI, L.P.; COSTA, G.G.L.; PEREIRA, L.F.P.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC Plant Biology*, v.11, n.30, p.1-22, 2011.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 85, p.985-993, 1993.

PEREIRA, G.S., PINHO, E. V. R. V., PADILHA, L., VILELA, L. R., CARVALHO, L. PINHO, I. V. V. Coleta de folhas do cafeeiro e extração de DNA genômico de alta qualidade. VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2009.

SERA, G. H., SERA, T., ITO, D. S., FONSECA, I. C. B., KANAYAMA, F. S., GROSSI, L. D., SHIGUEOKA, L. H. Seleção para a resistência à ferrugem em progênies das cultivares de café IPR99 e IPR107. *Bragantia*, Campinas, v.69, p547-554, 2010.

WALLER, J. M.; BIGGER, M., HILLOCKS, R.J. Coffee pests, diseases and their management. University of Greenwich. Natural Resources Institute, Chatham, 2007.

ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SOUZA, A. F.; SHRIKE, M. C.; LOPES, U. P.; SOUZA NETO, P. N.; RIOS J. A.; COSTA, R. D.; SUPPLIES, L. F. P.; MANTOVANI, E. C.; CAIXETA, E. T.; QUEIZOZ, M. E. Integrated Production of Coffee. In: Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Integrated production in Brazil: Sustainable Farming Food Insurance. Brasilia, DF, Brazil: Map / ACS, pp. 341-444, 2009.