

MAPEAMENTO GENÉTICO DE MARCADORES AFLP LIGADOS AO GENE DE RESISTENCIA DO HÍBRIDO DE TIMOR À *Hemileia vastatrix*

G. G. BRITO⁶; A. P. GALLINA^{1,6}; E. T. CAIXETA³; E. M. ZAMBOLIM⁴; L. ZAMBOLIM⁴; R. M. ALMEIDA⁵; V. DIOLA⁶; N. SAKIYAMA⁵; M. E. LOUREIRO⁶

¹Bolsista PNP&D/EmbrapaCafé-UFV/; ²Lab. Biotecnologia do Café/BIOAGRO /UFV/; ³Embrapa Café/ Lab. Biotecnologia do Café/BIOAGRO/UFV; ⁴Depto. de Fitopatologia/Lab. Biotecnologia do Café/BIOAGRO/UFV; ⁵Depto. Fitotecnica/ Lab. Biotecnologia do Café/BIOAGRO/UFV; ⁶Depto de Biologia Vegetal/ Lab. Biotecnologia do Café/BIOAGRO/UFV –Email: merlers@ufv.br

Resumo:

A ferrugem alaranjada do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix* é tida como a mais devastadora doença do cafeeiro. Este trabalho objetivou estudar a herança gênica e a identificação de marcadores moleculares ligados ao gene que confere resistência a esta doença. Para este estudo foram utilizados a população F₂ (160 indivíduos), o retrocruzamento resistente (RCr, 20 indivíduos) e o suscetível (RCs, 135 indivíduos), derivados do cruzamento entre o Híbrido de Timor UFV 427-15, genitor resistente e o suscetível Catuai amarelo UFV 2143-236. A análise da segregação das populações, em estudo, indicou que um único gene dominante, presente no acesso do Híbrido de Timor UFV 427-15, é responsável pela resistência. Foram utilizadas as metodologias de BSA (*Bulked Segregant Analysis*) e AFLP, e analisadas 852 combinações de *primers*, que permitiram identificar três marcadores ligados ao gene de resistência localizados flanqueando ambos os lados, e distantes a 8.69, 20.50 e 25.10 cM. Estes são os primeiros marcadores identificados para o gene de resistência a ferrugem presente no Híbrido de Timor, e auxiliarão na seleção em programas de melhoramento para a resistência a ferrugem no Brasil.

Palavras-chave: Ferrugem do cafeeiro, *Hemileia vastatrix*, marcadores moleculares, *Coffea arabica*.

GENETIC MAPPING OF AFLP MARKERS LINKED TO HÍBRIDO DE TIMOR RESISTANCE GENE TO *Hemileia vastatrix*

Abstract:

Leaf rust is the more important coffee disease. This work aimed to characterize the heredity of coffee rust resistance in Híbrido de Timor, and to identify molecular markers associated with this trait. To perform this research we have use a F₂ population (160 individuals), resistant backcross population (BCR, 20 individuals) and a susceptible backcross population (BCS, 135 individuals), originated from initial cross between the resistant parent genotype Híbrido de Timor UFV 427-15, and the susceptible parent genotype Catuai Amarelo UFV 2143-236. Segregation analysis of these populations has shown that resistance in the parent genotype is due a single dominant gene. Coupled use of bulked segregant analysis (BSA) and AFLP, employing 852 different primer combinations, have allowed us to identify tree molecular markers linked to these dominant resistant gene, franking both gene sides, and distant about 8.69, 20.50 e 25.10 cM. These are the first rust molecular markers found in Híbrido de Timor, and will be useful for molecular breeding for coffee rust resistance.

Key words: Coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, molecular markers, *Coffea arabica*

Introdução

A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., é considerada a doença mais importante em *Coffea arabica*. Inicialmente, confinada na África e Ásia, esta doença chegou ao Brasil em 1970. Atualmente encontra-se presente em todos os países produtores de café, exceto no Havaí e na Austrália.

A relevância da obtenção de resistência durável a este patógeno, reside no fato de que os danos econômicos causados pela redução da produção em nível mundial variam de um a dois bilhões de dólares anuais, devido à maioria dos cafeeiros arábica cultivados atualmente apresentarem-se suscetíveis ao fungo causador desta doença (Van der Vossen, 2001). No Brasil, estima-se que as perdas ocasionadas podem atingir até 30%, se medidas eficientes de controle não forem adotadas (Kushalappa & Eskes, 1989; Zambolim *et al.*, 1999). Os principais danos provocados pela doença são evidenciados pela queda prematura de folhas, o que resulta na redução de área foliar e seca de ramos laterais conduzindo, gradualmente, a deformação da planta atacada (Guzzo, 2004). O emprego do controle químico para esta doença mostra-se eficaz pela utilização de fungicidas protetores cúpricos e/ou sistêmicos do grupo dos triazóis (Matiello *et al.*, 2002; Zambolim *et al.*, 2002). Embora eficientes, os efeitos causados ao meio ambiente e aos organismos não alvos poderão conduzir a explosões populacionais de pragas e/ou de outras doenças do cafeeiro. Adicionalmente, a pressão de seleção exercida sobre o patógeno com esta estratégia de controle predispõe ao surgimento de novas raças resistentes aos produtos aplicados (Zambolim *et al.*, 2002). A alternativa mais indicada ao controle químico tem sido a obtenção de cultivares portadores de genes de resistência ao patógeno, a qual é possível ser obtida pelo melhoramento convencional, o qual pode ser auxiliado por técnicas moleculares (Fazuoli *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2002; Sera *et al.*, 2002; Fazuoli *et al.*, 2005). O emprego de cultivares de café portadores de genes de resistência à doença permitiria o cultivo minimizando os efeitos negativos ocasionados pelo controle químico. No Brasil, alguns programas de melhoramento genético voltados ao desenvolvimento de cultivares resistentes à ferrugem utilizam como fonte de resistência, progênies oriundas do Híbrido de

Timor, planta derivada de cruzamento interespecífico natural entre *Coffea arabica* e *C. canephora*, resistentes a todas as raças fisiológicas de *H. vastatrix* avaliadas. No presente trabalho realizou-se, inicialmente, a caracterização fenotípica da resposta do Híbrido de Timor UFV 427-15 à raça II do fungo *H. vastatrix*, gerando informações que nortearam as estratégias adotadas para a obtenção de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência à ferrugem, através da técnica de AFLP (*Amplified-Fragment Length Polymorphism*). A geração de marcadores possibilitará o mapeamento físico de alta resolução da região cromossômica contendo o gene de resistência à doença permitindo a elaboração de estudos da interação planta-patógeno e, futuramente, sua utilização em programas de melhoramento.

Material e Métodos

Estudo da população segregante para resistência à ferrugem

Inicialmente, efetuou-se a caracterização da resistência à raça II da ferrugem, predominante no Brasil. Para o estudo, o Híbrido de Timor UFV 427-15, genitor resistente, foi cruzado como o genótipo suscetível Catuaí amarelo UFV 2143-236. A planta F₁ foi retrocruzada com o Catuaí UFV 2143-236, gerando 177 plantas resultantes do retrocruzamento suscetível (RC1s). Adicionalmente, a população segregante F₂ (314 plantas) foi obtida através da autofecundação controlada da planta F₁.

Os genitores, a planta F₁, as 135 plantas do RC1s e as 177 plantas da F₂ foram inoculadas com uredósporos da raça II de *H. vastatrix*, na concentração de 2,0 mg.ml⁻¹. Foram efetuadas 20 aplicações de 5,0 µl cada na superfície abaxial, em uma folha jovem completamente expandida. As folhas foram acondicionadas em caixas tipo gerbox desinfetadas e com o fundo revestido por espuma de 1,0 cm de espessura, saturada em água destilada e coberta com tela de nylon. Após a inoculação, os gerbox foram mantidos no escuro por 48 horas a 22±2°C e, em seguida transferidos para ambiente com fotoperíodo de 12 horas e 22°C, mantendo a umidade saturada no interior do gerbox. A avaliação foi efetuada aos 49 dias após a inoculação. A determinação de plantas resistentes e suscetíveis nos genitores e populações derivadas foi obtida com base na reação de folhas inoculadas à doença. Foram consideradas resistentes aquelas que se apresentaram isentas de esporos e suscetíveis aquelas com esporos visíveis (Tamayo, 1988). Pelo teste do Qui-quadrado com o auxílio do aplicativo computacional GENES (Cruz, 2001) obteve-se a proporção fenotípica a fim de explicar a melhor frequência das classes observadas.

Extração de DNA

Amostras foliares armazenadas a -80°C por 24 horas foram liofilizadas e maceradas. Em seguida, o DNA genômico dos genitores resistente e suscetível foi extraído com CTAB conforme o método de Murray e Thompson (1980) adaptado para o café.

Análise por AFLP (*Amplified-Fragment Length Polymorphism*)

A análise por AFLP foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Vos *et al.* (1995), adaptada para café. Após extração, verificação da qualidade e quantificação, o DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e MseI. Os fragmentos de DNA obtidos da digestão foram ligados a adaptadores correspondentes a combinação de enzimas de restrição empregada. A amplificação dos fragmentos foi realizada em duas etapas: uma primeira amplificação utilizando *primers* contendo um nucleotídeo seletivo adicional à sequência complementar dos adaptadores e uma segunda amplificação utilizando *primers* contendo dois nucleotídeos seletivos adicionais. Os produtos das amplificações foram separados em gel de poliacrilamida 6% e a visualização das bandas obtida através da impregnação com prata.

Resultados e Discussão

Dentre as 160 plantas analisadas na população segregante F₂, a resistência foi verificada em 124 indivíduos (77%) enquanto 36 indivíduos foram considerados suscetíveis (23%). Estes dados confirmaram o padrão de segregação de 3:1, esperado para um único gene dominante ($\chi^2=0,5336$, $P=0,4652$; Tabela 1). A segregação observada nas populações dos retrocruzamentos resistente (RCr) e suscetível (RCs) confirma a herança monogênica dominante do Híbrido de Timor (Tabela 1).

Pelo presente estudo verificou-se que a técnica de AFLP constitui-se em ferramenta apropriada à identificação de marcadores moleculares ligados a resistência à ferrugem. Foram utilizadas 852 combinações de *primers* AFLP e, aproximadamente, 52.000 bandas foram analisadas. Detectaram-se, dependendo da combinação de *primers* empregada na reação, entre 18 e 165 fragmentos de DNA amplificados. As combinações utilizadas foram agrupadas segundo o conjunto de *primers* empregado na amplificação pré-seletiva e estão apresentadas na Tabela 2.

Após a análise de um total de 852 combinações de *primers*, foram detectados, ao todo, 50 fragmentos presentes no genitor e *bulk* resistentes e ausentes no genitor e *bulk* suscetíveis. Destas, três foram confirmadas após a análise separada de cada indivíduo pertencente aos *bulks*, ou seja, verificou-se a presença da banda em todos os indivíduos do *bulk* resistente e a sua ausência em todos os indivíduos do *bulk* suscetível.

Tabela 1 - Segregação da resistência à raça II de *Hemileia vastatrix* no cruzamento entre o genitor resistente Híbrido de Timor UFV 427-15 e o suscetível Catuaí Amarelo UFV 2143-236.

População ¹	No de plantas		Proporção ² observada	Proporção ² esperada	χ^2	Probabilidade (%)
	R	S	R:S	R:S		
UFV 427-15	20	0	1:0	1:0	---	---
UFV 2143-236	0	20	0:1	0:1	---	---
F ₁	20	0	1:0	1:0	---	---
F ₂	124	36	3,40:1	3:1	0,5336	46,5208
RCs	63	72	0,87:1	1:1	0,3684	54,3866
RCr	20	0	1:0	1:0	---	---

¹População oriunda do cruzamento entre o Híbrido de Timor (UFV 427-15) e o Catuaí amarelo (UFV 2143-236). ²Proporção observada e proporção esperada para suscetíveis e resistentes.

Tabela 2 - Número de combinações de *primers* testadas e polimorfismos observados entre o genitor resistente Híbrido de Timor UFV 427-15 e o suscetível Catuaí Amarelo UFV 2143-236 e entre *bulks*.

¹"N" refere-se a cada nucleotídeo adicional presente nos primers.

	² E-ANN/MC ¹ NN ¹	² E-ANN/M-C ¹ NN	² E-C ¹ NN/M-ANN	² E-G ¹ NN/M-ANN	³ E-C ¹ NN/M-T ¹ NN
Total de combinações	106	64	256	250	176
Combinações polimórfica entre genitores	50	24	78	67	101
Fragmentos polimórficos presentes no UFV 427-15	116	12	51	94	278
Fragmentos polimórficos presentes no UFV 2143-236	33	46	53	80	142
Combinações polimórficas nos genitores e nos <i>bulks</i>	---	22	64	09	09
Fragmentos presentes no <i>bulk</i> resistente	---	08	22	04	16
Fragmentos presentes no <i>bulk</i> suscetível	---	26	58	05	03

²Refere-se às combinações de primers testadas utilizando bulks de oito indivíduos cada.

³Refere-se às combinações de primers testadas utilizando bulks de cinco indivíduos cada

O primeiro marcador candidato identificado (E.CTC/M.TTT₄₀₅) corresponde a um fragmento de DNA amplificado de 405 bp. O segundo (E.CCT/M.TTC₂₃₀) amplificou um fragmento a 230 bp e um terceiro (E.CGT/M.TGT₃₀₀) amplificou um fragmento a 300 bp. Os três marcadores candidatos foram testados nos 160 indivíduos que compõem a população segregante F₂, e confirmaram sua ligação ao gene de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro.

A segregação do gene de resistência à ferrugem e dos três marcadores identificados está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise da segregação do gene de resistência do Híbrido de Timor UFV 427-15 e dos três marcadores identificados na população F₂ oriunda do cruzamento entre o Híbrido de Timor UFV 427-15 e Catuaí Amarelo UFV 2143-236.

Loco testado*	Proporção esperada	Proporção observada	χ^2	Probabilidade (%)	Distância (cM) ³
R	3:1 ¹	124:36	0,5336	46,5208	---
E.CTC/M.TTT ₄₀₅	3:1	124:36	0,30	58,3882	---
E.CCT/M.TTC ₂₃₀	3:1	133:27	5,6333	1,7622	---
E.CGT/M.TGT ₃₀₀	3:1	118:42	0,1333	71,5000	---
R/E.CTC/M.TTT ₄₀₅	9:3:3:1 ²	118:6:6:30	85,1111	0,0000	8,69
R/E.CCT/M.TTC ₂₃₀	9:3:3:1	118:6:15:21	47,5111	0,0000	20,50
R/E.CGT/M.TGT ₃₀₀	9:3:3:1	103:21:15:21	24,1777	0,0022	25,10

¹Proporção esperada para a herança monogênica e dominante presente na população F₂ (3 resistente, R₋, ou presença da banda: 1 suscetível, ou ausência da banda).

²Proporção esperada para a segregação de dois locos independentes na progênie F₂ (R₋/+; R₋/-; rr/+; rr/-)

³Distância genética em centimorgans (cM).

Observou-se na Tabela 3, co-segregação entre o loco de resistência em análise e os marcadores testados. Por meio da análise de recombinação demonstrou-se que o marcador E.CTC/M.TTT₄₀₅ posiciona-se a 8,69 cM de distância do gene de resistência, com valores calculados de *lod score* de 18,91. O marcador E.CCT/M.TTC₂₃₀ situa-se a 20,50 cM do gene, com *lod score* igual a 6,15. Um terceiro marcador E.CGT/M.TGT₃₀₀ situa-se a 25,10 cM com *lod score* calculado de 5,37.

O mapa contendo o gene de resistência e os marcadores AFLP está representado na Figura 1. Observa-se que o gene de resistência à ferrugem está sendo flanqueado por dois marcadores. Estes marcadores encontram-se ligados, em fase de acoplamento, ao gene de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro.

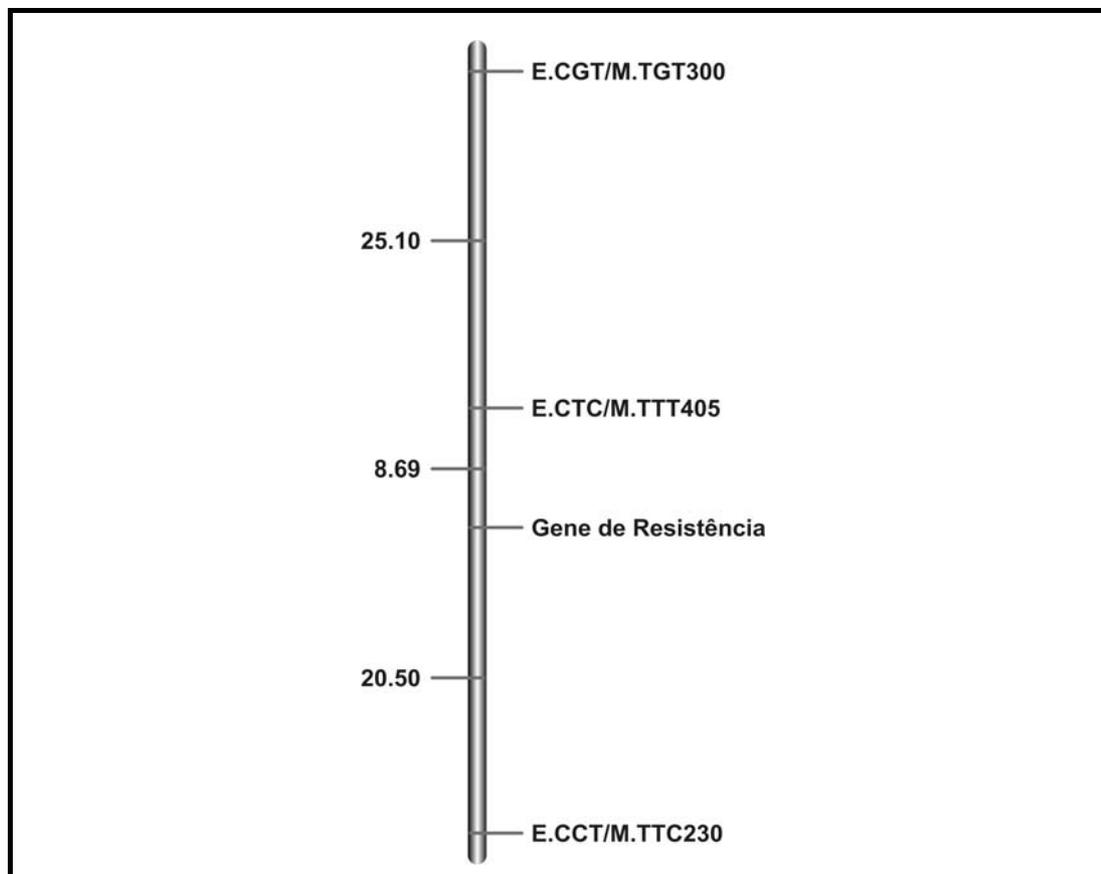


Figura 1 - Mapa de ligação contendo as posições dos marcadores AFLP identificados e as suas distâncias (cM) entre si e entre o gene de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro.

A obtenção de marcadores flanqueando genes de interesse constitui-se em informação útil ao melhoramento assistido, tendo em vista que tem sido comprovada uma maior eficiência de seleção pelo emprego de marcadores flanqueadores, se comparada ao seu emprego de forma isolada (Corrêa et al., 2001).

Poucos marcadores moleculares ligados a genes de resistência a ferrugem foram obtidos até o momento. Os marcadores obtidos por Prakash et al. (2004) estão ligados a um gene oriundo de *C. liberica* (S_H3). Entretanto, *C. liberica* possui somente um gene de resistência, a qual já foi suplantada pela ocorrência, no Brasil, da raça XVI em cafeeiros cultivados no estado de Minas Gerais (Cardoso et al. 1988). A ocorrência da raça XVI no Brasil compromete a resistência no campo de todas as combinações entre os fatores de resistência ao patógeno de S_H1 a S_H5, tendo em vista que esta raça possui, em sua constituição genotípica, os genes de virulência v1, v2, v3, v4 e v5.

Conclusões

O Híbrido de Timor contém outros genes como o S_H6 e S_H9, os quais até o momento tem conferido resistência durável às raças de ferrugem no Brasil identificadas. Desta forma, os marcadores aqui identificados são os primeiros a serem úteis para o melhoramento assistido por marcadores para obter uma resistência adequada a ferrugem no Brasil.

Referências Bibliográficas

Cardoso RML, Zambolim L, Chaves GM (1988) Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* coletada do germoplasma de *Coffea arabica* no Estado de Minas Gerais. Fitopatol Bras 13:4:343-346

Corrêa RX, Good-God PIV, Oliveira MLP, Nietsche S, Moreira M, Barros EG (2001) Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. Fitopatol Bras. 26:1:27-32

- Cruz CD (2001) Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística: versão Windows Viçosa: editora UFV 648p
- Fazuoli LC, Medina Filho HP, Gonçalves W, Guerreiro Filho O, Silvarolla MB (2002) Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arabica obtidas no Instituto Agrônomo em Campinas. In: Zambolim, L. (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, pp63-215
- Fazuoli LC, Oliveira ACB, Toma-Braguini M, Silvarolla MB (2005) Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust at the IAC. In: Zambolim, L. (ed) Durable resistance to coffee leaf rust. UFV, Viçosa, pp137-185
- Guzzo SD (2004) Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tese de doutorado, Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura 236p
- Kushalappa AC, Eskes AB (1989) Advances in coffee rust research. Annu Rev Phytopathol 27:503-531
- Matiello JB, Santinato R, Garcia AWR, Almeida SR, Fernandez DR (2002) Cultura de café no Brasil. Novo Manual de Recomendações. In: Matiello, J.B. (ed.) Rio de Janeiro MAPA/PROCAFE 387p
- Murray MG &Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl Acids Res 8: 4321-4325
- Prakash NS, Marques DV, Varzea VMP, Silva MC, Combes MC, Lashermes P (2004) Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. Theorl Appl Genet 109:1311-1317
- Pereira AA, Moura WM, Zambolim L, Sakiyama NS, Chaves GM (2002) Melhoramento genético do cafeeiro no Estado de Minas Gerais: cultivares lançados e em fase de obtenção. In: Zambolim, L (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, pp253-295
- Sera T, Alteia MZ, Petek MR (2002) Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). In: Zambolim L (eds) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, pp217-251
- Tamayo PJ, Vale FXR, Zambolim L, Chaves GM, Pereira AA (1995) Catimor resistance to coffee leaf rust and virulence of physiological races of *Hemileia vastatrix*. Fitopatol Bras 20:572-576
- Van der Vossen HAM (2001) Coffee breeding practices. In: Clarke RJ, Vitzthum OG (eds) Coffee Recent Developments. Agronomy, vol 1. Blackwell, London, pp184-201
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting Nucleic Acids Res. 23:4407-4414
- Zambolim L, Vale FXR, Costa H, Chaves GM (2002) Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: Zambolim L (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, pp369-450
- Zambolim L, Vale FXR, Pereira AA, Chaves GM (1999) Manejo integrado das doenças do cafeeiro In: Zambolim L (eds) Produção de café com qualidade. UFV, Viçosa, pp134-215