

## SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO CAFEIEIRO<sup>1</sup>

Emilly Ruas Alkimim<sup>2</sup>; Eveline Teixeira Caixeta<sup>3</sup>; Tiago Vieira Sousa<sup>4</sup>; Antonio Carlos Baião de Oliveira<sup>5</sup>; Antonio Alves Pereira<sup>6</sup>; Eunize Maciel Zambolim<sup>7</sup>; Laércio Zambolim<sup>8</sup>; Ney Sussumu Sakiyama<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa & Desenvolvimento/Café, INCT Café, CNPq e Fapemig.

<sup>2</sup>Mestranda do programa de Genética e Melhoramento Vegetal, Universidade Federal de Viçosa-UFV, emillyalkimim@yahoo.com.br.

<sup>3</sup>Pesquisadora, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, eveline.caixeta@embrapa.br; autor correspondência.

<sup>4</sup>Mestrando do programa de Genética e Melhoramento Vegetal, UFV, tiagronomia@yahoo.com.br.

<sup>5</sup>Pesquisador, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, baião.embrapa@gmail.com.

<sup>6</sup>Pesquisador, DSc, Epamig, Viçosa, pereira@epamig.br.

<sup>7</sup>Pesquisadora, DSc, Bioagro, UFV, Viçosa, eunize@ufv.br.

<sup>8</sup>Professor, PhD, Departamento Fitopatologia, UFV, Viçosa, zambolim@ufv.br.

<sup>9</sup>Professor, DSc, Departamento Fitotecnia, UFV, Viçosa, sakiyama@ufv.br.

**RESUMO:** Marcadores moleculares intimamente ligados a dois genes maiores ( $S_{H3}$  e  $S_{H?}$ ) que conferem resistência à ferrugem do cafeeiro foram previamente identificados e têm potencial para serem usados em programas de melhoramento visando identificar e monitorar genótipos contendo resistência a esse patógeno. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi incorporar a estratégia de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) associados a esses genes no programa de melhoramento do cafeeiro. Inicialmente os marcadores moleculares disponíveis na literatura foram validados e então utilizados na seleção assistida de 160 genótipos. Esses cafeeiros fazem parte do germoplasma da UFV/Epamig e foram introduzidos do CIFC por serem potencialmente portadores de resistência à ferrugem. Por meio dos marcadores validados foi possível identificar nove indivíduos resistentes homocigotos para o gene  $S_{H3}$ , UFV311-48 ( $F_2$ ), UFV311-56 ( $F_2$ ), UFV313-133 ( $F_2$ ), UFV329-78 ( $F_2$ ), UFV334-65 ( $F_2$ ), UFV335-12 ( $F_2$ ), UFV335-77 ( $F_2$ ), UFV399-45 ( $F_2$ ) e UFV409-08 ( $F_2$ ). O gene  $S_{H3}$  confere resistência a diferentes raças do patógeno e a sua incorporação em variedades de interesse tem sido sugerida como importante estratégia para obter resistência a essa doença. Também foram identificados cafeeiros que além de serem portadores do gene  $S_{H3}$  em homocigose, apresentaram o gene  $S_{H?}$  proveniente do Híbrido de Timor (HT). Tais genótipos são o UFV311-48 ( $F_2$ ), UFV 311-56 ( $F_2$ ), UFV313-133 ( $F_2$ ), UFV334-65 ( $F_2$ ), UFV399-45 ( $F_2$ ) e UFV409-08 ( $F_2$ ). Esse gene originado do HT confere resistência a outras raças do patógeno. Logo, por meio da SAM, foram identificados cafeeiros portadores de dois diferentes genes de resistência que juntos são capazes de conferir resistência a um amplo espectro de raças de *H. vastatrix*, fungo causador da ferrugem, permitindo obter resistência durável. Os cafeeiros identificados poderão ser utilizados no avanço de geração ou em cruzamentos para a introdução desses genes em outros materiais genéticos de interesse nos programas de melhoramento. A utilização dos marcadores moleculares validados, nos programas de melhoramento, serão imprescindíveis para monitoramento dos genes nas diferentes gerações e cruzamentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** melhoramento do cafeeiro, marcador SCAR, genes de resistência, *Hemileia vastatrix*.

### MARKER-ASSISTED SELECTION FOR RESISTANCE TO COFFEE LEAF RUST

**ABSTRACT:** Molecular markers closely linked to two major genes ( $S_{H3}$  and  $S_{H?}$ ) that confer resistance to coffee leaf rust were previously identified and have potential to be used in breeding programs to identify and monitor genotypes containing resistance to this pathogen. Thus, the aim of this work was to incorporate the strategy of marker-assisted selection (MAS) associated with these genes in coffee breeding program. Initially the molecular markers available were validated and then used for selection of 160 genotypes. These coffee trees belong to the germplasm of UFV/Epamig and were introduced due to their potential of carrying rust resistance. Through the validated markers, It was identified nine individuals homozygous for the resistant gene  $S_{H3}$ : UFV311-48 ( $F_2$ ), UFV311-56 ( $F_2$ ), UFV313-133 ( $F_2$ ), UFV329-78 ( $F_2$ ), UFV334-65 ( $F_2$ ) UFV335-12 ( $F_2$ ) UFV335-77 ( $F_2$ ) UFV399-45 ( $F_2$ ) and UFV409-08 ( $F_2$ ). The  $S_{H3}$  gene confers resistance to different races of the pathogen and its incorporation in cultivars has been suggested as an important strategy for resistance to this disease. In these coffee genotype, It was also identified the ones that has also the gene  $S_{H?}$ . These genotypes are UFV311-48 ( $F_2$ ), 311-56 UFV ( $F_2$ ) UFV313-133 ( $F_2$ ) UFV334-65 ( $F_2$ ) UFV399-45 ( $F_2$ ) and UFV409-08 ( $F_2$ ). The  $S_{H?}$  gene were identified in the Híbrido de Timor and confer resistance to other races of the pathogen. Thus, by means of SAM, we identified coffee trees carrying two different resistance genes which together are capable of conferring resistance to a broad spectrum of races of *H. vastatrix*, rust fungus, allowing to have a durable resistance. Coffee trees identified here may be used to advanced generations or crosses to the introduction of these genes in other genetic materials of interest in breeding programs. The use of validated molecular markers in breeding programs will be invaluable for monitoring of genes in different generations and crosses.

**KEY WORDS:** Coffee breeding, SCAR marker, resistance genes, *Hemileia vastatrix*.

## INTRODUÇÃO

Dentre as doenças de maior importância na cultura do café pode-se citar a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk & Br), que causa grandes prejuízos econômicos aos cafeicultores no mundo inteiro. O controle químico dessas doenças tem se mostrado eficiente, porém devido ao alto custo e aos problemas ambientais decorrentes do mesmo, tem-se buscado a obtenção de cultivares portadores de genes de resistência ao patógeno por meio do melhoramento genético.

Nesse contexto, já foram identificadas diferentes fontes de resistência para essa doença, sendo caracterizados até o momento, pelo menos nove genes dominantes ( $S_H1$  a  $S_H9$ ) presentes, de forma isolada ou combinada, nessas fontes. 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. Para a transferência desses genes para cultivares de *C. arabica* tem-se utilizado híbridos naturais como o Híbrido de Timor e Seleções Indianas.

O gene  $S_H3$  já foi extensivamente estudado, sendo identificados 21 marcadores do tipo AFLP ligados a ele (PRAKASH *et al.*, 2004). Quatro desses marcadores AFLP foram transformados em SCAR e juntamente com outros três SCAR proveniente de extremidade de BAC e três SSR formaram dois pequenos grupos de ligação (5,7 cM e 5,9 cM) contendo o gene de resistência (MAHÉ *et al.*, 2008). Esses 10 marcadores moleculares, por estarem proximamente ligados ao gene de resistência, podem ser utilizados para identificar o gene  $S_H3$  em Seleção Assistida por Marcadores (SAM) em programas de melhoramento. Brito *et al.* (2010) e Diola *et al.* (2011) identificaram marcadores ligados aos genes  $S_H?$ , presente em um acesso de Híbrido de Timor (HT), que confere resistência a outras raças de *H. vastatrix*. Por ter sido identificado no HT, esse gene deve ser o  $S_H6$  ou  $S_H7$  ou  $S_H8$  ou  $S_H9$ . Diola *et al.* (2011) desenvolveram um mapa genético de alta densidade, com seis marcadores SCAR delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM e flanqueando o gene  $S_H?$  em 0,7 e 0,9 cM. Esses marcadores também apresentam potencial para serem usados em SAM. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi incorporar a estratégia de seleção assistida por marcadores moleculares associados aos genes  $S_H3$  (proveniente de *C. liberica*) e  $S_H?$  (do Híbrido de Timor) que conferem resistência à ferrugem, no programa de melhoramento do cafeeiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig)/Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Validação dos marcadores SCAR ligados ao gene $S_H3$

Para validação dos marcadores moleculares, foram usados três genótipos sabidamente portadores do gene  $S_H3$ , H 147, S.288 e H153/2. O genótipo H 147 corresponde a um híbrido resultante do cruzamento da seleção indiana S.353 e S4 Agaro; o H 153/2 entre a seleção indiana S.288 e Geisha. Esses cafeeiros foram selecionados por serem clones diferenciadores de raças de *H. vastatrix*, que por terem o gene  $S_H3$ , permitem identificar as raças contendo v3. Foram coletados também dois cafeeiros suscetíveis à ferrugem e que, portanto, não possuem o gene  $S_H3$ , Caturra Vermelho 19/1 (genitor de alguns dos cafeeiros da população analisada) e Catuaí Vermelho UFV2148/57. Folhas dos cinco cafeeiros foram coletadas e o DNA extraído utilizando a metodologia descrita por Diniz *et al.* (2005).

A amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25 $\mu$ l, contendo 50ng de DNA genômico, tampão 1X da enzima, 2,0mM de  $MgCl_2$ , 0,1mM de dNTP, 0,4 $\mu$ M de cada *primer* e 0,5 unidade Taq DNA polimerase. As reações foram conduzidas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*) e consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, com temperaturas de anelamento específica para cada *primer*, por 45 segundos e extensão de 72°C por 45 segundos; e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Dos 10 marcadores SCAR ligados ao gene  $S_H3$ , identificados por Mahé *et al.* (2008), foram testados cinco (Sp-M8-SH3, Sp-M16-SH3, Sat244, BA-48-21O-f e BA-124-12K-f). Estes marcadores foram selecionados por estarem mais próximos e em fase de aproximação do gene de resistência.

### Validação dos marcadores SCAR ligados ao gene $S_H?$ proveniente do Híbrido de Timor

A validação dos marcadores ligados ao gene  $S_H$  presente no Híbrido de Timor, que conferem resistência a outras raças de *H. vastatrix*, foi realizada utilizando os Híbridos de Timor UFV427-15 e UFV443-03 e o genótipo H421-4 como portadores do gene de resistência. Como controles suscetíveis (não portadores dos genes), foram usados Catuaí UFV2143-236 e Catuaí Vermelho UFV2148-57. Os cafeeiros UFV427-15 e UFV2143-236 correspondem aos progenitores e o H421-4 a planta  $F_1$  utilizados por Diola *et al.* (2011) para identificação dos marcadores que estão sendo validados no presente estudo.

Para a condução das reações de amplificação foram utilizados os seis marcadores SCAR (SCAR M18, SCAR M20, SCAR M23, SCAR M1, SCAR M19 e SCAR M24) identificados por Diola *et al.* (2011). As reações de amplificação por PCR foram conduzidas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*), utilizando 100ng de DNA genômico, tampão 1X da enzima, 1,5mM de  $MgCl_2$ , 0,2mM de dNTP, 0,25pmol de cada *primer*, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase e água ultra pura para completar o volume final de 20  $\mu$ l. A amplificação consistiu em

desnaturação a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, com temperaturas de anelamento específica para cada *primer*, por 30 segundos e extensão de 72° C por 60 segundos; e extensão final a 72° C por 10 minutos.

### *Seleção assistida por marcadores moleculares*

Folhas jovens de 160 genótipos de café com potencial para serem portadores de resistência à ferrugem (Tabelas 1 e 2) foram coletadas e o DNA extraído utilizando a metodologia descrita por Diniz *et al.* (2005). Esses cafeeiros foram introduzidos pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com objetivo de disponibilizar fontes de resistência à ferrugem para os Programas de Melhoramento Genético do Cafeeiro. Foram obtidos do CIFC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro - Oeiras, Portugal) e quando chegaram no Brasil foram avaliados com uma mistura de inóculos de *H. vastatrix* coletados nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo, os cafeeiros resistentes foram então mantidos e estão sendo usados no presente trabalho. Esse material genético foi obtido, no CIFC, por meio de cruzamento entre cultivares de interesse agrônomico de porte baixo e porte alto com cafeeiros da Índia selecionados por serem portadores do gene  $S_{H3}$ . As fontes utilizadas de progênies portadoras do gene  $S_{H3}$  nessa população foram as seleções da Índia S.333, S.795, S.353, S.288 e BA16. As seleções indianas S.288, S.333 e S.353 e da série BA são derivadas de cafês tetraplóides S.26 e S.31 (*C. arabica* x *C. liberica*), retrocruzadas ou não com Kent ou Coorg, e possuem os genes  $S_{H2}$ ,  $S_{H3}$  e  $S_{H5}$ .

O DNA desses cafeeiros foram amplificados com os marcadores validados, conforme reação descrita acima, e a detecção do polimorfismo realizada em gel de poliacrilamida desnaturante 6%, corado com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Brito *et al.* (2010). A observação dos padrões de bandas entre os genótipos foram avaliadas comparando-se com o padrão de bandas apresentados pelos genótipos controles. Conduzindo-se as leituras dos géis com base na presença ou ausência da marca (banda) de resistência.

Tabela 1. Acessos de cafeeiro originados de cruzamentos de fontes de resistência à ferrugem contendo o gene  $S_{H3}$  com cultivares de porte baixo (Caturra e Catuaí), submetidos a SAM.

Nº de Registro das Plantas	Geração Introduzida	Nº de Registro das Plantas	Geração Introduzida	Nº de Registro das Plantas	Geração Introduzida
UFV 311-27	F <sub>2</sub>	UFV 317- 02	F <sub>1</sub>	UFV 336-06	F <sub>1</sub>
UFV 311-30	F <sub>2</sub>	UFV 317-12	F <sub>1</sub>	UFV 336-08	F <sub>1</sub>
UFV 311-48	F <sub>2</sub>	UFV 317-19	F <sub>1</sub>	UFV 336-10	F <sub>1</sub>
UFV 311-49	F <sub>2</sub>	UFV 317-22	F <sub>1</sub>	UFV 336-29	F <sub>1</sub>
UFV 311-56	F <sub>2</sub>	UFV 317-52	F <sub>1</sub>	UFV 336-34	F <sub>1</sub>
UFV 311-63	F <sub>2</sub>	UFV 317-59	F <sub>1</sub>	UFV 336-35	F <sub>1</sub>
UFV 312-96	F <sub>2</sub>	UFV 317-60	F <sub>1</sub>	UFV 336-37	F <sub>1</sub>
UFV 313-96	F <sub>2</sub>	UFV 317-69	F <sub>1</sub>	UFV 336-39	F <sub>1</sub>
UFV 313-107	F <sub>2</sub>	UFV 334-03	F <sub>2</sub>	UFV 337-01	F <sub>1</sub>
UFV 313-133	F <sub>2</sub>	UFV 334-07	F <sub>2</sub>	UFV 337-16	F <sub>1</sub>
UFV 314-44	F <sub>2</sub>	UFV 334-08	F <sub>2</sub>	UFV 337-18	F <sub>1</sub>
UFV 316-12	F <sub>1</sub>	UFV 334-09	F <sub>2</sub>	UFV 337-19	F <sub>1</sub>
UFV 316-13	F <sub>1</sub>	UFV 334-63	F <sub>2</sub>	UFV 337-20	F <sub>1</sub>
UFV 316-15	F <sub>1</sub>	UFV 334-64	F <sub>2</sub>	UFV 337-29	F <sub>1</sub>
UFV 316-17	F <sub>1</sub>	UFV 334-65	F <sub>2</sub>	UFV 337-30	F <sub>1</sub>
UFV 316-21	F <sub>1</sub>	UFV 334-66	F <sub>2</sub>	UFV 339-01	F <sub>1</sub>
UFV 316-32	F <sub>1</sub>	UFV 334-67	F <sub>2</sub>	UFV 339-02	F <sub>1</sub>
UFV 316-33	F <sub>1</sub>	UFV 334-68	F <sub>2</sub>	UFV 339-07	F <sub>1</sub>
UFV 316-35	F <sub>1</sub>	UFV 334-93	F <sub>2</sub>	UFV 339-10	F <sub>1</sub>
UFV 316-43	F <sub>1</sub>	UFV 334-28	F <sub>2</sub>	UFV 339-25	F <sub>1</sub>
UFV 316-59	F <sub>1</sub>	UFV 334-39	F <sub>2</sub>	UFV 339-34	F <sub>1</sub>
UFV 316-66	F <sub>1</sub>	UFV 336-01	F <sub>1</sub>	UFV 339-65	F <sub>1</sub>
UFV 316-69	F <sub>1</sub>	UFV 336-02	F <sub>1</sub>	UFV 339-100	F <sub>1</sub>
UFV 316-70	F <sub>1</sub>	UFV 336-04	F <sub>1</sub>	--	--
UFV 317-01	F <sub>1</sub>	UFV 336-05	F <sub>1</sub>	--	--

Tabela 2. Acessos de cafeeiros originados de cruzamentos de fontes de resistência à ferrugem contendo o gene  $S_H3$  com cultivares de porte alto (Mundo Novo e outras), submetidos a SAM.

Nº de Registro das Plantas	Geração Introduzida	Nº de Registro das Plantas	Geração Introduzida	Nº de Registro das Plantas	Geração Introduzida
UFV 315-01	F <sub>2</sub>	UFV 335-07	F <sub>2</sub>	UFV 409-05	F <sub>2</sub>
UFV 315-02	F <sub>2</sub>	UFV 335-08	F <sub>2</sub>	UFV 409-06	F <sub>2</sub>
UFV 315-04	F <sub>2</sub>	UFV 335-11	F <sub>2</sub>	UFV 409-08	F <sub>2</sub>
UFV 315-06	F <sub>2</sub>	UFV 335-12	F <sub>2</sub>	UFV 409-12	F <sub>2</sub>
UFV 315-15	F <sub>2</sub>	UFV 335-13	F <sub>2</sub>	UFV 409-13	F <sub>2</sub>
UFV 315-50	F <sub>2</sub>	UFV 335-15	F <sub>2</sub>	UFV 409-14	F <sub>2</sub>
UFV 315-76	F <sub>2</sub>	UFV 335-16	F <sub>2</sub>	UFV 409-16	F <sub>2</sub>
UFV 315-143	F <sub>2</sub>	UFV 335-70	F <sub>2</sub>	UFV 409-17	F <sub>2</sub>
UFV 327-04	F <sub>2</sub>	UFV 335-77	F <sub>2</sub>	UFV 409-18	F <sub>2</sub>
UFV 327-11	F <sub>2</sub>	UFV 335-04	F <sub>2</sub>	UFV 409-20	F <sub>2</sub>
UFV 327-13	F <sub>2</sub>	UFV 335-21	F <sub>2</sub>	UFV 409-29	F <sub>2</sub>
UFV 327-16	F <sub>2</sub>	UFV 335-24	F <sub>2</sub>	UFV 409-30	F <sub>2</sub>
UFV 327-18	F <sub>2</sub>	UFV 335-30	F <sub>2</sub>	UFV 409-34	F <sub>2</sub>
UFV 327-89	F <sub>2</sub>	UFV 341-15	F <sub>2</sub>	UFV 409-36	F <sub>2</sub>
UFV 327-117	F <sub>2</sub>	UFV 399-23	F <sub>2</sub>	UFV 409-41	F <sub>2</sub>
UFV 328-43	F <sub>2</sub>	UFV 399-31	F <sub>2</sub>	UFV 409-42	F <sub>2</sub>
UFV 328-60	F <sub>2</sub>	UFV 399-33	F <sub>2</sub>	UFV 409-43	F <sub>2</sub>
UFV 328-62	F <sub>2</sub>	UFV 399-45	F <sub>2</sub>	UFV 409-47	F <sub>2</sub>
UFV 328-69	F <sub>2</sub>	UFV 402-01	F <sub>2</sub>	UFV 409-48	F <sub>2</sub>
UFV 329-01	F <sub>2</sub>	UFV 402-02	F <sub>2</sub>	UFV 409-49	F <sub>2</sub>
UFV 329-63	F <sub>2</sub>	UFV 402-04	F <sub>2</sub>	UFV 409-51	F <sub>2</sub>
UFV 329-72	F <sub>2</sub>	UFV 402-21	F <sub>2</sub>	UFV 480-06	F <sub>2</sub>
UFV 329-102	F <sub>2</sub>	UFV 402-36	F <sub>2</sub>	UFV 480-11	F <sub>2</sub>
UFV 335-01	F <sub>2</sub>	UFV 402-38	F <sub>2</sub>	UFV 480-12	F <sub>2</sub>
UFV 335-02	F <sub>2</sub>	UFV 402-49	F <sub>2</sub>	UFV 480-14	F <sub>2</sub>
UFV 335-03	F <sub>2</sub>	UFV 404-01	F <sub>2</sub>	UFV 480-15	F <sub>2</sub>
UFV 335-04	F <sub>2</sub>	UFV 409-01	F <sub>2</sub>	UFV 480-26	F <sub>2</sub>
UFV 335-05	F <sub>2</sub>	UFV 409-03	F <sub>2</sub>	--	--
UFV 335-06	F <sub>2</sub>	UFV 409-04	F <sub>2</sub>	--	--

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção assistida para o gene $S_H3$ de resistência à ferrugem

Após os ajustes das condições de amplificação, foram validados quatro marcadores ligados ao gene  $S_H3$  (SP-M16-SH3, Sat244, BA-48-21OR e BA-124-12K), que apresentaram bandas nítidas e padrão de bandas esperado. Três marcadores se comportaram como codominantes, SP-M16-SH3, Sat244 e BA-48-21OR e o marcador BA-124-12K apresentou padrão dominante (Figura 1). No trabalho de Mahé *et al.* (2008), o Sat244 foi relatado como sendo marcador dominante, no entanto, na população do presente estudo ele se comportou como codominante.

Os marcadores validados foram utilizados para amplificar 160 cafeeiros da população obtida do CIFC e introduzida no Brasil como fonte de resistência a ferrugem. Desse total, três marcadores (SP-M16-SH3, BA-124-12KF, Sat244) identificaram 108 genótipos contendo a banda ligada ao gene (67,5%) e, portanto considerados resistentes e 52 genótipos suscetíveis, sem a banda (32,5%). O marcador BA-48-21OR amplificou 107 genótipos resistentes (66,88%) e 53 suscetíveis (33,12%), diferindo dos demais marcadores apenas, para o genótipo UFV 316-13 (F<sub>1</sub>) uma vez que, com esse marcador esse genótipo não apresentou a banda ligada ao gene de resistência. Esse genótipo, provavelmente, consiste em um recombinante.

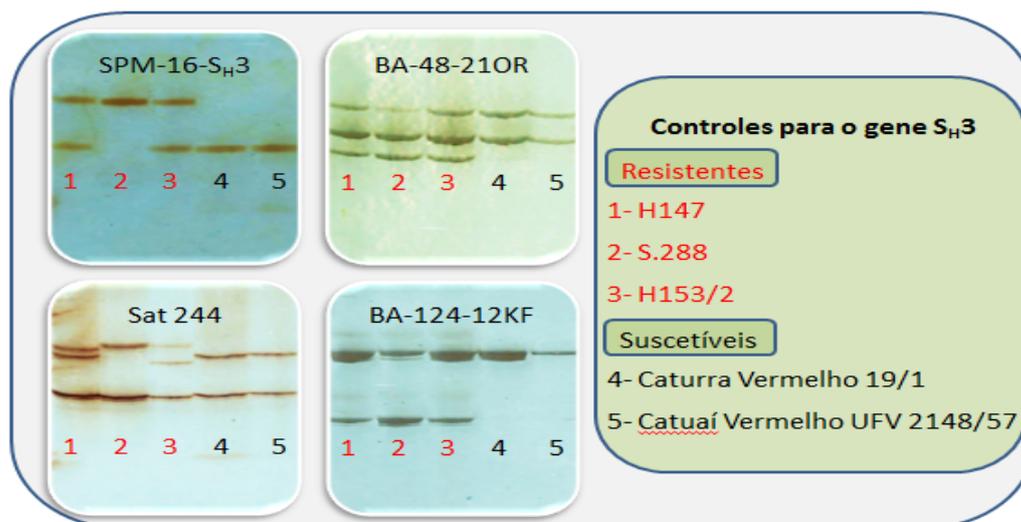


Figura 1. Validação dos marcadores moleculares ligados ao gene S<sub>H</sub>3 que confere resistência à ferrugem, utilizando três genótipos controles sabidamente portadores do gene de resistência e dois sabidamente suscetíveis.

Além da análise dos genótipos como portadores ou não de resistência, foi possível distinguir homozigotos de heterozigotos. Por meio dessa análise, foi possível identificar outros recombinantes. O genótipo UFV 316-13 (F<sub>1</sub>) se mostrou suscetível com o marcador BA-48-21OR, ao passo que com os marcadores SP-M16-SH3 e Sat244 foi heterozigoto e, portanto apresentou a banda para resistência. Os genótipos UFV 327-89 (F<sub>2</sub>), UFV 334-07 (F<sub>2</sub>) e UFV335-70 (F<sub>2</sub>) foram resistentes e heterozigotos para o marcador BA-48-21OR e resistentes homozigotos para os outros dois marcadores codominantes. Foi possível verificar que UFV334-63(F<sub>2</sub>) foi resistentes homozigoto com os marcadores M16-SH3 e BA-48-21OR e resistente heterozigoto com o marcador Sat244. O genótipo UFV334-139 (F<sub>2</sub>), se apresentou resistente e heterozigoto para os marcadores BA-48-21OR e Sat244 e resistente homozigoto para o marcador M16-SH3.

Dessa forma, observou-se que com o marcador M16-SH3 foi obtido um recombinante e com o BA-48-21OR obteve-se quatro recombinantes. Esse resultado encontrado possivelmente se deve ao fato desses marcadores estarem flanqueando o gene S<sub>H</sub>3, a uma distância de 1,8cM e 0,6cM, respectivamente (MAHÉ *et al.*, 2008), podendo, portanto, ter ocorrido possíveis recombinações entre o marcador e o gene.

Apesar de no trabalho conduzido por Mahé *et al.* (2008), o marcador Sat244 está completamente ligado ao gene de resistência S<sub>H</sub>3, no presente trabalho foi observado um recombinante. Mahé *et al.* (2008) estimaram a distância do marcador e do gene em uma população diferente da usada no presente trabalho, além de ter sido utilizado um número reduzido de indivíduo, o que pode justificar a divergência de resultado encontrado.

Na SAM, usando os marcadores validados, foi possível identificar vários indivíduos portadores do gene S<sub>H</sub>3, no entanto, para evitar que tenha ocorrido alguma recombinação e que se tenha mantido o marcador e perdido o gene, deve-se selecionar as plantas que apresentaram todos os marcadores e que esses marcadores estejam flanqueando o gene. Além disso, para maior eficiência na incorporação e condução dos genes de resistência nos programa de melhoramento deve-se selecionar preferencialmente os genótipos resistentes homozigotos. Atendendo esses dois requisitos, nesse trabalho foram selecionados os cafeeiros UFV311-48 (F<sub>2</sub>), UFV 311-56 (F<sub>2</sub>), UFV313-133 (F<sub>2</sub>), UFV329-78 (F<sub>2</sub>), UFV334-65 (F<sub>2</sub>), UFV335-12 (F<sub>2</sub>), UFV335-77 (F<sub>2</sub>), UFV399-45 (F<sub>2</sub>) e UFV409-08 (F<sub>2</sub>). Eles podem ser recomendados nos programas de melhoramento seja para avançar gerações ou como genitores para novos cruzamentos com outros materiais de interesse agrônomico.

### **Seleção assistida para o gene S<sub>H</sub>? proveniente do Híbrido de Timor de resistência à ferrugem**

A identificação de genótipos que apresentem além do gene S<sub>H</sub>3, outros genes para resistência a ferrugem como os genes S<sub>H</sub> provenientes do Híbrido de Timor, é importante para conferir resistência a um maior número de raças do patógeno causador da ferrugem, resultando em maior durabilidade da resistência. Portanto, nesse trabalho foram analisados marcadores SCAR ligados ao gene S<sub>H</sub>? presente no Híbrido de Timor, obtidos no trabalho de Diola *et al.* (2011). Após os testes foram validados para SAM os marcadores SCARM18, SCARM20 e SCARM23. Para validação dos marcadores utilizou-se cinco genótipos controles, sendo três sabidamente portadores do gene de resistência e dois sabidamente suscetíveis. Todos os marcadores se comportaram como dominantes (Figura 2).

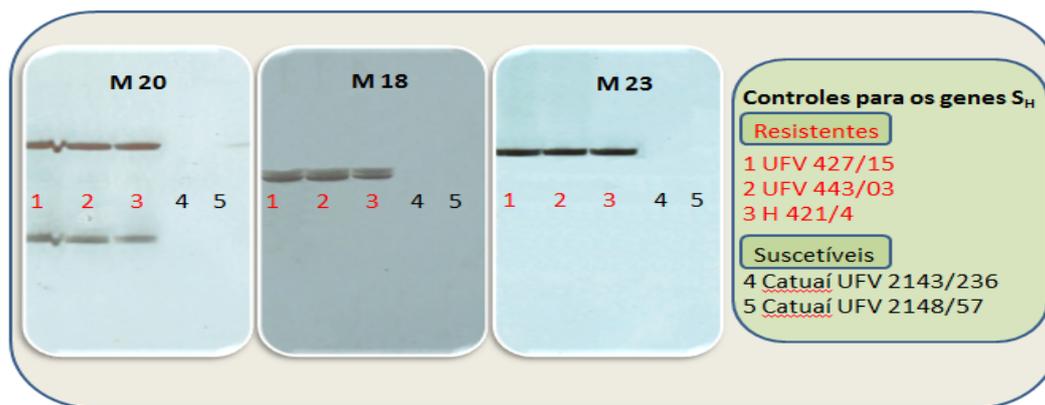


Figura 2. Validação dos marcadores moleculares ligados aos genes  $S_H$  do Híbrido de Timor que conferem resistência à ferrugem, utilizando três genótipos controles sabidamente portadores do gene de resistência e dois suscetíveis.

Na amplificação e posterior análise dos 160 cafeeiros da população de estudo, para o marcador M23, obteve-se um total de 132 genótipos com a presença da banda ligada aos genes de resistência  $S_H$ ? e 28 genótipos sem a banda, suscetíveis. O marcador M20 identificou 129 genótipos com a banda de resistência e 31 com ausência da banda e o marcador M18 identificou 138 genótipos resistentes e 22 suscetíveis. Quando analisado em conjunto os três marcadores foram obtidos 128 genótipos portadores do gene de resistência  $S_H$ ?

Os genótipos UFV328-69 ( $F_2$ ), UFV334-03 ( $F_2$ ), UFV334-09 ( $F_2$ ), UFV334-63 ( $F_2$ ) e UFV335-13 ( $F_2$ ) foram suscetíveis com os marcadores M20 e M23, já com o marcador M18 estes apresentaram a banda para resistência. Observou-se também que os genótipos UFV329-63 ( $F_2$ ), UFV335-03 ( $F_2$ ), UFV402-49 ( $F_2$ ) e UFV409-04 ( $F_2$ ), se apresentaram como portadores do gene para os marcadores M18 e M23 e ausência do gene para o marcador M20. O genótipo UFV334-04 ( $F_2$ ) é portador de resistência para os marcadores M18 e M20 e suscetível para o M23. Portanto, obteve-se cinco recombinantes com o marcador M18, possivelmente por ele estar ligado ao gene de resistência a uma distância de 4,46cM (DIOLA *et al.*, 2011), sendo o mais distante comparado aos marcadores M23 e M20. Com o marcador M20 foi identificado quatro recombinantes, sendo que este marcador está a 1,79cM (DIOLA *et al.*, 2011) de distância do gene. Um recombinante foi observado no marcador M23, mesmo estando a uma distância de 2,68cM do gene (DIOLA *et al.*, 2011), distância essa maior do que a distância do marcador M20. Provavelmente isso ocorreu devido à diferença na população avaliada.

Foram identificados genótipos que além de serem portadores do gene  $S_H3$ , em homozigose, quando analisado os quatro marcadores ligados a esse gene, também apresentaram o genes  $S_H$ ? quando analisados com os três marcadores ligados a esses genes. Tais genótipos são o UFV311-48 ( $F_2$ ), UFV 311-56 ( $F_2$ ), UFV313-133 ( $F_2$ ), UFV334-65 ( $F_2$ ), UFV399-45 ( $F_2$ ) e UFV409-08 ( $F_2$ ).

## CONCLUSÕES

1. Por meio da Seleção Assistida por Marcadores Moleculares, foram identificados cafeeiros portadores de diferentes genes de resistência à ferrugem. Alguns deles contendo mais de um gene.
2. Os cafeeiros identificados poderão ser utilizados no avanço de geração ou em cruzamentos para a introdução desses genes em outros materiais genéticos de interesse nos programas de melhoramento.
3. A utilização dos marcadores moleculares validados, nos programas de melhoramento, serão imprescindíveis para monitoramento dos genes nas diferentes gerações e cruzamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRITO, G.G. de; CAIXETA, E.T.; GALLINA, A.P.; MACIEL- ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M.E. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, v.173, p.255-264, 2010.
- DINIZ, L. E. C.; SAKIYAMA, N. S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; LOUREIRO, M. E.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progênies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.387-393, 2005.
- DIOLA *et al.* High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. **Tree Genetics & Genomes**. 2011.
- MAHÉ, L.; COMBES, M.C.; VÁRZEA, V.M.P.; GUILHAUMON, C.; LASHERMES, P. 2008. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). **Mol Breeding**. 21:105–113.
- PRAKASH, N.S.; MARQUES, D.V.; VARZEA, V.M.P.; SILVA, M.C.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. 2004. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. **Theoretical and Applied Genetics** 109:1311-1317.