

## DIFERENCIAÇÃO DE CLONES RESISTENTES A ESTRESSES BIÓTICOS

H. M. Ortega\*, L. A. Pereira\*, O. Guerreiro Filho\*\*, W. Gonçalves\*\*, M. P. Maluf\*\*\*, L. Padilha\*\*\* (\*Bolsista do CBP&D/Embrapa Café; \*\* Pesquisador Instituto Agronômico de Campinas-IAC); Pesquisador Embrapa Café.

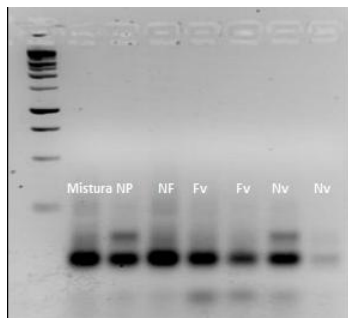
Marcadores moleculares associados às práticas do melhoramento convencional contribuem nas tomadas de decisões em diferentes fases do processo. Eles podem ser utilizados para descartar misturas que podem ocorrer entre materiais genéticos, sejam estes elite, comerciais ou em processo de registro para comercialização. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o polimorfismo de marcadores microssatélites em cafeeiro arábica visando à diferenciação de clones com potenciais para proteção intelectual e comercialização.

Foram avaliados genótipos de *C. arabica*, multiplicados por propagação vegetativa, os quais apresentam resistência ao nematóide *Meloidogyne paranaensis* ou à ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. No viveiro, 900 mudas no estágio de dois a três pares de folhas foram avaliadas, após serem observadas misturas entre os clones. A sensibilidade foi avaliada utilizando diferentes proporções de misturas de DNA dos clones resistentes ao nematóide (N) e à ferrugem (F) nas proporções de 1N:1F; 1N:4F; 1N:10F; 1N:14F e vice versa.

A extração de DNA das folhas seguiu o protocolo DOYLE e DOYLE (1991). A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, com as seguintes concentrações dos componentes da reação: tampão PCR 1X (100mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl); 2mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada *primer* (*forward/ reverse*), 0,5U de DNA Taq polimerase e 30ng de DNA. Os ciclos para amplificações dos locos SSR-EST foram realizadas nas seguintes condições: 94° C por 3 minutos; seguidos de 30 ciclos de 94° C por 1 minuto; temperatura de anelamento de 55° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, e extensão final a 72° C por 2 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 3% por eletroforese a 100 v por 2,5h.

### Resultados e conclusões

O *screening* permitiu identificar polimorfismo do loco LEG 9 (FW: AGG TTT CCA AAG GAG ATG AGC/ RV: GAA GAC AAG TCC ATC GTC CAA) entre os materiais avaliados. Este loco foi então utilizado para avaliação da pureza genética dos clones conduzidos no viveiro, uma vez que foram observadas variações na coloração dos brotos e no porte das mudas clonais. Na figura 1 pode ser observado o padrão de amplificação do LEG 9, onde são observadas duas bandas para o clone resistente ao nematóide e uma única banda no resistente à ferrugem.



**Figura 1:** Amplificação do loco LEG 9 em genótipos de *C. arabica*, em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Mistura: *Bulk* de DNA de mudas, conduzidas no viveiro das mudas resistentes ao nematóide com suspeita de ser mistura do clone resistente à ferrugem com o resistente ao nematóide; NP = Padrão para Nematóide (clone resistente ao Nematóide); NF= Padrão Ferrugem (clone resistente a Ferrugem); FV= *Bulk* de mudas conduzidas no viveiro e que foram agrupadas por possuírem características fenotípicas compatíveis com o genótipo resistente à ferrugem; NV= *Bulk* de mudas conduzidas no viveiro e que foram agrupadas por possuírem características fenotípicas compatíveis com o genótipo resistente ao nematóide.

*Bulks* com 15 indivíduos foram formados para serem submetidos ao screening pelo marcador SSR. O tamanho do bulk foi definido após a avaliação da sensibilidade da técnica PCR para amplificação do loco polimórfico. Na formação destes bulks, também foram consideradas características morfológicas da planta como o porte da muda e a coloração do broto. Vinte e quatro locos SSR-EST foram obtidos do banco de dados do Genoma do Café. Observou-se que dos 60 *bulks* formados, com 15 indivíduos cada, 47% não apresentavam nem um indivíduo contaminante (que neste caso seriam mudas de material resistentes a ferrugem). Por outro lado, cada um dos 53% dos *bulks* restantes apresentava pelo menos uma muda com características de mistura. Neste caso seria necessário abrir estes *bulks* e identificar as mudas misturadas.

**Concluiu-se**, no presente trabalho, que o loco SSR LEG 9 se mostrou polimórfico, podendo ser utilizado para avaliação da pureza genética dos clones resistentes ao nematóide e a resistência à ferrugem.