

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR LIGADO AO PORTE DE PLANTA EM *C. ARABICA*

Paulo M. RUAS (UEL - ruas@sercomtel.com.br), Claudete de Fátima RUAS (UEL), Lucas B. de AZEVEDO (UEL), Valdemar de Paula CARVALHO (UEL), Eduardo A. RUAS (UEL) e Tumoru SERA (IAPAR)

RESUMO: A metodologia de RAPD foi utilizada para identificação de marcador molecular, relacionado com a característica porte da planta em *C. arabica*. DNA de dez plantas de porte alto e dez de porte baixo, obtidas de uma geração F₂, foram extraídos e, após quantificação, reunidos em “bulk”. Os bulks de DNA de plantas de porte baixo e porte alto foram utilizados para amplificação com 120 primers de RAPD. Três primers que sugeriram a presença de marcador específico para porte das plantas foram amplificados com DNA das dez plantas de porte baixo e dez plantas de porte alto, individualmente. Um dos marcadores com aproximadamente 1.2 kb, sugeridos nos bulks foi confirmado, ocorrendo em todas as plantas que apresentavam porte baixo. Nenhuma das plantas de porte alto apresentou este marcador, sugerindo fortemente uma associação com a característica em questão. Em continuidade ao projeto este marcador será clonado e sequenciado para verificar sua relação com a característica porte da planta. Após o sequenciamento, as 24 bases do início e do final do fragmento serão utilizadas para construção de dois primers de PCR específicos (SCAR) que serão utilizados para seleção assistida de plantas de porte baixo.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica*, marcador molecular, RAPD, SCAR, Sequenciamento, porte de planta.

ABSTRACT: RAPD methodology was used in the identification of molecular markers related to plant stature in *C. arabica*. DNA of ten F₂ plants with short and tall stature was extracted. After quantification, ten samples were joined in a bulk of short plants and other of tall plants. The DNA of the two bulks was amplified with 120 RAPD primers. Three primers, which suggested the presence of a specific molecular marker, were amplified with DNA of ten individual short plants and ten tall plants. One of the markers with 1.2 kb in size, was amplified only in the short plants, suggesting that it is associated with this characteristic. In continuity, this marker will be cloned and its sequence determined to define its relationship with the character. Additionally, two specific PCR primers (SCAR) will be designed to screening for short plants.

INTRODUÇÃO

O café é uma planta perene que leva 4 anos para completar um ciclo de semente a semente. Assim, qualquer projeto de desenvolvimento de cultivares do tipo linhagem a partir do cruzamento vai exigir um mínimo de 6 gerações sucessivas (24 anos) para início de liberação de novas variedades de cultivo. Todavia, a exemplo do que ocorre em outras culturas perenes, no café a avaliação de caracteres de interesse agrônomo é realizada no campo, utilizando marcadores fenotípicos que são, na maioria dos casos, pouco precisos do ponto de vista de seleção antecipada, além de apresentar um alto consumo de tempo, espaço, máquinas, insumos e mão-de-obra.

Técnicas que permitem identificar marcadores moleculares ligados a genes que condicionam características de importância agrônoma, representam importantes ferramentas para seleção antecipada, agilizando em muito os programas de melhoramento do café. Uma das metodologias que tem-se mostrado eficiente na identificação de marcadores moleculares que podem ser usados na seleção assistida em plantas é o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Em *C. arabica*, Agwanda *et al.* (1997) identificaram com uso de RAPD, marcadores ligados ao gene que confere resistência ao *Colletotrichum kahawae*.

A avaliação do porte de plantas de café é muito difícil se conduzida em viveiros, podendo induzir a erros já que depende do nível de competição entre as plantas. A identificação de marcador molecular relacionado ao porte da planta, poderá oferecer uma alternativa rápida e eficiente para a identificação de plantas de porte baixo e compacto que, além de facilitar a colheita e reduzir o custo, pode levar a um aumento no potencial produtivo por área plantada. Assim um marcador molecular específico para a arquitetura da planta será importante para os futuros programas de melhoramento genético com seleção assistida.

Marcadores moleculares obtidos por RAPD para diversas características agrônomicas podem ser convertidas em uma sequência amplificada de região característica (SCAR). Portanto, o marcador de SCAR representa uma região específica do genoma que é amplificada por PCR usando um par de oligo-primers (Paran e

Michelmore, 1993). Assim, pretende-se transformar o marcador para porte de planta, identificado com o uso de RAPD, em marcador de SCAR que será útil na seleção precoce de plantas de porte compacto.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a identificação de marcador molecular para o genótipo porte compacto (Ct Ct, Ct ct) foram usadas plantas F₂, obtidas do cruzamento entre o cultivar LCPM376-4 de porte normal (ct ct) do germoplasma Mundo Novo e, como parental de porte compacto (Ct Ct), o cultivar IAPAR-59 do germoplasma Sarchimor.

Extração de DNA

Foi extraído DNA de dez plantas de porte baixo e dez plantas de porte alto da geração F₂. Para a extração de DNA utilizou-se a metodologia utilizada por Diniz *et al.* (2000). Após a extração, o DNA foi quantificado em fluorômetro DyNA Quant 200 da Hoefer-Pharmacia seguindo as instruções do fabricante. Após a quantificação, “bulks” de DNA foram feitos, um com o DNA das plantas altas e outro com o DNA das plantas baixas, conforme Michelmore *et al.* (1991).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Um total de 120 primers foram utilizados para amplificação do DNA contido em bulks obtidos de plantas altas e plantas baixas. Deste total, três primers permitiram identificar uma banda específica para o bulk formado com DNA de plantas de porte compacto, sugerindo que estes poderiam estar associados com esta característica em *C. arabica*. Estes três primers foram então utilizados para amplificação de amostras de DNA obtidas de plantas de portes alto e baixo de uma geração F₂, individualmente. Destes marcadores, somente um com peso molecular de aproximadamente 1,2 kb, que havia sido amplificado no bulk para porte baixo, estava igualmente presente em cada uma das dez plantas individuais (Figura 1), sugerindo uma associação com o fenótipo porte compacto da planta. Em continuidade a este projeto, o maior número possível de plantas de porte alto e baixo deverão ser testadas para a presença ou ausência do marcador. Em seguida este marcador será clonado e sua sequência determinada para estudo da sua relação com a característica. Usando as informações obtidas com sequenciamento serão também construídos dois primers de 24 nucleotídeos para serem usados em PCR específico-SCAR (Paran & Michelmore, 1993) em programas de seleção assistida. Uma das vantagens de se utilizar primers de SCAR é este pode ser convertido em marcador dominante ou codominante (Deng *et al.*, 1997) e, desta forma pode possibilitar a identificação de heterozigotos para o locus Ct. Portanto, este marcador será importante para futuros programas de melhoramento do cafeeiro, na obtenção de plantas de porte compacto, a serem conduzidos pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Dando continuidade a este projeto, mais primers de RAPD estão sendo utilizados para identificar outros marcadores relacionados a característica porte compacto.

CONCLUSÃO

A aplicação da técnica de RAPD mostrou a presença de um marcador molecular associado ao fenótipo porte compacto em *C. arabica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agwanda, C. O., P. Lashermes, P. Trouslot, M. Combes & A. Charrier. 1997. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. *Euphytica* 97: 241-248.
- Deng, Z., S. Shuang, S. Xiao, & F. G. Gmitter Jr. 1997. Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. *Genome* 40: 697-704.
- Diniz, L. E. C., P. M. Ruas, C. F. Ruas & T. Sera. 2000. Polimorfismo genético detectado em 40 variedades e cultivares de *Coffea arabica* utilizando RAPD associado com enzimas de restrição. Proceedings of the III International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry, page 171-175.. Londrina, PR, Brazil.
- Michelmore, R.W., I. Paran & R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828—9832.
- Paran, I., R. W. Michelmore, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in *C. arabica*. *Theor Appl Genet* 85:985-993.

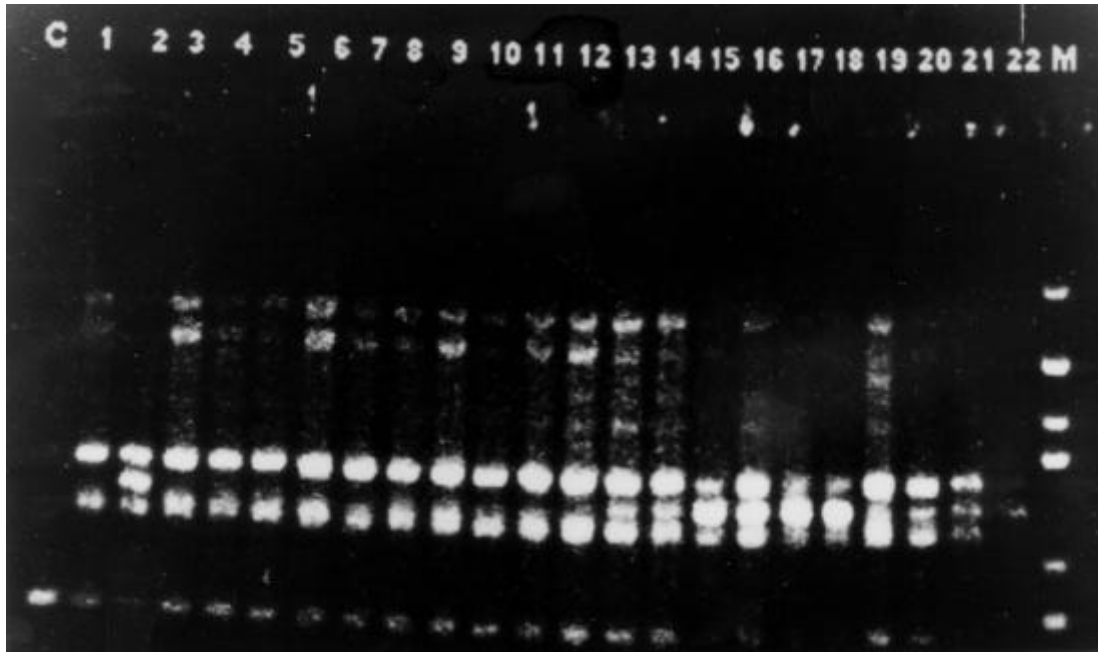


Figura 1. Padrão de amplificação obtido por RAPD em plantas de porte alto e compacto em *C. arabica*. C. Controle; linha 1 e 2 bulkas de plantas de porte alto e baixo, respectivamente; linhas 3 a 12 plantas de porte alto; linhas 13 a 22 plantas de porte compacto. M. marcador molecular *Puc 19*.

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