

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES BAC DE *COFFEA ARABICA* L. HT 832/2 COM MARCAS PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM

Sandra Maria Bellodi Cação²; Nathalia Volpi e Silva³; Lídia Francisca Pereira⁴; Luiz Gonzaga Esteves Vieira⁵, Luiz Filipe Protasio Pereira⁶

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

² Bolsista Consorcio Café, IAPAR, Londrina-PR, sandracacao@sercomtel.com.br

³ IAPAR, Londrina-PR, nathvolpi@hotmail.com

⁴ IAPAR, Londrina-PR, lidiafpr@hotmail.com

⁵ Pesquisador, IAPAR, Londrina, PR, lvieira@iapar.br

⁶ Pesquisador, Embrapa Café, Brasília-DF, lpereira@iapar.br

RESUMO: Bibliotecas BAC (Cromossomo Artificial de Bactéria) têm sido muito utilizadas em mapeamento físico, clonagem posicional, mapeamento comparativo e estudos de evolução de genomas. Visando realizar o mapeamento físico em *C. arabica*, iniciamos a identificação e caracterização de clones BAC de uma biblioteca de *C. arabica* híbrido timor 832/2. O híbrido timor, derivado de um cruzamento interespecífico natural provavelmente entre *Coffea arabica* L. cultivar típica e *Coffea canephora*, apresenta características de importância agrônômica como resistência a diversas raças do fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. A biblioteca contém 55.000 clones BACs com tamanho médio de 120 Kb. Os clones da biblioteca BAC foram inicialmente agrupados em pools de placa, com 384 clones, e superpools contendo 15 pools de placa o que representa 5760 clones. A identificação de BACs de interesse foi realizada através da seleção por PCR nos superpools e pools, seguida por hibridização em filtros de colônia de bactéria contendo 384 clones. Os superpools e pools de placas submetidos à seleção por PCR utilizaram os *primers* baseados em AFLPs relacionados com locus de resistência à ferrugem (BA-48, BA-124). O superpool 07 foi positivo para o marcador BA-48 e os superpools 03, 04, 07 e 08 para o marcador BA-124. Estes superpools foram desmembrados em pools de placa e as placas positivas plotadas em membranas para hibridização com sondas específicas. Os BACs selecionados nas hibridizações foram confirmados através de extração individual dos clones, seguida por PCR para verificação da marca de interesse. Até o momento foram identificados 68 clones BACs para o marcador BA-48 e 85 clones para o marcador BA-124. Os BACs selecionados estão sendo parcialmente sequenciados para o mapeamento físico da região contendo locus de resistência à ferrugem.

Palavras chaves: cromossomo artificial de bactéria, mapeamento, marcador, *Hemileia vastatrix*

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BAC CLONES OF *COFFEA ARABICA* L. HT 832/2 WITH MARKERS FOR RUST RESISTANCE

ABSTRACT: BAC libraries (bacterial artificial chromosome) have been extensively used in physical mapping, positional cloning and comparative studies of genomes evolution. With the aim to map physical genomic regions of *Coffea arabica*, we started the identification and characterization of BAC clones from a *C. arabica* hybrid timor 832/2 library. Hybrid timor, which is derived from a natural interspecific cross probably between *C. arabica* L. typical cultivar and *C. canephora*. The library represents five times the genome of hybrid timor 832/2 *C. arabica*, which is resistant to most races of the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix*. The library contains 55,000 BAC clones, with the average size of 120 Kb. For BAC identification, pooling of the clones was performed for each 384 well plate. After DNA extraction, the pools were grouped to form 15 super-pools of BAC-DNA each one representing approximately 5760 clones. The superpools and plate pools were selected by PCR using primers for rust resistance markers (BA-48, BA-124). One superpool was positive for BA-48 marker and three for the BA-124. These superpools were separated in plate pools and positive plates were plotted in nylon membranes for hybridization with specific probes. The selected BAC clones were confirmed by PCR of individual clones. Until this moment, 68 and 85 clones for the markers BA-48 and BA-124 were selected, respectively. Those BAC clones are currently being partially sequenced and analyzed to physical map this chromosome region.

Key words: bacterial artificial chromosome, mapping, molecular marker, *Hemileia vastatrix*

INTRODUÇÃO

Bibliotecas BAC (Cromossomo Artificial de Bactéria) têm sido muito utilizadas em mapeamento físico, clonagem posicional, mapeamento comparativo e estudos de evolução de genomas. A caracterização dessas bibliotecas para produção de contigs e mapeamento físico pode ser feita através de hibridizações de clones BACs com ESTs gerados pelo Genoma Café e também utilizando marcadores existentes de SSRs, SCARs, RFLPs e AFLPs. Esses marcadores quando integrados aos mapas físicos, são ferramentas úteis para o entendimento da função e estrutura do

genoma, quando o sequenciamento completo do genoma ainda não existe. O mapa integrado também serve de ponto de partida para estudos de elucidação da organização dos genomas e de estudos de mapeamento comparativos entre espécies

A construção de mapas físicos a partir de bibliotecas BACs é possível por técnicas de seleção por PCR de pool de BACs. Para tanto, é necessário um pooling da biblioteca envolvendo combinações de placas seguidas da hibridização. Essa combinação é realizada de forma que um mínimo de reações de PCR seja necessário para identificação de um clone específico dentro da biblioteca (Green e Olsen 1990; Bruno et al.1995). Combinadas, as técnicas de PCR e o condensamento da biblioteca através dos pools representando vários grupos de clones propiciam uma forma econômica de seleção e caracterização da biblioteca, pois com um pequeno número de PCRs e hibridização de membranas contendo clones BACs é possível encontrar uma única sequência alvo (Gardiner et al. 2004). Neste trabalho iniciamos a identificação de BACs de cafeeiro com marcadores moleculares relacionados aos genes de resistência à ferrugem, visando o mapeamento físico dessas regiões.

MATERIAL E MÉTODOS

- POOLING DA BIBLIOTECA

Foi utilizada um biliboteca BAC de *C. arabica* híbrido timor 832/2, com 55 mil clones e 5,5 vezes cobertura do genoma (Cação et al., 2007). Os pools de DNA BAC foram realizados através de análise unidimensional de superpools (Figura 1). O isolamento de DNA dos pools de BACs foi feito através da técnica de lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Para formação dos superpools foram agrupadas concentrações equivalentes de DNA (5ng/ul) de cada 15 placas, formando 10 superpools, cada um representando aproximadamente 5760 clones.



FIGURA 1- Esquema de pools e superpools

- SELEÇÃO DA BIBLIOTECA BAC

Os superpools e pools de placas foram submetidos à seleção por PCR utilizando os *primers* de resistência à ferrugem (BA-48 e BA-124), para seleção de placas. Os produtos foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1.2%.

- MEMBRANAS COM MACROARRANJOS DE CLONES BACS

As placas de 384 poços contendo os clones BACs selecionadas por PCR foram inoculadas em membranas de nylon positivamente carregadas, dispostas sobre meio de cultura LB e posteriormente incubadas a 37° C por 16 horas. Os clones cultivados nas membranas passaram pelo processo de desnaturação e neutralização, seguidos pelo tratamento com proteinase K e fixados na membrana a 80° C por 3 horas.

- HIBRIDIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE MACROARRANJOS COM MARCAS DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM

Para seleção de clones com marcas de resistência à ferrugem, as membranas com os 384 macroarranjos da biblioteca BAC foram hibridizadas com fragmento de DNA resultante da amplificação das sondas BA-48 e BA-124.

Estes fragmentos foram clonados no vetor PCR 2.1–TOPO® cloning, (Invitrogen™) e utilizados como sonda após a digestão utilizando a enzima de restrição *EcoRI* e separação dos fragmentos em gel de agarose. As sondas purificadas do gel foram marcadas com ³²P-dCTP. Após a hibridização, as membranas foram expostas em placa de imagem BAS-IP MS 2340. As imagens foram capturadas utilizando aparelho fluorescent image analyzer FLA 3000 – series (Fuji Photo Film CO, Lts. Tokyo – Japan).

Os BACs selecionados nas hibridizações foram confirmados através da extração do DNA plasmidial de cada clone seguido de PCR para verificação da marca de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- SELEÇÃO DA BIBLIOTECA ATRAVÉS DE PCR E HIBRIDIZAÇÃO DE MEMBRANAS COM MARCAS DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM

Dos dois genes de resistência à ferrugem testados, o BA-48 apresentou amplificação para os superpool 07, já o BA-124 foi positivo para os superpools 03, 04, 07 e 08. Estes superpools foram desmembrados em pools de placas, cinco das quais foram positivas para marca BA-48 e seis apresentaram amplificação para marca BA-124 (Figura 2). Análises preliminares da hibridização das membranas com macroarranjos indicaram 65 clones positivos para a marca BA-48 e 85 para marca BA-124 (Figura 5). A partir destes clones BACs, 11 foram confirmados por PCR para o marcador BA-48 e 25 para o marcador BA-124. Os BACs selecionados estão sendo seqüenciados e analisados por fingerprinting.

Uma vez considerado que essas marcas podem ser empregadas como marcadores moleculares em populações de mapeamento, através destes clones poderemos apontar os primeiros possíveis loci dentro da biblioteca BAC para realizar a integração dos mapas físicos e genéticos. Isto porque poucos marcadores moleculares ligados a genes de resistência à ferrugem foram obtidos até o momento, e os existentes estão ligados a um gene oriundo de *C. Liberica* (SH₃) (Prakash *et al.*, 2004). O híbrido timor é derivado de um cruzamento interespecífico natural entre *Coffea arabica* L. cultivar típica e *Coffea canephora* e apresenta características de importância agrônômica com resistência a diversas raças do fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. A identificação e caracterização de BACs de *C. arabica* híbrido timor, pode auxiliar na identificação de marcas relacionadas a outras raças de ferrugem, originadas de *C. canephora*, devido a introgressão existente neste material.

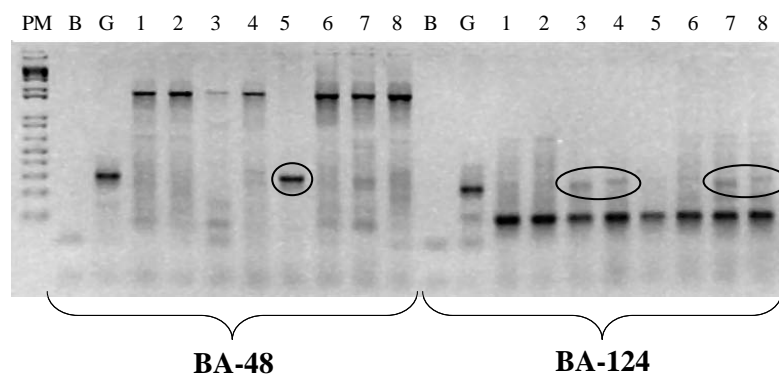


Figura 2- Seleção da biblioteca BAC com as marcas de resistência a ferrugem BA-48 e BA-124. Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de PCR obtidos dos oito superpools. Um superpool amplificou para a marca BA-48 e quatro superpools amplificaram para a marca BA-124. Linhas de 1 a 8 contem os superpools, Branco (B), DNA genômico (G) e o peso molecular 1Kb plus(PM).

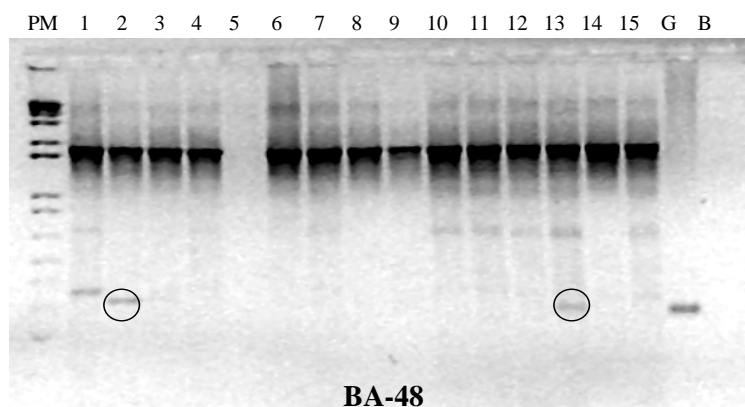


Figura 3- Seleção dos pools placas da biblioteca BAC com a marca de resistência a ferrugem BA-48. Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de PCR dos 15 pools de placa. Linhas de 1 a 15 contem os pools de placa, branco (B), DNA genômico (G) e o peso molecular 1Kb plus(PM).

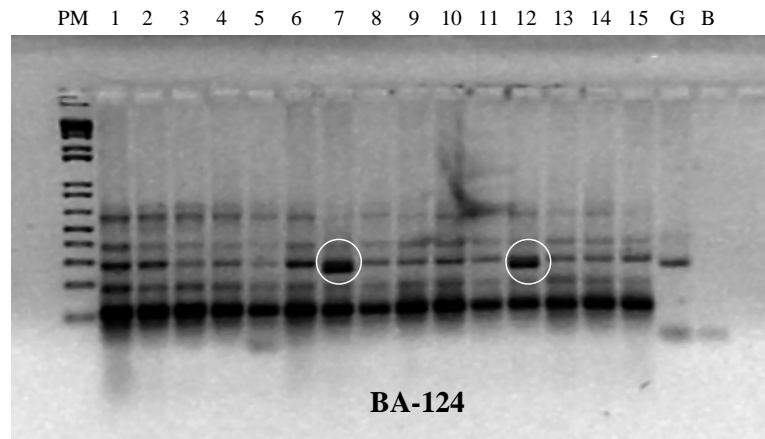


Figura 4- Seleção dos pools placas da biblioteca BAC com a marca de resistência a ferrugem BA-124. Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de PCR dos 15 pools de placa. Linhas de 1 a 15 contem os pools de placa, branco (B), DNA genômico (G) e o peso molecular 1Kb plus(PM).

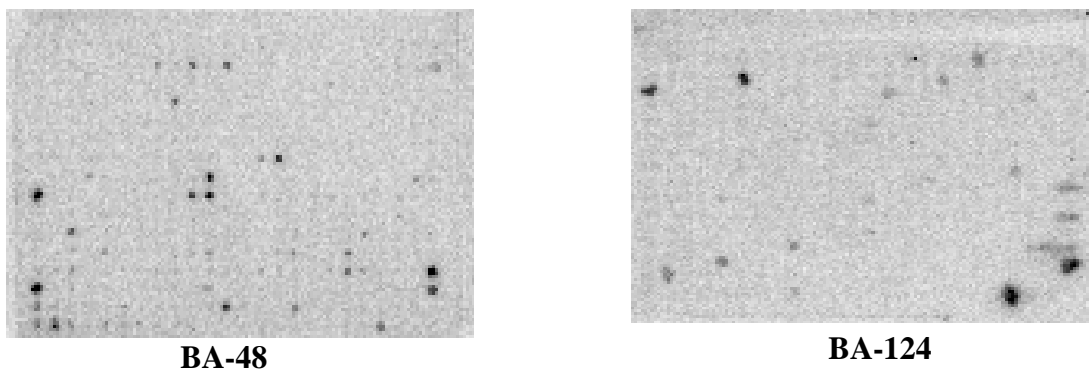


Figura 5- Seleção da biblioteca por hibridização. Membranas com os clones BACs de placas de 384 poços hibridizadas com as sondas BA-48 e BA-124.

CONCLUSÕES

A identificação e caracterização de BACs de *C. arabica* híbrido timor, seguido de fingerprinting e sequenciamento dos clones selecionados e posterior mapeamento físico das áreas selecionadas, auxiliará na identificação de novas marcas relacionadas à ferrugem do cafeeiro,

AGRADECIMENTOS

Projeto financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e de Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café). Sandra M. B. Cação - Bolsista do CBP&D-Café

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTENCOURT, A.J. Características agrônômicas de seleções derivadas de cruzamentos entre Híbrido de Timor e as variedades Caturra, Vila Sarchi e Catuaí. In: **Simpósio sobre ferrugem do cafeeiro**, Oeiras, Portugal: CIFC, 1984, p.353-371, 1983.
- CAÇÃO, S.M.B.; DINIZ, L. C; SILVA, N.V.E. ; VINECKY, F. ; CARVALHO, A. ; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G. (2007). Construção de uma biblioteca genômica de cromossomo artificial de bactéria de *Coffea arabica*. In: **V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007, Águas de Lindóia. Anais do V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Brasília : Embrapa CD-ROM.
- FRITGERS, A.C.J.; ZHANG, Z.; VAN DAMME, M.; WANG, G.L.; RONALD, P.C.; MICHELMORE, R.W. Construction of a bacterial chromosome library containing large *EcoRI* and *HindIII* genomic fragments of lettuce. **Theoretical Applied Genetics** n.94, p.390-399, 1997.
- GARDINER, J.; SCHROEDER, S.G; POLACCO, M.; SANCHEZ VILLEDA, H.; FANG, Z.; MORGANTE, M.; LANDEWE, T.; FENGLER, K.; USECHE, F.; HANAFEY, M.; TINGEY, S.; CHOU, H.; SODERLUND, C.; WING, R.; COE, E. Anchoring 9.371 maize expressed sequenced tagged unigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. **Plant Physiology**. n.134, p.1317-1326, 2004.
- GREEN ED, OLSON MV Systematic screening of yeast artificial-chromossome libraries by use of the polymerase chain reaction. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 1213-1217, 1990.
- PRAKASH, N.S.; COMBES, M.C.; SOMANNA, N.; LASHERMES, P. AFLP analysis of introgression in coffee cultivars (*Coffea arabica* L.) derived from a natural interspecific hybrid. **Euphytica**, n. 124, p. 265–271, 2002.
- WU, F.; MUELLER L.A.; CROUZILLAT,D.; PÉTIARD V.; TANKSLEY S.D. Combining Bioinformatics and Phylogenetics to Identify Large Sets of Single-Copy Orthologous Genes (COSII) for Comparative, Evolutionary and Systematic Studies: A Test Case in the Euasterid Plant Clade. **Genetics**. v.174, n.3, p.1407–1420, 2006.