

OBTENÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR POTENCIALMENTE ENVOLVIDO COM A RESISTÊNCIA DO CAFEIEIRO À FERRUGEM

Bárbara HUFNAGEL Maciel¹, E-mail: biocafe@ufv.br; Eveline Teixeira CAIXETA^{1,2}; Flávia THIEBAUT Andrade¹; Samuel Mazzinghy ALVARENGA¹; Eunize Maciel ZAMBOLIM^{1,3}; Ney Sussumu SAKIYAMA^{1,4}

¹ Universidade Federal de Viçosa (UFV)/ BIOAGRO, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (Biocafê), 36570-000, Viçosa-MG. ² Embrapa Café,

³ UFV/ Departamento de Fitopatologia, ⁴ UFV/ Departamento de Fitotecnia. Apoio financeiro: Apoio financeiro: PNP&D/CAFÉ

Resumo:

O Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC) gerou um banco de dados contendo mais de 200.000 ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Em trabalho preliminar, o banco foi minerado por meio de análise *in silico* e identificaram-se várias seqüências potencialmente associadas à resistência do cafeeiro a patógenos. Visando verificar o envolvimento destas seqüências com a resistência do cafeeiro à ferrugem foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que amplificaram as seqüências mineradas. Noventa pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados utilizando o programa computacional *Primer3*. A estabilidade dos oligonucleotídeos foi verificada por meio do programa *PrimerSelect*®. Diferentes concentrações dos componentes da reação de PCR foram analisadas. Para a amplificação no termociclador, foram avaliadas diferentes combinações de tempo e temperatura, incluindo *touchdown* PCR. Utilizando as condições de reação e amplificação otimizadas, 40 iniciadores foram testados em 12 genótipos resistentes e 12 susceptíveis a *H. vastatrix*. Destes, 29 resultaram em bandas únicas e bem definidas, sendo um polimórfico. Os demais 50 estão sendo testados por PCR. Este trabalho permitiu obter, até o momento, um marcador molecular polimórfico entre os dois grupos de indivíduos resistentes e susceptíveis. Para confirmar a possível ligação e seu potencial, o marcador está sendo testado em diferentes populações do Programa de Melhoramento da UFV/EPAMIG.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*, *Coffea*, ESTs, genoma café.

OBTAINING MOLECULAR MARKER POTENTIALLY INVOLVED WITH COFFEE TREE RESISTANCE TO LEAF RUST

Abstract:

The Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC) generated a database containing more than 200.000 ESTs (Expressed Sequence Tags). In a former work, the bank was mined by *in silico* analyses and several sequences potentially associated with the coffee tree resistance to pathogens were identified. Aiming to verify the involvement of these sequences with the coffee tree resistance to leaf rust, primers were designed to amplify the mined sequences. Ninety specific primers were synthesized using the computational program *Primer3*. The primers stability was tested by the program *PrimerSelect*®. Different PCR conditions were tested: concentrations of components reaction, combinations of time and temperature, including *touchdown* PCR. Using optimized reaction and amplification conditions, 40 primers were tested in 12 resistant and 12 susceptible genotypes to *H. vastatrix*. Twenty nine of those resulted in unique and sharp bands, and only one of these was polymorphic. The remaining 50 synthesized primers are being tested. The 40 specific primers permitted to find one molecular marker polymorphic between the resistant and susceptible genotypes. To confirm the possible linkage and its potential, the marker is being tested in different populations of the UFV/EPAMIG Breeding Program.

Key words: *Hemileia vastatrix*, *Coffea*, ESTs, coffee genome.

Introdução

A principal doença do cafeeiro é a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br. Esta doença ocorre em todas as regiões produtoras de café em todo o mundo. Assim, o estudo e a caracterização de fatores de resistência a este fungo são importantes para a ampliação dos conhecimentos sobre a interação planta-patógeno, podendo ser útil para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle para essa doença, incluindo o melhoramento genético visando o desenvolvimento de variedades resistentes.

A biotecnologia do cafeeiro tem sido potencializada com o Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC). Neste projeto, realizou-se o sequenciamento do genoma funcional das três principais espécies de café, *Coffea arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*, e um banco de dados de mais de 200.000 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) foi disponibilizado (Vieira et al., 2006). As informações geradas pelo PBGC foram utilizadas para identificar genes envolvidos ou ligados à resistência do cafeeiro à ferrugem. Esse banco de dados foi minerado por meio de análise *in silico*, utilizando-se ferramentas de bioinformática. Foram identificadas várias seqüências potencialmente envolvidas na resistência do cafeeiro à ferrugem. Com o objetivo de verificar se os genes ou ESTs identificados estão envolvidos ou ligados à resistência do cafeeiro à ferrugem, oligonucleotídeos iniciadores que os amplificam foram desenhados e testados em genótipos de café.

Material e Métodos

No processo de mineração do banco de dados do PBGC, realizado em um trabalho anterior, foram identificadas 8.968 seqüências que poderiam estar relacionadas com a resistência do cafeeiro à ferrugem. Para uma seleção dessas seqüências mineradas, estabeleceu-se um padrão de prioridade, classificando as ESTs em relação a maior ou menor possibilidade de estarem envolvidas com o processo de resistência do cafeeiro a patógenos. As seqüências foram numeradas de 1 a 4, sendo 1 as ESTs de maior prioridade e 4 as de menor. A priorização foi determinada a partir da análise da anotação automática de cada EST, considerando-se vários fatores, como organismo homólogo, função potencial da seqüência, *E-value*, *score*, porcentagem de *reads* na biblioteca RMI e domínios conservados de proteínas. A partir dessa priorização, as seqüências foram selecionadas e iniciadores específicos que as amplificam foram desenhados.

O desenho dos iniciadores foi realizado no programa computacional *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Nesse programa foram estabelecidas algumas condições (Tabela 1) de forma a favorecer a funcionalidade dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados. O item “Produto de PCR” permite estabelecer o tamanho desejado para o produto da reação. O item “Tamanho de iniciador” permite estabelecer o intervalo desejado para o tamanho do oligonucleotídeo a ser desenhado. Já a “Tm” se refere à temperatura média de fusão do iniciador gerado, estando relacionada à especificidade do mesmo no momento da amplificação. A “Porcentagem de CG” está relacionada com a concentração das bases Citosina e Guanina na seqüência dos iniciadores gerados, interferindo na temperatura de anelamento destes no momento da reação. A estabilidade dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados, nas condições de reação, foi verificada pelo programa computacional *PrimerSelect*®. A estabilidade dos *primers* foi verificada pelo programa computacional *PrimerSelect*®.

Tabela 1 – Condições para o desenho de iniciadores obtidos pelo programa computacional *Primer3*.

CONDIÇÕES PARA O DESENHO DE INICIADORES	
Produto de PCR	400-600 pb e 200-600 pb
Tamanho do Iniciador	18 a 24 pb
Tm	55 a 60° C
Porcentagem de CG	45 a 55

Para testar os oligonucleotídeos iniciadores específicos foram selecionados 24 genótipos do banco de germoplasma da UFV/EPAMIG, sendo 12 susceptíveis e 12 resistentes à ferrugem (Tabela 2). Os genótipos resistentes são importantes fontes utilizadas no Programa de Melhoramento.

Tabela 2 – Genótipos utilizados para o teste dos oligonucleotídeos iniciadores obtidos das ESTs potencialmente envolvidas com a resistência do cafeeiro a patógenos.

Indivíduos susceptíveis à ferrugem			Indivíduos resistentes à ferrugem		
Código	Genótipo	Descrição	Código	Genótipo	Descrição
1	UFV 570	Bourbon Amarelo da China	13	HT 440-22	Híbrido de Timor UFV
2	UFV 2945	Típica C-117	14	HT 443-3	Híbrido de Timor UFV
3	UFV 557-06	<i>Coffea racemosa</i> (triplóide)	15	HT 445-46	Híbrido de Timor UFV
4	UFV 2145-79	Catuaí Vermelho	16	HT 832-1	Híbrido de Timor UFV
5	UFV 2154-345	Catuaí Amarelo	17	HT 832-2	Híbrido de Timor UFV
6	Catuaí 2143-193	Catuaí Amarelo	18	HT 438-52	Híbrido de Timor UFV
7	Catuaí 2143-235	Catuaí Amarelo	19	HT 446-08	Híbrido de Timor UFV
8	Catuaí 2148-57	Catuaí Amarelo	20	CIFC 33-1	CIFC 33-1
9	Mundo Novo 2164-193	Mundo Novo UFV	21	CIFC 1343-269	CIFC 1343-269
10	Mundo Novo 2190-100	Mundo Novo UFV	22	CIFC 4106	CIFC 4106
11	Caturra 812	Caturra Amarelo	23	CIFC 420-10	CIFC 420-10
12	<i>Coffea dewevrei excelsia</i>	<i>Coffea dewevrei excelsia</i>	24	CIFC 147-1	CIFC 147-1

Folhas jovens dos genótipos selecionados foram coletadas, congeladas e liofilizadas. O material genético desses genótipos foi extraído de acordo com o protocolo de Diniz et al. (2005).

Inicialmente, as condições ótimas para a reação de PCR e amplificação do DNA pelos oligonucleotídeos iniciadores obtidos foram estabelecidas. Para isso, diferentes concentrações dos componentes da reação de PCR foram

analisadas, incluindo concentrações e marcas comerciais de *Taq* DNA polimerase, MgCl₂, dNTPs e oligonucleotídeos iniciadores. E para a amplificação no termociclador, foram avaliadas diferentes combinações de tempo e temperatura, incluindo *touchdown* PCR.

Definidas as condições de PCR, os pares de *primers* foram submetidos a testes com os genótipos selecionados (Tabela 1). A reação de PCR foi realizada em 20,0µL de solução contendo 30ng de DNA, 0,8 unidades de *Taq* DNA polimerase, tampão 1x, 1mM de MgCl₂, 60 µM de cada dNTP e 0,7 µM de cada oligonucleotídeos iniciadores. A amplificação foi efetuada em termociclador utilizando-se o procedimento *touchdown* PCR. Este procedimento consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C, por 3 minutos, seguido de cinco ciclos com uma etapa de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, uma etapa de anelamento por 20 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos. A temperatura de anelamento foi de 65 °C a 60 °C, reduzindo 1 °C a cada ciclo. Após os 5 ciclos, procederam-se mais 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 60 segundos, anelamento de 60 °C por 20 segundos e extensão de 72 °C por 40 segundos.

Os produtos resultantes foram separados em gel de agarose 1,2%, corados com Brometo de Etídio e visualização com UV.

Resultados e Discussão

Das 8.968 ESTs potencialmente envolvidas com a resistência do cafeeiro, mineradas do banco de dado do PBGC, selecionou-se 831. A priorização destas 831 seqüências resultou em 41 seqüências de prioridade 1, 11 seqüências de prioridade 2, 55 de prioridade 3 e 724 de prioridade 4 (Figura 1). As seqüências classificadas como prioridades 1, 2 e 3 foram selecionadas para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores específico.

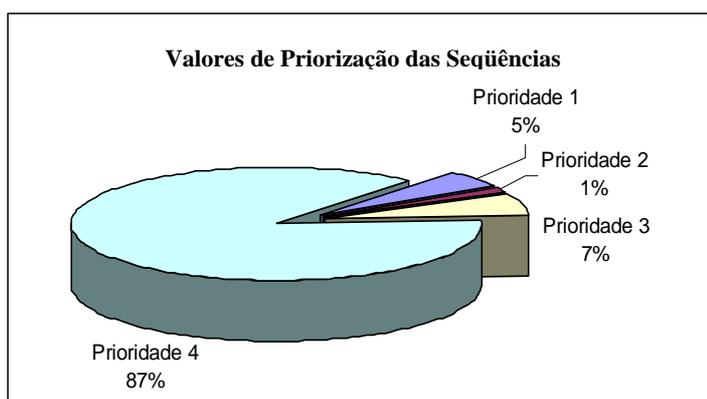


Figura 1 – Valores totais de priorização das seqüências mineradas.

Das 107 seqüências que haviam sido selecionadas, foi possível obter pares de iniciadores, que eram estáveis, dentro das condições estabelecidas, para 90 destas seqüências. Estes pares de iniciadores foram sintetizados.

Quarenta dos noventa oligonucleotídeos gerados foram testados. Desses, 29 amplificaram as seqüências mineradas, apresentando bandas únicas e bem definidas. Somente um iniciador (CARF 005) apresentou polimorfismo entre os indivíduos susceptíveis e os resistentes à ferrugem do cafeeiro (Figura 2).

Este iniciador polimórfico será testado em populações segregantes contendo diferentes genes de resistência, visando verificar a ligação do marcador desenvolvido a partir da EST com os genes de resistência à ferrugem do cafeeiro. O indivíduo 12, *Coffea dewevrei excelsa*, suscetível a todas as raças de *Hemileia vastatrix* existentes no Brasil, teve um fragmento amplificado pelo *primer* CARF 005, diferentemente dos demais indivíduos susceptíveis testados. Para elucidar esse resultado, o fragmento amplificado será seqüenciado e comparado com a seqüência de indivíduos resistentes.

Em relação aos outros 28 oligonucleotídeos iniciadores que não apresentaram polimorfismo, como CARF 028 (Figura 3), é possível que os fragmentos possuam pequenas diferenças dentro da seqüência e, por isso, não puderam ser observadas por eletroforese em gel. A existência desta diferença será verificada com análises de enzima de restrição e seqüenciamento para detecção de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Existe também a possibilidade da diferença estar no padrão de expressão dos genes de indivíduos resistentes e susceptíveis. Para a verificação da expressão diferencial, serão efetuadas análises de RT-PCR e ensaios de macroarranjo.

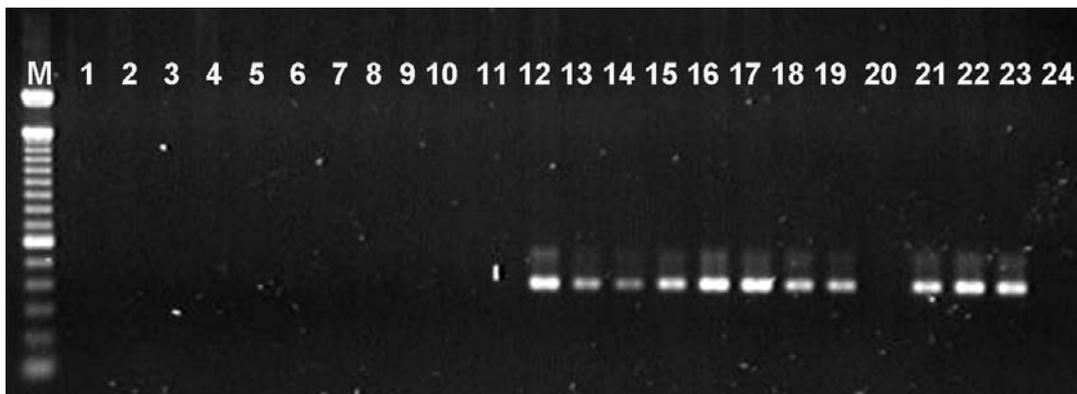


Figura 2 – Iniciador CARF 005 – Iniciador polimórfico entre indivíduos susceptíveis e resistentes à ferrugem. M= Marcador de peso molecular de 100 pb. 1-12 = Indivíduos susceptíveis. 13-24 = Indivíduos resistentes. (ver Tabela 2).

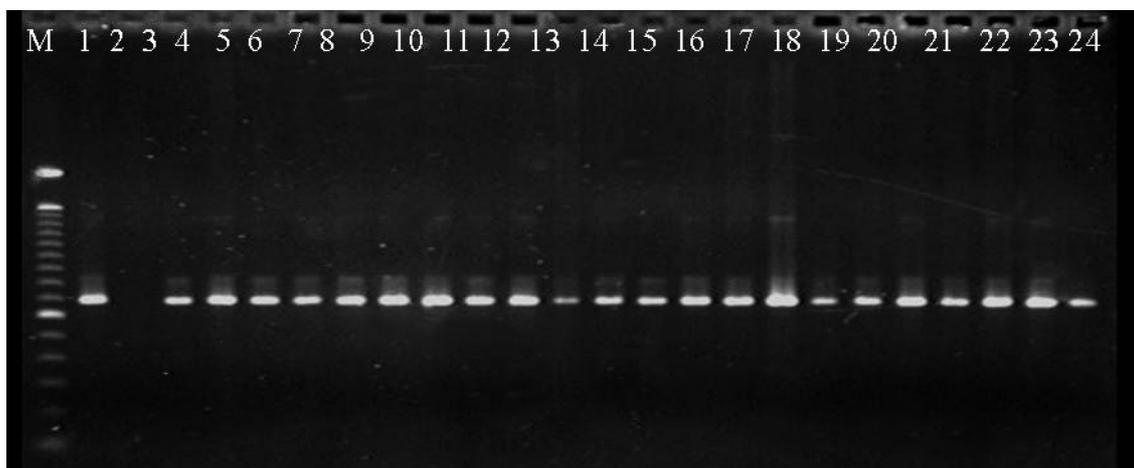


Figura 3 – Iniciador CARF 028. Exemplo de oligonucleotídeo iniciador monomórfico entre indivíduos susceptíveis e resistentes à ferrugem. M= Marcador de peso molecular de 100 pb. 1-12 = Indivíduos susceptíveis. 13-24 = Indivíduos resistentes (ver Tabela 2).

Conclusão

Este trabalho permitiu obter um marcador, desenvolvido a partir das ESTs do Projeto Brasileiro do Genoma Café, potencialmente associado à resistência do cafeeiro à ferrugem. O marcador foi capaz de diferenciar cafeeiros resistentes de suscetíveis. Após a confirmação da ligação com genes específicos de resistência à ferrugem, este marcador poderá ser utilizado para seleção assistida nos programas de melhoramento.

Referências Bibliográficas

Carvalho, V.L.; Chalfoun, S.M. (2000) **Doenças do cafeeiro: Diagnose e controle**. Belo Horizonte: EPAMIG. 44p. (*Boletim Técnico*, 58).

Diniz, L.E.C.; Sakiyama, N.S.; Lashermes, P.; Caixeta, E.T; Oliveira, A.C.B.; Zambolim, E.M.; Loureiro, M.E.; Pereira, A.A.; Zambolim, L. (2005) Analysis of AFLP marker associated to the *Mex-1* resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5:387-393.

Vieira, L. G. E.; Andrade, A. C.; Colombo, C. A.; Moraes, A. H. de A.; Metha, A., et. al. (2006) Brazilian coffee genome project: na EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1):95-108.