

CARACTERIZAÇÃO DE MARCADOR DO TIPO EST-SSR ASSOCIADO COM RESISTÊNCIA AO BICHO-MINEIRO

Adalgisa Soares de Oliveira¹; João Vitor Dutra Molina²; Oliveiro Guerreiro Filho³; Mirian Perez Maluf⁴

1 Bolsista, M.Sc., Centro de Café/IAC, Campinas-SP, gisaoli@hotmail.com

2 Bolsista IC, Unicamp/ IAC, Campinas-SP, candidomolino@gmail.com

3 Pesquisador, D.Sc., IAC, Campinas-SP, oliveiro@iac.sp.gov.br

4 Pesquisador, D.Sc., Embrapa Café/ IAC, Campinas-SP, maluf@iac.sp.gov.br

RESUMO: Um dos fatores que limitam o desenvolvimento de novas cultivares de cafeeiro por Programas de Melhoramento é a dificuldade de seleção precoce para características agrônômicas superiores. Atualmente, marcadores moleculares são utilizados, em diferentes espécies de plantas, como uma ferramenta alternativa e eficiente para seleção de tais características. Portanto, a identificação de marcadores moleculares do tipo microsatélite (ssr) que co-segrem com a resistência ao bicho-mineiro representa um avanço para seleção assistida. Neste estudo, foram identificados marcadores ssr expressos, através de buscas dirigidas aos bancos de ESTs de cafeeiro. Para caracterização dos marcadores EST-SSR, foi avaliada a expressão destes em genótipos resistentes e suscetíveis infestados com bicho-mineiro, através da metodologia de RT-PCR. Dentre os locos EST-SSR investigados um deles apresentou padrão diferencial, uma vez que folhas suscetíveis não apresentaram expressão do loco. O loco foi clonado e sequenciado, a partir de genótipos resistentes e suscetíveis. Análises das sequências permitiram a identificação de 11 alelos, contendo vários polimorfismos de tamanho da repetição e do tipo SNPs. No entanto, nenhum destes polimorfismos apresentou co-relação com a característica de resistência. Análises em andamento visam a caracterização deste loco expresso.

Palavras-chave: Cafeeiro, seleção assistida, expressão diferencial

CHARACTERIZATION OF AN EST-SSR MARKER ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO LEAF-MINER

ABSTRACT The development of new coffee cultivars has been limited by the difficulty in early selection of desirable agronomic traits. Currently, molecular markers have been used as an alternative and efficient selection tool by breeding programs of several plant species. Therefore, identification of microsatellites markers (ssr) that co-segregate with resistance to leaf-miner represent a significant tool for assisted selection. In this study, expressed ssr markers were identified by directed searches on the Brazilian Coffee ESTs Database. Expression of EST- SSR loci was evaluated in susceptible and resistant genotypes infected with the leaf-miner, through RT-PCR. One of evaluated loci exhibited differential expression pattern in susceptible infected leaves, which did not exhibited the marker amplification. The locus was cloned and sequenced from both susceptible and resistant genotypes. Sequence analyses allowed identification of 11 alleles, with several polymorphisms, including motif repeat size and SNPs. However, none of these polymorphisms are co-related with resistance trait. Analyses aiming the characterization of this expressed locus are underway.

Key words: *Coffea*, assisted selection, differential expression

INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas nas lavouras de *Coffea arabica* é o bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidóptera-Lyonetiidae), que representa o maior problema fitossanitário da cultura. Este inseto é considerado de metamorfose completa, passando pelas fases de ovo, lagarta, crisálida e adulta (Sousa et al., 1998). As lesões causadas pelo bicho-mineiro, também denominadas galerias ou minas, tem bordos irregulares, são de coloração amarelo pálido e posteriormente tornam-se pardacentas (Guerreiro-Filho, 1994).

Todo germoplasma de *C. arabica* avaliado até o presente é altamente suscetível ao bicho-mineiro. Assim a seleção de cultivares resistentes, a partir de métodos tradicionais de melhoramento, passa obrigatoriamente pela hibridação interespecífica, tendo espécies diplóides do gênero *Coffea* como parentais doadores de genes de resistência. No Programa de Melhoramento do cafeeiro desenvolvido pelo Centro de Café/ IAC a espécie *C. racemosa* foi escolhida como parental doador de genes de resistência.

A seleção de indivíduos resistentes é realizada em uma primeira etapa no viveiro descartando-se plantas susceptíveis de cada progênie obtidas por cruzamentos dirigidos ou autofecundações. Então as plantas não atacadas, são avaliadas individualmente em laboratório utilizando-se metodologia descrita por Guerreiro-Filho (1994). A avaliação da resistência é feita pelo tipo de reação observada nas folhas. Uma das maiores limitações para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao bicho-mineiro é a dificuldade de seleção precoce desta característica nos genótipos em avaliação. Essas dificuldades são decorrentes não somente do ciclo de vida de longo das espécies de *Coffea*, mas também pela impossibilidade até o momento de se obter plantas homozigotas para a resistência. Neste caso, há uma necessidade de ferramentas que possibilitem uma seleção precoce da característica de resistência.

O uso de marcadores moleculares para seleção-assistida tem sido cada vez mais comum em programas de melhoramento de diferentes espécies de plantas. Em café vários estudos relacionados à identificação de marcadores moleculares estão em andamento. Um deles buscou a identificação de marcadores do tipo microsátélites (ssr) presentes em sequências expressas (EST) e associados com a característica de resistência ao bicho-mineiro (Pinto et al., 2007). Neste estudo um total de 35 locos EST-ssr foi avaliado, em uma população híbrida *C. arabica* X *C. racemosa* (F₂RC₅) segregando para resistência ao bicho-mineiro. No entanto, nenhum deles apresentou polimorfismo entre os genótipos avaliados. Uma análise da posição das repetições ssr nas sequências expressas, no entanto, indicou que estes poderiam ter um papel relevante tanto no controle da expressão do gene quanto na atividade da proteína codificada pelo gene. Esta ação pode então resultar em polimorfismos na expressão do gene, ou funcionais.

Neste contexto, este trabalho buscou uma abordagem alternativa para identificar possíveis polimorfismos funcionais associados à presença de ssr em sequências expressas. Para tal avaliou-se a expressão destes locos em genótipos resistentes e suscetíveis em resposta à infecção pelo bicho-mineiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Busca de Microsátélites (ssr) e Síntese de Oligos: Buscas utilizando o algoritmo BLAST no Banco de sequências ESTs (*expressed sequence tag*) do Projeto Genoma Café foram realizadas para identificação de sequências do tipo ssr. Estas serviram como base para construção de oligos específicos correspondentes a 10 locos de ssr (Pinto et al., 2007).

Instalação de experimentos de infecção controlada de progênies de cafeeiros susceptíveis e resistentes ao bicho-mineiro: Folhas de plantas resistentes (progênie C1215) e suscetíveis ao bicho mineiro (progênie C1215 e cultivar Mundo Novo) foram submetidas à infestação por estes insetos de acordo com método descrito em Guerreiro et al. (1999). Folhas de plantas não infestadas foram

submetidas às mesmas condições e utilizadas como controle. As coletas das folhas para extração do RNA total foram realizadas em quatro estágios de desenvolvimento da praga: oviposição (T1), eclosão da lagarta (T2), lesão em desenvolvimento intermediário (T3) e lesão com lagartas em fase final de desenvolvimento (T4). Após a coleta, as folhas foram imediatamente colocadas em N₂ líquido e armazenadas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA.

Avaliação da expressão de EST-ssr: RNA total foi extraído das folhas tratadas utilizando protocolo comercial à base de Trizol (Invitrogen). Após a extração, RNA total dos diferentes tratamentos foi quantificado por espectrofotometria para padronização da quantidade a ser utilizada para síntese de cDNA pela reação RT-PCR. A síntese de cDNA foi feita de acordo com as recomendações do kit comercial First-Strand (Invitrogen). A expressão de EST-ssr foi avaliada a partir de amplificação destas sequências em cDNAs sintetizados, utilizando-se oligos selecionados nas buscas *in silico*. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação e depois em gel de poliacrilamida 5% com coloração pela prata (Creste et al., 2001) para verificação do número de alelos expressos.

Avaliação de polimorfismos em EST-ssr: Para busca de possíveis polimorfismos no loco SSR-EST identificado (ssr27) este foi amplificado a partir de três *bulks* de plantas resistentes e três de plantas suscetíveis. Após amplificação, os fragmentos foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida para a visualização do número de alelos amplificados e em gel de agarose 1%, para obtenção de fragmento para clonagem. Os amplicons foram purificados, clonados e seqüenciados, de acordo com protocolos convencionais (Sambrook & Russel, 2001)

Análise das sequências: Os fragmentos que foram identificados como ssr contendo a repetição CCA, foram alinhados entre si, usando-se os aplicativos ClustalW e MEGA versão 3.1 (Kumar et al., 2004). A presença de mutações, deleções e/ou inserções nas sequências foi analisada manualmente com o auxílio destes aplicativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo anterior identificou e avaliou possíveis polimorfismos em um total de 30 locos EST-ssr (Pinto et al., 2007). Neste estudo, nenhum dos locos avaliados apresentou polimorfismo co-segregante com a característica de resistência ao bicho-mineiro. No entanto, a posição na sequência codificadora da repetição do microsatélite, em alguns locos, indicava que este poderia interferir com a expressão do gene. Para testar esta possibilidade, neste estudo avaliou-se o padrão de expressão de locos contendo ssr em plantas infestadas pelo bicho-mineiro. Para estas análises após a análise da qualidade dos transcritos totais de todos os materiais avaliados e padronização da quantidade de cDNA por meio da amplificação do loco constitutivo actina, 10 locos ssr foram amplificados. A avaliação da expressão foi feita comparando-se tanto a presença/ausência quanto a intensidade do fragmento amplificado, separado e corado em gel de poliacrilamida. Para a maioria dos locos não foi possível verificar um padrão de expressão diferencial claro entre os diferentes locos, com exceção dos locos SSR14 e SSR15 (Figura 1). Nestes casos, os genótipos suscetíveis apresentam uma aparente diminuição na expressão dos locos, nos tempos T3 (ssr14) e T1 (ssr15) da infestação. Estes resultados podem indicar uma possível função dos ssr no controle da expressão dos genes nos quais eles estão inseridos. Somente um loco apresentou diferença na expressão total de transcritos, sendo expresso somente nos genótipos resistentes ao bicho mineiro (Figura 2). Uma vez que não foi identificado polimorfismo genômico para este loco, este resultado sugere que a presença do ssr poderia estar associada com o controle da expressão deste gene em plantas suscetíveis.

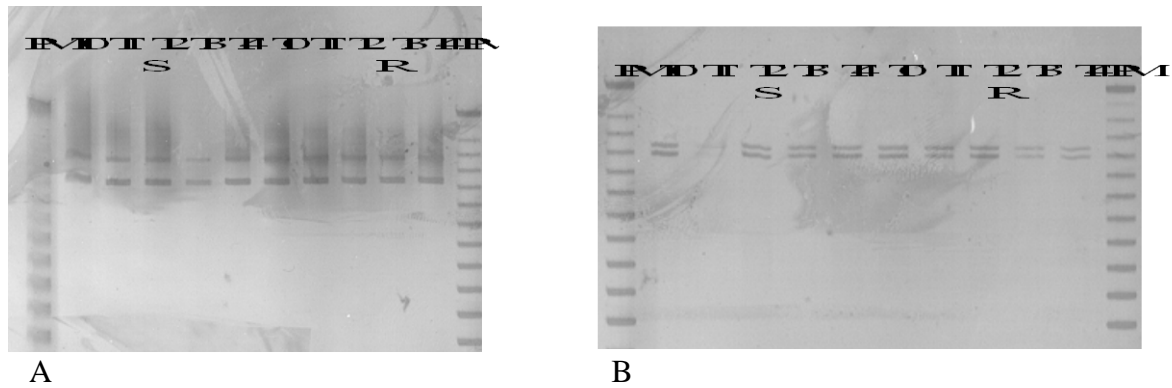


Figura 1. Expressão dos locos EST-SSR 14 (A) e EST-SSR 15 (B) em genótipos de *Coffea arabica* susceptíveis (S) e resistentes (R) não inoculados (controle e T0) e inoculados em diferentes tempos (T1, T2, T3 e T4) com bicho mineiro. PM indica o padrão de peso molecular de 10pb.

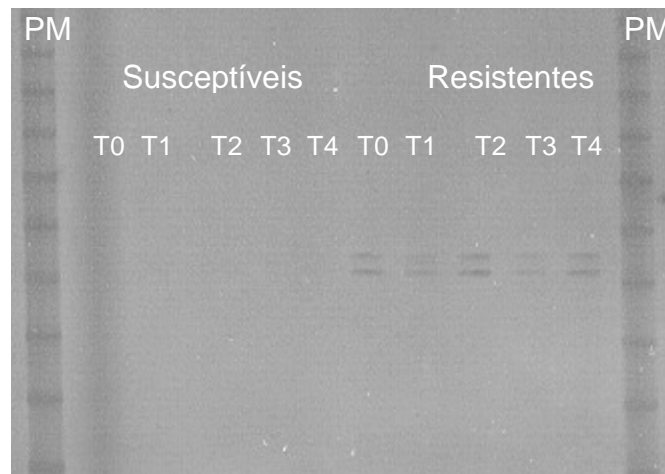


Figura 2. Expressão do loco SSR27 em genótipos de *Coffea arabica* susceptíveis e resistentes não inoculados (T0) e inoculados em diferentes tempos (T1, T2, T3 e T4) com bicho mineiro. PM indica o padrão de peso molecular de 10pb.

Para verificação de possíveis polimorfismos na sequência genômica deste loco *ssr*, entre genótipos resistentes e susceptíveis, este foi clonado e sequenciado. As análises das sequências demonstraram a ocorrência de:

- 3 polimorfismos na região do *ssr* associados com variação no número de repetições do motivo CCA, em plantas susceptíveis e resistentes;
- polimorfismos do tipo inserção e deleção fora da região de microsatélites que não estão relacionadas com a característica de resistência;

- 11 alelos para o loco *ssr27* de plantas resistentes e 8 alelos em plantas suscetíveis.

Com relação aos polimorfismos encontrados entre plantas suscetíveis e resistentes observou-se:

- 3 polimorfismos na região de SSR em plantas suscetíveis:
- polimorfismos do tipo SNPs fora da região de *ssr* em todas as seqüências analisadas. No entanto, uma vez que não são comuns a todos os genótipos avaliados, provavelmente não estão relacionadas com a característica de resistência;
- 3 polimorfismos na região SSR em plantas resistentes:

Os resultados obtidos indicaram a ocorrência de inúmeros polimorfismos. Estes polimorfismos podem ser resultados de variações genômicas entre as plantas que compõe os *bulks*. Assim, não foi encontrado nenhum polimorfismo que co-segregasse com a característica de resistência e/ou suscetibilidade. Análises em andamento visam a clonagem e caracterização da seqüência *ssr27* expressa em plantas resistentes, a fim de identificar possíveis alterações que expliquem as diferenças observadas no padrão de expressão.

Além disto, estes resultados representam uma alternativa para a identificação de polimorfismos eficazes para uso em seleção assistida, e também uma via para análises futuras que visem a caracterização do papel dos *ssr* em genomas de plantas.

CONCLUSÕES

A presença de microsatélites em seqüências transcritas pode alterar a expressão de genes em diferentes genótipos, como observado para os locos *ssr* 14, 15 e 27.

O loco *ssr27* apresenta inúmeros polimorfismos genômicos, que apesar de frequentes, não explicam uma possível função no controle da expressão do loco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Mol Biol Rep**, 19, p. 229-306, 2001.
- GUERREIRO-FILHO, O. Identification de genes de résistance a *Perileucoptera coffeella* em vue de l'amélioration de *Coffea arábica* : Potentiel d'espèces diploïdes du genre *Coffea*; genes de *Bacillus thuringiensis*. 173p. These de Doctorat. ENSAM, Montpellier, 1994.
- GUERREIRO-FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B.; ESKES, A.B. Expression and mode of inheritance of resistance of leaf miner. **Euphytica**, v.105, n.1, p.7-15, 1999.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, v. 5, p. 150-163. 2004.
- PINTO, F. O.; GUERREIRO-FILHO, O.; MALUF, M.P. Study of simple sequence repeats from coffee expressed sequences associated with leaf-miner resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42 (3), p. 377-384, 2007.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor New York. 3th edition, 2001.
- SOUZA, J.C. de; REIS, P.R.; RIGITANO, R.L. de O. Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte: EPAMIG. 48p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 54), 1998.