

IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMO ARTIFICIAL DE BACTÉRIA CONTENDO GENE DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM CAFEIEIRO¹

Samuel Mazzinghy Alvarenga²; Giselle Batista Pinto³; Eveline Teixeira Caixeta⁴; Valdir Diola⁵; Eunize Maciel Zambolim⁶; Laércio Zambolim⁷; Ney Sussumu Sakiyama⁸

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (Consórcio Pesquisa Café), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

²Doutorando em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, samalvarenga@gmail.com

³Graduanda em Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Iniciação Científica PIBIC/CNPq, giselle.pinto@ufv.br

⁴Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café, Brasília-DF, eveline.caixeta@embrapa.br, autor para correspondência

⁵Professor, D.Sc., Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, valdirdiola@ibest.com.br

⁶Pesquisadora, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, eunize@ufv.br

⁷Professor, Ph.D., Universidade Federal de Viçosa, zambolim@ufv.br

⁸Professor, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, sakiyama@ufv.br

RESUMO: O estudo e a caracterização de fatores genéticos de resistência são importantes para ampliar os conhecimentos da interação planta-patógeno. O marcador molecular CARF 005, identificado em trabalho anterior, é capaz de identificar um fragmento de gene de resistência a doenças presente em genótipos de cafeeiro resistentes a ferrugem, principal doença da cultura. Neste trabalho, o CARF 005 foi utilizado para fazer o *screening* de uma biblioteca BAC de *Coffea arabica* com 56.832 clones. Foram identificados dois clones contendo o fragmento do gene de resistência. Após o sequenciamento, esses poderão ser usados para estudo da estrutura do gene e, eventualmente, em obtenção de plantas transgênicas para auxiliar programas de melhoramento.

Palavras-Chaves: *Coffea arabica*, genoma, marcador molecular

IDENTIFICATION OF BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOME CONTAINING A COFFEE DISEASE RESISTANCE GENE

ABSTRACT: The study and characterization of genetic factors of disease resistance are important to broaden the knowledge of plant-pathogen interaction. The molecular marker CARF 005, identified in previous work, is able to identify a disease resistance gene fragment present in coffee genotypes resistant to rust, the main disease of this crop. In this work, CARF 005 was used to perform the screening of a BAC library containing 56,832 *Coffea arabica* clones. We identified two clones containing the disease resistance gene fragment. After sequencing, they might be used to study gene structure and, eventually, production of transgenic plants to aid breeding programs.

Key words: *Coffea arabica*, genome, molecular marker

INTRODUÇÃO

Doenças e pragas constantemente afetam a produção do café. Dentre elas destaca-se a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, a qual acarreta maiores prejuízos à cultura cafeeira. O estudo e a caracterização de fatores genéticos que conferem resistência a este fungo são importantes para ampliar os conhecimentos da interação planta-patógeno. O sequenciamento de genoma de plantas tem facilitado e acelerado a identificação de genes desejáveis, possibilitando a sua manipulação subsequente por meio de técnicas de genética molecular. A biotecnologia do cafeeiro foi potencializada com o Projeto Brasileiro do Genoma Café.

O projeto Brasileiro do Genoma Café teve início em 2002 e resultou num banco de dados de aproximadamente 200 mil ESTs (Vieira *et al.*, 2006). Partindo desses dados, Alvarenga, (2007) realizou análises *in silico* a fim de encontrar sequências de genes relacionados com o mecanismo de resistência do cafeeiro a doenças. Por meio da mineração desses dados foi possível identificar 14.060 ESTs associadas a esta característica.

Visando verificar o envolvimento destas sequências com a resistência do cafeeiro a ferrugem, Alvarenga (2007) obteve 40 *primers* para amplificar algumas das sequências mineradas. Utilizando as condições de reação e amplificação otimizadas, os 40 *primers* foram testados em 12 genótipos resistentes e 12 susceptíveis a *H. vastatrix*. Vinte e nove destes 40 *primers* resultaram em bandas únicas e bem definidas, sendo um polimórfico. Esse marcador polimórfico, denominado CARF 005, amplifica uma região do DNA que corresponde a um ORF (*Open Reading Frame* – Janela Aberta de Leitura) parcial de *Coffea arabica* que codifica uma proteína de resistência a doenças.

Para estudar em detalhes o gene de resistência a doenças, amplificado pelo CARF 005, é preciso obter a sua sequência completa. Genes de resistência a doenças foram clonados e caracterizados em plantas mono e dicotiledôneas (Hammond-Kosack e Jones, 1997). A literatura relata mais de 50 genes de resistência clonados em várias espécies de plantas (Wenkai *et al.* 2006).

Uma das formas de conseguir isso é por meio da identificação desse fragmento no genoma de *C. arabica* e posterior sequenciamento das regiões adjacentes.

O Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina) construiu uma biblioteca de BACs (*Bacterial Artificial Chromosome* – Cromossomo Artificial de Bactéria). Essa biblioteca possui 56.832 clones contendo fragmentos de DNA genômico de *C. arabica* HT 832/2 (Cação et al., 2007).

Assim, com a utilização do marcador CARF 005 e a biblioteca de BAC de *C. arabica*, o objetivo do presente trabalho foi realizar um *screening* desta biblioteca utilizando o marcador CARF 005 para identificar o(s) clone(s) contendo o fragmento do gene de resistência a doenças. Essa constitui a etapa inicial da clonagem e análise desse gene de resistência do cafeeiro a ferrugem. Após a clonagem, será possível realizar estudos sobre a estrutura do gene e, eventualmente, utilizá-lo na obtenção de plantas transgênicas para auxiliar programas de melhoramento.

MATERIAL E MÉTODOS

A biblioteca de BAC de *C. arabica* Híbrido de Timor 832/2 foi disponibilizada pelo IAPAR (Cação et al. 2007). Uma cópia dessa biblioteca se encontra no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, UFV, sendo composta por um total de 56.832 clones. Esses clones estão armazenados em 148 placas, as quais possuem 24 colunas e 16 linhas, totalizando 384 poços. Cada placa foi virtualmente dividida em duas meias placas, contendo, cada uma, 12 colunas e 16 linhas. Desta forma, cada meia placa contém 192 clones. Essas meias placas foram numeradas de 1A a 148B. Posteriormente foi realizada a extração do DNA dos clones de cada uma das 296 meias placas em conjunto (*pools*). Ou seja, cada tudo de *ependorf* continha um *pool* de DNAs correspondentes aos clones de uma meia placa. A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo para recuperação de DNA de BACs-Mini-Prep (Diola, 2009). O DNA extraído foi quantificado e diluído para a concentração de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Após a extração e diluição, esse material foi devidamente armazenado em *ultrafreezer* -80°C no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, UFV.

Para a identificação dos clones positivos, ou seja, identificação de clones de BAC que continham o fragmento de gene de resistência a doenças amplificado pelo *primer* CARF 005, realizou-se um *screening* da biblioteca BAC. O *screening* consistiu em amplificar as amostras de *pools* de DNA por meio de PCR utilizando o *primer* específico CARF 005 (Alvarenga, 2007). As etapas de amplificação compreenderam em *hot-start* de 94°C por 180 segundos, seguido de 5 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 20 s e 72°C por 40 s e 30 ciclos de 94°C por 60 s, 60°C por 20 s, 72°C por 40 s. Foi realizada uma extensão adicional de 72°C por 40 s. Para um volume final de $20 \mu\text{L}$ foram utilizados $3 \mu\text{L}$ de solução de DNA ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Os demais reagentes foram: $2 \mu\text{L}$ de tampão de reação de PCR 10x (Invitrogen), $0,4 \mu\text{L}$ de MgCl_2 (50mM) (Invitrogen), $0,6 \mu\text{L}$ de dNTP (2mM cada) (Invitrogen), $0,7 \mu\text{L}$ de cada *primer* (2 μM) e $0,16 \mu\text{L}$ de Taq Polimerase (5U/ μL) (Invitrogen). Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA provenientes de genótipos de *C. arabica* que comprovadamente são amplificados pelo *primer* CARF 005 (Alvarenga, 2007). Como controle negativo, utilizou-se água.

Todos os produtos de reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, a 110 Volts por aproximadamente 40 minutos. Após a eletroforese, o gel foi colocado em uma bandeja contendo solução de brometo de etídeo (0,50mg/L), sob agitação, por 5 a 10 minutos. Em sequência, o gel foi submetido à luz ultravioleta e fotografado com transiluminador Eagle Eye® II (Stratagene).

Na identificação do(s) clone(s) positivo(s), utilizou-se o método de decomposição de *pools*, consistindo em 3 etapas:

1ª etapa – Identificação da(s) meia(s) placa(s) contendo clone(s) positivo(s)

2ª etapa – Identificação da(s) coluna(s) positiva(s), da(s) meia(s) placa(s) positivas encontrada(s) na etapa anterior

3ª etapa – Identificação dos clones positivos, utilizando as colunas positivas obtidas na etapa anterior.

Para repicagem das placas foi utilizado, em cada poço, $70 \mu\text{L}$ do meio de cultura composto por 13mM de KH_2PO_4 , 36mM de K_2HPO_4 , 1,7mM Citrato de Sódio, 6,8 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5% de Glicerol, 1% de Triptona, 0,5% de extrato de levedura e NaCl. Após a inoculação das BACs, submeteu-se a placa a uma temperatura de 37°C , em aproximadamente 150 rpm de agitação por 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a análise, por PCR, dos 296 *pools* de DNA, que correspondem as meias placas da biblioteca de BAC, foram identificados 2 *pools* positivos, as meias placas 78B e 144B (Figura 1).

A meia placa 78B foi repicada e na segunda etapa de decomposição dos *pools* desta meia placa foram identificados 2 *pools* positivos (14 e 18) (Figura 2). Na terceira etapa de decomposição, dois clones positivos pertencentes a coluna 14 foram identificados (Figura 3).

O resumo dos resultados obtidos nas etapas de decomposição dos *pools* está apresentado na Figura 4. Nessa figura é possível observar as etapas de decomposição de *pools*. A 1ª etapa constitui na identificação de meias placas positivas. A 2ª etapa, a identificação de colunas positivas utilizando meias placas positivas encontradas na 1ª etapa de decomposição. A 3ª etapa apresenta a identificação do(s) clone(s) positivo(s) utilizando colunas positivas encontradas. Nesta figura são representadas especificamente as etapas positivas da meia placa 78B, que permitiu identificar dois clones positivos.

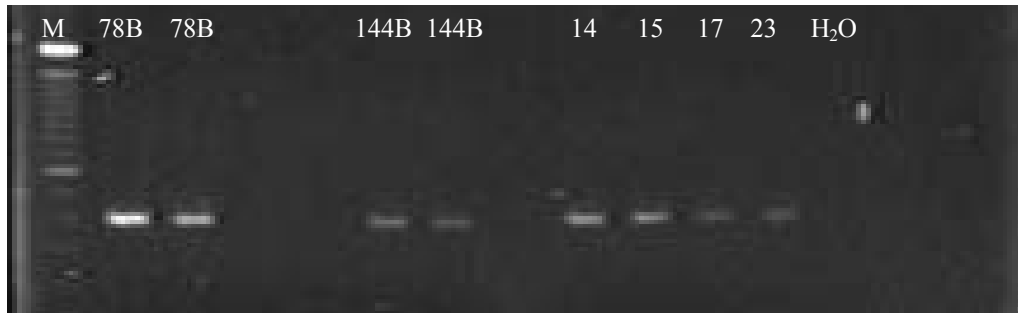


Figura 1 – Identificação de dois *pools* contendo clones positivos. M = Marcador de peso molecular 100pb. Meia placa 78B e 144B. Controles positivos: 14 (Híbrido de Timor UFV 443-3), 15 (Híbrido de Timor UFV 445-46), 17 (Híbrido de Timor CIFC 832/2) e 23 [CIFC H420-10 = Mundo Novo (CIFC 1535/33) x HW 26/14 (Caturra Vermelho CIFC 19/1 x HT CIFC 832/1)] H₂O = Controle negativo.

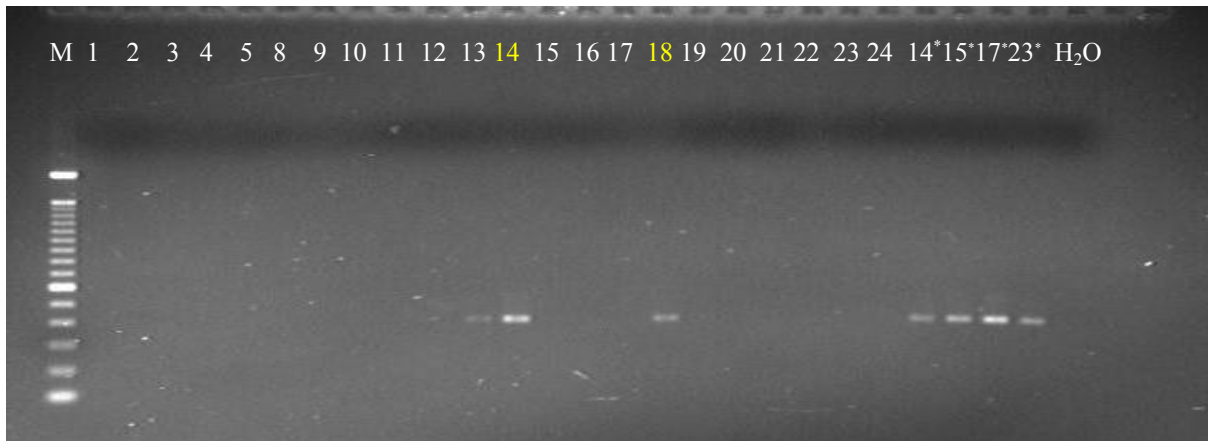


Figura 2 – Identificação das colunas contendo clones positivos da meia placa 78B. M = Marcador de peso molecular 100pb. 1-12 = Clones da meia placa 77B. 13-24 = Clones da meia placa 78B. 14* (Híbrido de Timor UFV 443-3), 15* (Híbrido de Timor UFV 445-46), 17* (Híbrido de Timor CIFC 832/2) e 23* [CIFC H420-10 = Mundo Novo (CIFC 1535/33) x HW 26/14 (Caturra Vermelho CIFC 19/1 x HT CIFC 832/1)] = Controles positivos. H₂O = Controle negativo.

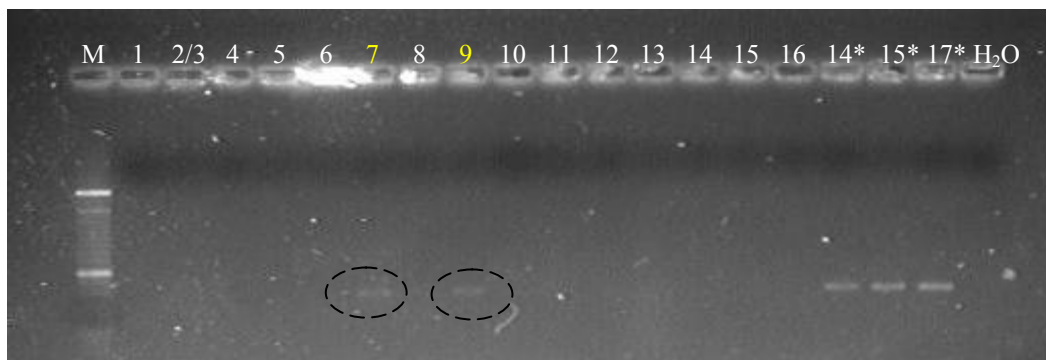


Figura 3 – Identificação dos clones positivos da coluna 14, da meia placa 78B. 1-16 = Colunas da meia placa 78B. 14* (Híbrido de Timor UFV 443-3), 15* (Híbrido de Timor UFV 445-46) e 17* (Híbrido de Timor CIFC 832/2) = Controles positivos. H₂O = Controle negativo.

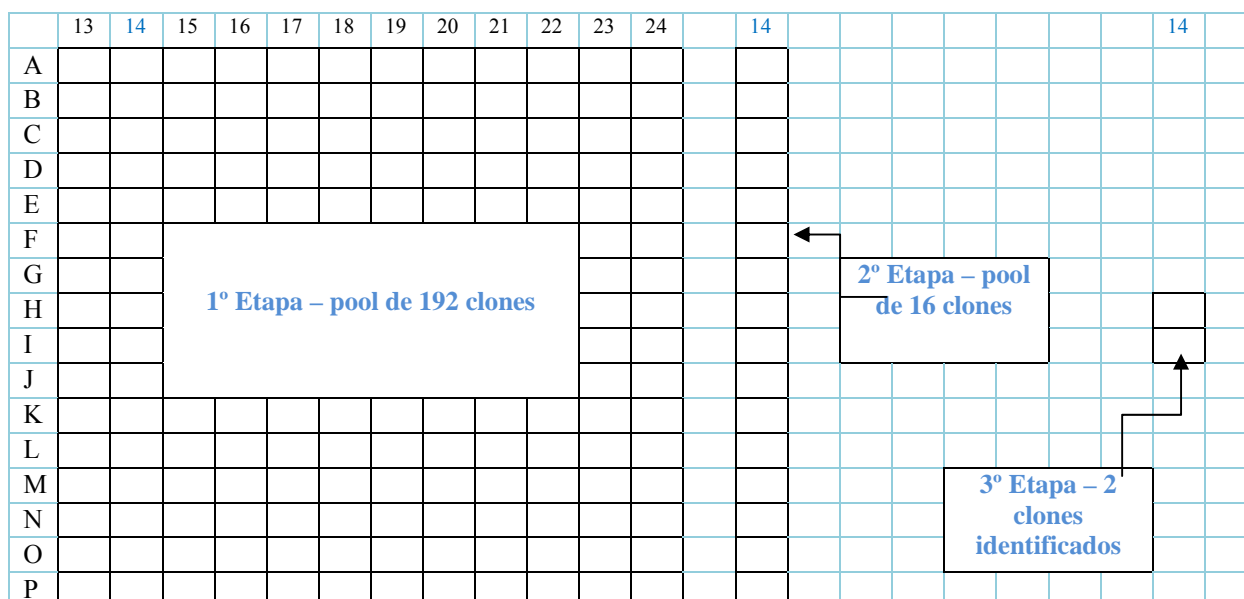


Figura 4 – Representação das etapas utilizadas para a identificação do(s) clone(s) que possuem fragmento de gene de resistência amplificado pelo *primer* CARF 005 da meia placa 78B.

Os dois clones identificados podem fornecer informações importantes sobre a estrutura dos genes de resistência em *Coffea*. Após o sequenciamento, será possível analisar toda a extensão do gene de resistência amplificado parcialmente pelo CARF 005. Desta forma, será possível saber o número de introns e exons que compõem esse gene. Além disso, será possível conhecer a região promotora do gene. Os promotores representam elementos essenciais que podem trabalhar em conjunto com outras regiões regulatórias para direcionar o nível de transcrição de um gene (Lewin, 2000). A partir da análise dessas regiões, será possível ampliar o conhecimento sobre a modulação da expressão desse gene em casos de interação planta-patógeno.

Após os estudos sobre a estrutura do gene, a sua clonagem poderá ser usada na obtenção de plantas transgênicas. A transgenia é uma das tecnologias que pode ser utilizada nos programas de melhoramento de plantas. Essa tecnologia oferece duas oportunidades aos melhoristas. Uma é a introdução de uma nova variação genética que não se encontra disponível no germoplasma do programa de melhoramento, e a outra é a criação de fenótipos desejados a partir de genes conhecidos (Zhong, 2001).

O potencial da tecnologia de transformação genética no melhoramento de culturas foi bem demonstrado na comercialização de variedades e híbridos com novas características transgênicas como resistência a doenças e a insetos (During, 1996; Jouanin et al., 1998) e tolerância a herbicidas (Tsafaris, 1996).

Em café, vários trabalhos envolvendo clonagem gênica e transformação já foram realizados. Entre eles destacam-se o gene que codifica a subunidade menor da rubisco (Marraccini et al., 2003), os três genes envolvidos na síntese de cafeína (Uefuji et al., 2003) e posteriormente a obtenção de café descafeinado (Ogita et al., 2003), e mais recentemente o gene SH3 (Lashermes et al., 2008), que confere resistência a *Hemileia vastatrix* (Sera et al., 2007).

CONCLUSÕES

Partindo de uma biblioteca BAC contendo 56.832 clones distintos, foi possível identificar dois clones contendo fragmento de gene de resistência amplificado pelo marcador CARF 005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, S. M. **Caracterização de sequências expressas do genoma café potencialmente relacionados com a resistência a doenças**. Viçosa: UFV, 2007. 107p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)- Universidade Federal de Viçosa. 2007
- CAÇÃO, S.M.B.; DINIZ, L. C; SILVA, N.V.E. ; VINECKY, F. ; CARVALHO, A. ; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G. **Construção de uma biblioteca genômica de cromossomo artificial de bactéria de *Coffea arabica***. In: V Simpósio de Pesquisa dos Cafês do Brasil, 2007, Águas de Lindóia. Anais do V Simpósio de Pesquisa dos Cafês do Brasil. Brasília : Embrapa CD-ROM.

- DIOLA, V. **Resistência à ferrugem do cafeeiro: mapeamento genético, físico e análise de expressão gênica em resposta a infecção de *H. vastatrix***. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 90 folhas. 2009.
- DURING, K. Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. **Molecular Breeding**, 2: 297–305. 1996.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. e JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48:575-607. 1997.
- JOUANIN, L., BONAIDE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, 131: 1–11. 1998.
- LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; MAHÉ, L.; RIBAS, A.; DECHAMP, E.; ETIENNE, H. 2008. Exploitation of synteny for positional gene cloning in coffee: [Abstract] In: **Abstracts of Plant and Animal Genomes XVIIth Conference**, San Diego, CA (USA), January 12-16, 2008. [Online].
- LEWIN, B. Genes VII. Oxford University Press. 2000.
- MARRACCINI, P.; COURJAULT, C.; CAILLET, V.; LAUSANNE, F.; LEPAGE, B.; ROGERS, W. J.; TESSERAU, S.; DESHAYES, A. 2003. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter 35 analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 41:17–25. 2003.
- OGITA, S.; UEFUJI, H.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. 2003. Producing decaffeinated coffee plants. **Nature**, 423:823. 2003.
- SERA, G. H.; SERA, T.; ITO, D. H.; AZEVEDO, J. A.; MATA, J. S.; DÓI, D. S.; FILHO, C. R.; KANAYAMA, F. S. 2007. Resistance to Leaf Rust in Coffee Carrying SH3 Gene and others SH Genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 50:753-757. 2007.
- TSAFTARIS, A., 1996. The development of herbicide-tolerant transgenic crops. **Field Crops Research**, 45: 115–123. 1996.
- UEFUJI, H.; OGITA, S.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Molecular Cloning and Functional Characterization of Three Distinct N-methyltransferases Involved in the Caffeine Biosynthetic Pathway in Coffee Plants. 2003. **Plant Physiology**, 132:372–380. 2003.
- VIEIRA, L.G.E., ANDRADE, A.C., COLOMBO C.A., MORAES, A.H.A., METHA, A., OLIVEIRA, A.C., LABATE, C.A., MARINO, C.L., MONTEIRO-VITORELLO, C.B., MONTE, D.C., *et al.* (2006) Brazilian coffee genome project: An EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18:95-108.
- WENKAI, X.; MINGLIANG, X.; JIUREN, Z.; FENGGE, W.; JIANSHENG, L. and JINGRUI, D. Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 113:63-72. 2006.
- ZHONG, G. Y. Genetic issues and pitfalls in transgenic plant breeding. 2001. **Euphytica**, 118: 137–144. 2001.