

CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA GENÔMICA DE CROMOSSOMO ARTIFICIAL DE BACTÉRIA DE *Coffea arabica*

Sandra M. B. CAÇÃO¹, E-mail: sbcacao@sercomtel.com.br; Leandro E. C. DINIZ; Nathalia V. SILVA¹; Filipe VENIKY²; Alan Carvalho ANDRADE²; Luiz Filipe P. PEREIRA³; Luiz Gonzaga E. VIEIRA¹

¹Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR; ²Embrapa Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília - DF; ³Embrapa Café - Brasília - DF

Resumo:

A produção de mapas físicos em plantas tem grande importância para estudos de genética e melhoramento. O passo inicial para produção destes mapas é a construção de bibliotecas genômicas com largos fragmentos de DNA, em vetores do tipo cromossomo artificial de bactéria (BAC) ou de levedura (YAC). Visando a produção de um mapa físico, o objetivo deste trabalho foi construir uma biblioteca genômica de BAC de café. Fragmentos de DNA de alto peso molecular de *C. arabica* híbrido de Timor cv. 832/2 foram clonados no vetor pCC1BAC e transformados em *E. coli* DH10B. Após transformação 57000 clones foram inicialmente obtidos e ordenados manualmente em placas de 96 poços. A biblioteca foi transferida em triplicata para placas de 384 poços, com equipamento Q-BOT, resultando em 55.778 clones em 148 placas. A verificação do tamanho do inserto de 130 clones revelou tamanho médio de 115-120 Kb. A cobertura do genoma haplóide estimada para *C. arabica* foi de cinco vezes. A validação da biblioteca presença de DNA de cloroplasto e mitocôndria, assim como a seleção inicial com sondas para iniciar o mapeamento físico, está sendo realizada através de hibridização de colônias em membranas contendo 18.462 clones em duplicata.

Palavras-chave: BAC, *Coffea*, mapeamento, clonagem

Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Coffea arabica*

Abstract:

The production of physical maps in plants can provide applicable information for genetic and breeding research. The initial step to obtain a physical map is the construction of a genomic library with large DNA fragments. For this purpose, yeast artificial chromosome and more recently bacterial artificial chromosome (BAC) are the common vectors used for building those libraries. The objective of this work was to construct a BAC genomic library of *Coffea arabica*, which can be used for physical mapping as well to other genomic research. High molecular DNA fragments of *C. arabica* Timor Hybrid 832/2 was cloned into the pCC1BAC vector and transformed into *E. coli* DH10B. The ordering of the library in 384 well plates produced 55.778 clones with an average size of 115 to 120 KB. The coverage of the *C. arabica* haploid genome is estimated in 5x. Validation of the library for chloroplast and mitochondria DNA contamination is under way using colony filter hybridization.

Key words: BAC, *Coffea*, genomics, mapping, cloning.

Introdução

A produção de mapas físicos em plantas tem importância fundamental para estudos de genética e melhoramento, como por exemplo, no uso de seleção assistida identificação de loci de características quantitativas (QTLs), ou na clonagem de genes através de estratégias conjuntas de seleção e mapeamento (*map based cloning*). Os avanços técnicos na manipulação e clonagem de fragmentos grandes de DNA como eletroforese de campo pulsado, utilização de vetores do tipo cromossomo artificial de levedura (YAC, Burke et al., 1987) e cromossomo artificial de bactéria (BAC), vem facilitando a construção de bibliotecas genômicas com largos fragmentos de DNA que servem de base para os trabalhos de mapeamento físico de plantas de interesse comercial (Zhang e Wing, 1997). A construção das bibliotecas genômicas com fragmentos grandes de DNA tem importância não somente para estudos de mapeamento, mas também como suporte para projetos de sequenciamento, pesquisas em genômica estrutural, regulação e interação gênica, além da identificação de promotores, genes e clusters de genes de interesse. Nos últimos anos, vetores do tipo cromossomo artificial de bactéria (BAC) têm sido a opção preferencial para construções destas bibliotecas, pois permitem a inserção e clonagem de fragmentos de DNA de 80 a 300 Kb (Shizuya et al., 1992). Ao contrário dos cromossomos artificiais de levedura (YACs), os BACs apresentam uma série de vantagens, como a estabilidade dos clones, o baixo quimerismo e uma melhor eficiência de transformação (Frijters et al., 1997). A estabilidade e o baixo quimerismo ocorrem devido ao fator F, que permite que o vetor com o fragmento de DNA clonado seja mantido em pequeno número de cópias na bactéria, evitando rearranjos e instabilidade dos clones. Tendo em vista a importância das bibliotecas BAC em trabalhos de mapeamento e clonagem, o objetivo deste

trabalho foi construir uma biblioteca de BAC de *Coffea arabica*, que ira servir como suporte para a produção de um mapa físico assim como para trabalhos de clonagem de genes de interesse agrícolas baseados em mapeamento.

Material e Métodos

- Preparo do vetor BAC

A extração do plasmídeo pCC1BACTM (Epicentre) foi realizada através do método de lise alcalina e purificados por gradiente de cloreto de céσιο (Sambrook *et al.*, 1989). O DNA plasmidial foi digerido com *Hind* III seguido de defosforilação e submetido à eletroforese horizontal. O plasmídeo linearizado e defosforilado foi eluído do gel para ser usado nas ligações com DNA de alto peso molecular.

- Preparo do DNA nuclear de alto peso molecular

Folhas de *Coffea arabica* Híbrido Timor 832/2 foram maceradas em nitrogênio líquido e o DNA nuclear foi extraído segundo protocolo de Peterson *et al.* (2000), sem a presença de ácido ascórbico nas soluções utilizadas. O macerado mais o tampão de extração foram imobilizados em blocos de agarose de baixo ponto de fusão. A partir deste ponto, todos os tratamentos - lise de membrana, inativação de proteinase, neutralização e digestão do DNA - foram realizados utilizando os blocos de agarose. Anterior a digestão os blocos sofreram uma pré-eletroforese de campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis - PFGE) para purificação do DNA. Após a digestão do DNA com enzima de restrição *Hind*III, os blocos foram introduzidos em novo PFGE para seleção de tamanho dos fragmentos de DNA de alto peso molecular. Fragmentos de 100 a 200 Kb foram selecionados e cortados do gel para serem submetidos a uma segunda seleção de tamanho em gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) por 24 horas. Os fragmentos foram retirados do gel e eletroluídos em tampão TAE 1X utilizando tubos de diálise.

- Ligação e transformação.

As ligações foram preparadas utilizando 25ng do vetor, 100ng dos fragmentos de 100 a 200 Kb, 6 unidades da T4 DNA ligase, 10μL do tampão de reação e incubados a 16°C overnight. Em seguida as ligações foram desalinizadas por 1 hora a 4°C em tubos contendo 1,8% de glicose e 1,0% de agarose. Doze microlitros da ligação foram adicionados em 50μL de células competentes DH10B, eletroporadas a 1,6 Kv e colocadas em tubos com 1 mL de meio SOC. Células transformadas foram incubadas sob agitação a 37°C por 90 minutos e plaqueadas em meio LB com 12,5μg de cloranfenicol, 0,40mM de IPTG e 40μg/mL de X-Gal.

- Estimativa do tamanho dos insertos dos clones BACs.

Clones BACs foram selecionados aleatoriamente e crescidos a 37°C em 2 mL de Terrific Broth contendo 12,5μg de cloranfenicol. O DNA plasmidial dos clones foram extraídos usando protocolo de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e digeridos com a enzima de restrição *Not* I. Os produtos da digestão foram separados por PFGE em gel de agarose 1%.

- Ordenação das bibliotecas e confecção de membranas.

Os clones BACs foram inicialmente coletados manualmente e ordenados em placas de 96 canais. Posteriormente, através da utilização do equipamento QBOT, a biblioteca foi replicada para placas de 384 poços em triplicata. Após a inoculação automática, os clones foram deixados a 37°C durante 16 h e o número de falhas de crescimento por placa foi anotado. Também foram realizados testes de inoculação de membranas de nylon para produção de membranas de colônias BACs. Através do Q-BOT, foram inoculados a partir das placas de 384 poços, 18.462 clones em duplicatas em membranas 20 x 20cm. As membranas foram crescidas durante cerca de 16 h em meio LB a 33°C.

Resultados e Discussão

Originalmente foram obtidos 57.000 clones BACs a partir de ligações de quatro diferentes insertos de tamanho entre 120 a 150 Kb. Para cada ligação, clones foram selecionados aleatoriamente para a estimativa média do tamanho dos insertos. De um total de 130 clones digeridos com *Not*I foi obtida uma média de 115 Kb a 120 Kb (Figura 1), variando de 85 a 260 Kb. A maioria dos clones apresentou somente um fragmento após a digestão. Portanto, o genoma aparentemente possui poucos sítios para *Not*I, um aspecto comum observado em genomas de outras espécies dicotiledôneas (Deng *et al.*, 2001). Aproximadamente 3% dos clones não contêm insertos.

Após ordenamento da biblioteca em placas de 384 poços como o robô Q-BOT, 55.778 colônias cresceram e foram armazenadas em triplicata. Baseado no genoma haplóide do *Coffea arabica* de 1.3 pg ou 1254 Mb (Cro set *et al.*, 1995), a cobertura da biblioteca é estimada em cinco vezes o seu genoma (55.778 x 0.115 Mb = 6414 Mb).

Foram feitos testes iniciais para produção de membranas que serão utilizadas tanto para validação da biblioteca como para identificação de clones BAC com genes ou marcas de interesse. Através do Q-BOT, foram inoculadas 18.462 clones em duplicatas – total de 36.864 clones por membrana. O crescimento a baixa temperatura permitiu uma a formação das colônias sem que houvesse sobreposição. O grande número de colônias por membrana permitirá a seleção da biblioteca através de hibridizações em apenas três membranas. Após a validação, será iniciada a seleção de BACs com marcadores e/ou genes visando à produção de um mapa estrutural. Paralelamente também deverá ser iniciada a identificação BACs através da seleção de *pools* de BACs via PCR para busca de genes e promotores.

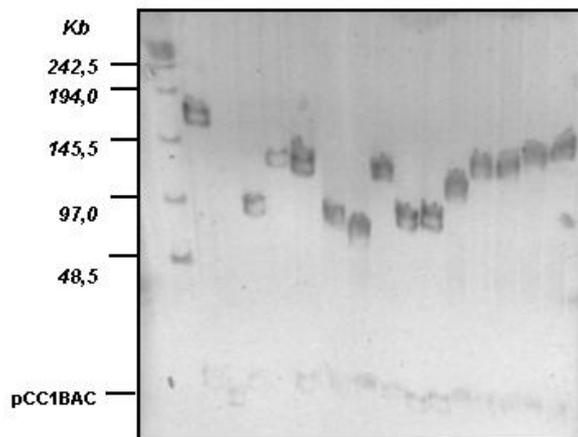


Figura 1- Gel de eletroforese em campo pulsado para análise do tamanho de fragmentos de DNA dos clones BACs. Coluna M: Marcador Lambda DNA de alto peso molecular. Colunas: 1-16: clones BAC digeridos com *NotI*.

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

- Burke D. T.; Carle G. F.; Olson M.V. (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*, 236, 806-812.
- Deng Z., Tao Q., Chang Y.L., Huang S., Ling P., Yu C., Chen C., Gmitter F.G. Jr and Zhang H.B. (2001) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for citrus and identification of BAC contigs containing resistance gene candidates. *Theor. Appl. Genet.*, **102**, 1177-1184.
- Fritjers, A.C.J., Zhang, Z., van Damme, M., Wang, G-L., Ronald, P.C. and Michelmore, R.W. (1997) Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large *EcoRI* and *HindIII* genomic fragments of lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, **94**, 390-399.
- Peterson, D.G., Tomkins, J.P., D.A., Wing, R.A. and Paterson, A.H. (2000) Construction of Plant Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Libraries: An Illustrated Guide. *J. Agric. Genomics*, **5**. www.ncgr.org/research/jag.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.-J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. and Simon, M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-Kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8794-8797.
- Zhang H.B.; Wing R.A. Physical mapping of the rice genome with BACs. (1997). *Plant Mol. Biol.* 35:115-127.