

IDENTIFICAÇÃO DE CLONES BAC COM MARCADORES MOLECULARES VISANDO A INTEGRAÇÃO DE MAPAS FÍSICOS E GENÉTICOS

Sandra Maria Bellodi Cação², Nathália Volpi Silva³, Luiz Gonzaga Esteves Vieira⁴, Luiz Filipe Protasio Pereira⁵

¹Financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café e pelo CNPq

²Bolsista INCT/Café (CNPq), Laboratório de Biotecnologia Vegetal LBI-IAPAR, Londrina-PR, sandracacao@sercomtel.com.br

³Bolsista CAPES/mestrado LBI-IAPAR

⁴Pesquisador, LBI-IAPAR, lvieira@iapar.br

⁵Pesquisador, Embrapa Café, Brasília-DF, filipe.pereira@embrapa.br

RESUMO: Bibliotecas BAC (Cromossomo Artificial de Bactéria) têm sido muito utilizadas para suporte de trabalhos de mapeamento físico, clonagem posicional, mapeamento comparativo e estudos de evolução de genomas. Visando realizar o mapeamento físico em *Coffea arabica*, iniciamos a identificação e caracterização de clones BAC de uma biblioteca de *C. arabica* híbrido timor 832/2. A biblioteca contém 56.832 clones BACs com tamanho médio de 120 Kb, representando uma cobertura de 5,5 vezes o tamanho do genoma do *C. arabica*. 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 5.760 clones. A identificação do BAC de interesse foi realizada através da seleção por PCR nos superpools e pools, seguida por hibridização em filtros de colônia contendo 384 clones. Para a seleção dos superpools e pools de placas foram utilizados os *primers* baseados em AFLPs relacionados com locus de resistência à ferrugem (M-8, SAT-244 e BA-124). Também foram utilizados os marcadores SSR-18 (GL1), SSR-16 (GL2), ACGG-1 (GL3), CCG-3 (GL6), de quatro grupos de ligação do mapa genético parcial de *C. arabica* (Oliveira *et al.*, 2007) visando identificar e posicionar BAC para cada grupo de ligação. Os BAC selecionados nas hibridizações foram confirmados através de extração individual do clones, seguida por PCR para checar a marca de interesse. Até o momento foram identificados 32 clones BAC para as marcas de resistência a ferrugem e 98 para os 4 grupos de ligação. Os BAC selecionados serão sequenciados para o mapeamento físico da região contendo locus de resistência à ferrugem.

Palavras-chave: cromossomo artificial de bactéria, mapeamento, ferrugem

IDENTIFICATION OF BAC CLONES WITH MOLECULARS MARKERS AIMING INTEGRATION OF GENETICS AND PHYSICAL MAPS

ABSTRACT: BAC libraries have been extensively used in physical mapping, positional cloning and comparative studies of genomes evolution. With the aim to physical map genomic regions of *Coffea arabica*, we started the identification and characterization of BAC clones from a *C. arabica* hybrid timor 832/2 library. The library contains 56.832 BAC clones with average size of 120 Kb, representing 5.5 times the genome. 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 clone representing approximately 5760 clones. For the identification of BAC of interest PCR screening in pools and superpools was performed, followed by colony filters hybridization containing 384 clones. To selection of plates pools and superpools, primers based on AFLPs linked to rust resistance locus (M-8, SAT-244 and BA-124) were used. We also used the markers: SSR-18 (GL1), SSR-16 (GL2), ACGG-1 (GL3), CCG-3 (GL6), from four linkage groups of partial genetic map of *C. arabica* to identify BACs and position for each ligation group. The selected BACs were confirmed by hybridization through the extraction of individual clones followed by PCR to check the marker of interest. So far were identified 32 BAC clones for resistance to rust markers and 98 for the four linkage groups. The selected BACs are going to be sequenced to perform physical mapping of the region containing the locus of resistance to rust.

Key words: bacterial artificial chromosome, mapping, rust

INTRODUÇÃO

Bibliotecas BAC (Cromossomo Artificial de Bactéria) são ferramentas essenciais para caracterização detalhada de regiões cromossômicas contendo genes de interesse, através da construção de mapas físicos e da clonagem posicional (Gonthier *et al.*, 2010). O mapeamento físico em ampla escala do genoma, usando clones de bibliotecas BAC com grandes fragmentos de DNA (maior que 100 kb, por exemplo), tem se tornado uma peça central da metodologia atual do estudo do genoma de qualquer planta ou animal. A integração de mapas físicos e genéticos é o primeiro passo para gerar plataformas para projetos de sequenciamento, total ou parcial, em larga escala do genoma (Han *et al.*, 2009; Warren *et al.*, 2006).

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.

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). 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

Foi utilizada uma biblioteca BAC de *C. arabica* Híbrido Timor 832/2, com 56.832 mil clones e 5,5 vezes cobertura do genoma (Cação et al., 2007), na qual o DNA de alto peso molecular foi digerido parcialmente com a endonuclease de restrição *Hind* III e clonado no vetor pCC1BAC.

Pooling da Biblioteca

A biblioteca BAC foi condensada em pools de placa e superpools para facilitar a seleção através de reações de PCR. O pool de placa foi baseado no conjunto de clones BAC de placas individuais, com 384 clones BAC por placa. Pools foram feitos de cada uma das 148 placas da biblioteca para isolar o DNA. O isolamento do DNA de pools de BAC foi realizado através da lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Para os superpools o DNA de cada 15 pools de placas foram agrupados em concentrações iguais de DNA (5ng/ul) de cada 15 placas, formando 10 superpools, cada uma representando cerca de 5.760 clones.

Seleção da Biblioteca BAC

Os superpools e pools de placas foram submetidos à seleção por PCR utilizando marcadores de resistência à ferrugem : SAT-244, BA-124 e M-8 (Lashermes, 2007). Também foram utilizados os marcadores SSR-18 (GL1), SSR-16 (GL2), ACGG-1 (GL3), CCG-3 (GL6), de quatro grupos de ligação do mapa genético parcial de *C. arabica* (Oliveira, 2007). Os produtos foram separados em gel de poliacrilamida 10%.

Membranas de Colônias dos clones BAC

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, seguido pelo tratamento com proteinase K e fixados na membrana a 80° C por 3 horas.

Hibridização das Membranas de Colônias dos clones BAC

Para seleção de clones BAC, as membranas com os 384 clones da biblioteca foram hibridizadas com fragmento de DNA resultante da amplificação das sondas SAT-244, BA-124 e M-8 e para marcas dos grupos de ligação SSR-16, SSR-18, ACGG-1 e CCG-3. Estes fragmentos foram clonados no vetor PCR 2.1–TOPO® cloning, (Invitrogen™) e utilizados como sonda após a digestão utilizando a enzima de restrição *Eco*RI 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 confirmação das marcas de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção da Biblioteca através de PCR e Hibridização de Membranas

Das três marcas baseadas em AFLPs relacionados com locus de resistência à ferrugem testadas, a M-8 apresentou amplificação para o superpool 07, já o BA-124 (Figura 1) foi positivo para os superpools 01, 02, 03, 05, 07 e 09 e os superpools 01, 02, 03, 07 e 09 foram positivos para o SAT-244. Também foram utilizados os marcadores SSR-18 (GL1), SSR-16 (GL2), ACGG-1 (GL3), CCG-3 (GL6), de quatro grupos de ligação do mapa genético parcial de *C. arabica* (Oliveira *et al.*, 2007) visando identificar e posicionar BACs para cada grupo de ligação. Para os grupos de ligação, o SSR-16 foi positivo para os superpools 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09 e 10, SSR-18 para os superpools 01, 03, 04, 05, 07 e 10, ACGG-1 foram positivos 01, 03, 04 e 05 e CCG-3 para os superpools 03, 04, 05, 06 e 07 (Figura 2). Estes superpools foram desmembrados em pools de placas e as placas positivas plotadas em membranas para hibridização com sondas específicas (Figura 3). Análises das hibridizações das membranas com as colônias dos clones BAC seguido do PCR para confirmar os clones positivos permitiram a identificação de 16 clones positivos para a marca SAT-244, nove para o BA-124 e para o M-8 foram encontrados sete clones positivos. Um total de 98 clones BACs foram confirmados para os grupos de ligação. Para o grupo SSR-18 foram identificados 38 clones, para o SSR-16 foram 18 clones CCG-3 24 clones e 15 para o grupo ACGG-1. Os BACs selecionados (Tabela1) serão submetidos ao sequenciamento.

Uma vez analisadas, essas marcas podem ser empregadas como marcadores moleculares em populações de mapeamento e por meio destes clones, 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 *C. arabica* L. cultivar típica e *C. canephora* e apresenta características de importância agrônômica com resistência a diversas raças do fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. Assim Diola, 2009, encontrou genes candidatos para o gene de resistência da raça II (SH₂) utilizando marcadores SCARs e isolou 24 clones BAC da biblioteca de *C. arabica* Híbrido Timor 832/2. Dois destes clones BAC foram delimitados em seus extremos por dois marcadores que flanqueiam o gene em ambos os lados.

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.

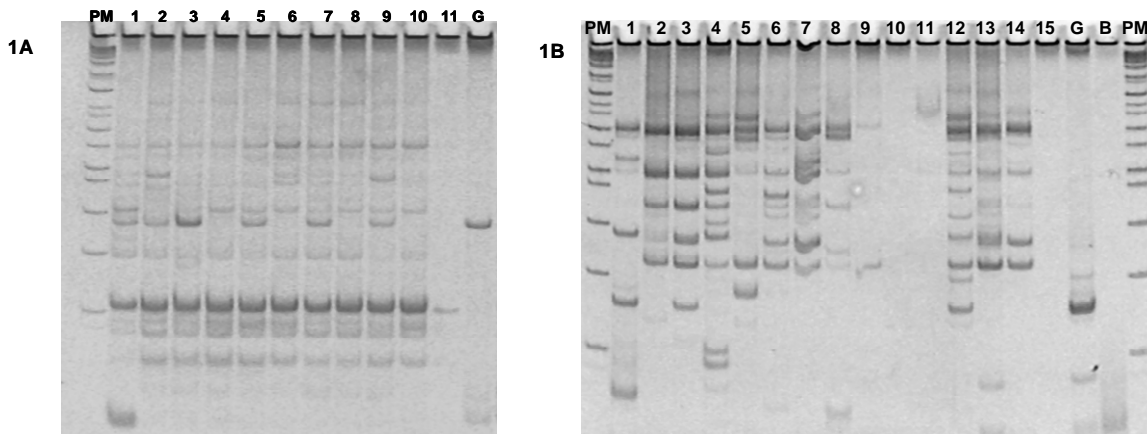


Figura 1 (A e B) A- Seleção dos Superpools (1A) b com a marca de resistência a ferrugem e Pools de Placas (1B) com o CCG-3 (GL6). Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% dos produtos de PCR. Branco (B), DNA genômico (G) e o peso molecular 1Kb plus (PM).

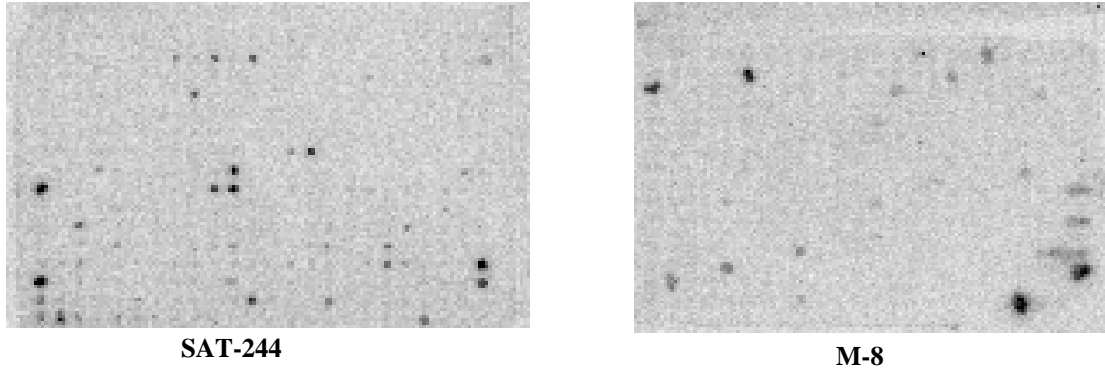


Figura 2- Seleção da biblioteca por hibridização. Membranas com os clones BACs de placas de 384 poços hibridizadas com as sondas SAT-244 e M-8.

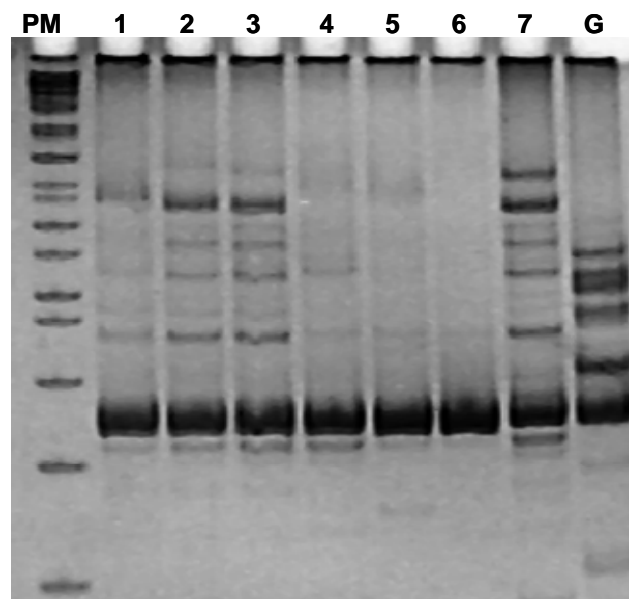


Figura 3- Amplificação de clones BACs selecionados para a marca de resistência a ferrugem M-8. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% do produto de amplificação. Linhas de 1 a 7 contem os clones positivos, DNA genômico (G) e o peso molecular 1Kb plus (PM).

Tabela 1- Clones identificados na biblioteca BAC de *C. arabica* Híbrido Timor 832/2

Gene	Nº Clones	Endereço do clone BAC
SAT-244	16	P10K18, P10L11, P10L09, P10G08, P51G06, P51L14, P56P04, P126C20, P126M23, P134H04, P134M22, P135K24, P13515
BA-124	9	P51P01, P51P14, P126D01, P126E02, P126H08, P126H09, P126H10, P126P22, P134A11
M-8	5	P98K18, P89L17, P89L18, P89L20, P89O021
SSR-18	38	P04G24, P04H18, P04I17, P04P18, P04P19, P56F19, P56J23, P56K23, P67F07, P67F20, P67I04, P67J19, P67K03, P67K05, P67P24, P75A09, P75A15, P75A24, P75B24, P75J19, P75K16, P75K18, P75L16, P75N05, P101C20, P101C22, P101D15 P101L19, P126B24, P126J19, P126K18, P126N05,
CCG-3	12	P56E20, P56F01, P56F16, P56G01, P56H01, P67B05, P67B07, P67F06, P67G08, P67J14, P67J19, P67K05
ACGG-1	17	P04B01, P04K14, P04M10, P04M11, P04M20, P56, P56, P56A02, P56A03, P56B15, P56B16, P56D18, P56I23, P75A10, P75A11, P75E11, P101E21, P101H15
SSR-16	19	P05A09, P05A18, P05A21, P05E01, P05O07, P0517, P56L12, P75F10, P75G08, P85J12, P75G18, P101M16, P101N11, P101O02, P105I22, P105K11, P105L13, P105L21, P105O23

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, podendo beneficiar e facilitar os programas de melhoramento genético do cafeeiro que venham utilizar marcadores moleculares como ferramenta.

AGRADECIMENTOS: Projeto financiado pelo Consórcio Pesquisa Café (CBP&D-Café) e INCT-Café. Sandra M. B. Cação - Bolsista DTI-CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTENCOURT, A.J. Características agrônomicas 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.
- CHANG, Y.L.; TAO, Q.; SCHEURING, C.; DING, K.; MEKSEM, K.; ZHANG, H.B. (2001) Genetics: An integrated map of *Arabidopsis thaliana* for functional analysis of its genome sequence. 159, 1231-1242.
- 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.

- HAN Y, CHAGNÉ D, GASIC K, RIKKERINK EHA, BEEVER JE, GARDINER SE, KORBANA SS: BAC-end sequence-based SNPs and Bin mapping for rapid integration of physical and genetic maps in apple. **Genomics** 2009, 93:282-8.
- KUMAR, L. S. (1999) *Biotechnology Advances*. DNA markers in plant improvement: **An overview**. 17, 143-182.
- MULLET, J.E.; KLEIN, R.K.; KLEIN, P.E. (2001). *Current Opinion in Plant Biology*. *Sorghum bicolor* – an important species for comparative grass genomics as a source of beneficial genes for agriculture. 5, 118-121.
- 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.
- TANSKLEY, S.D.; GANAL, M.W.; MARTIN G.B. (1995). Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. **Trends in Genetics** 11, 63-69.
- WARREN RL, VARABEI D, PLATT D, HUANG X, MESSINA D, YANG S-P, KRONSTAD JW, KRZYWINSKI M, WARREN WC, WALLIS JW, HILLIER LW, CHINWALLA AT, SCHEIN JE, SIDDIQUI AS, MARRA MA, WILSON RK, JONES SJM: Physical map-assisted whole-genome shotgun sequence assemblies. **Genome Res** 2006, 16:768-775.
- 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.