

LEANDRO EUGENIO CARDAMONE DINIZ

Mapeamento físico da região cromossômica próxima ao gene de resistência  
a *Meloidogyne exigua* (Mex-1) em *Coffea arabica* L.

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de "*Doctor  
Scientiae*".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

A Deus,

Aos meus queridos pais Ubirajara (*in memoriam*) e Alice,

Aos meus irmãos e a minha avó.

A uma pessoa que tem me dado felicidade  
pelo simples fato de estar na minha vida.

## **AGRADECIMENTO**

Primeiramente a Deus, que me deu força e coragem para suportar todas os problemas da vida.

Ao Prof<sup>o</sup>. Ney Sakiyama, por ter me orientado, além do constante apoio e confiança que sempre depositou em mim.

A conselheira e amiga Eunize Zambolim, por sua amizade e colaboração profissional.

Ao conselheiro Marcelo Ehlers Loureiro, por aceitar me auxiliar em meu trabalho de doutorado.

Ao Dr. Philippe Lashermes, do Institut de Recherche pour le Developpement, IRD, por ter me aceitado em seu Laboratório em Montpellier, França, possibilitando uma melhor qualificação profissional.

A Dra. Waldenia de Melo (EPAMIG) e a Prof<sup>a</sup>. Rosângela D'Arc L. de Oliveira por terem aceito meu convite para participar de minha banca de tese.

Ao coordenador do Laboratório Biocafé, Laércio Zambolim, pela sua amizade e apoio profissional.

As secretárias da Genética e Melhoramento, Conceição e Rita, que sempre me ajudaram nos momentos necessários.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante 3 anos do meu doutorado nesta Insituição.

A CAPES pela bolsa concedida durante a minha estada na França para que eu fizesse meu doutorado sandwich.

A Universidade Federal de Viçosa que me possibilitou ter uma melhor qualificação profissional.

Ao ex-coordenador Paulo Sávio e ao atual Cláudio Bruckner.

Em especial aos amigos e companheiros que estão e que passaram pelo Laboratório Biocafé: Ana, Baião, Cristiane, Eveline, Fernando, Luciano, Marcelo, Maria Rita, Raphael, Terezinha, Wellington pelas festas e por todo o apoio que me deram durante o doutorado.

Aos amigos das repúblicas que passei, Alessandro, Fernando, Adilson, Gerardo, Marco, Newton, Márcio, Lucas, Germano e Rodrigo, pela amizade e pelas festas que fizemos durante o período que estive em Viçosa.

Aos amigos Luciano (BH), Eduardo, Mirian, Inácio, Andréia, Marcelo Tomaz e Maria Fernanda pelo apoio e carinho ao longo destes anos.

A Mayra, pelo apoio e ajuda nos momentos difíceis que aconteceram.

A toda minha família pela oportunidade de estar vivendo mais este momento feliz em minha vida e por todo o apoio que vocês sempre me deram.

Peço desculpas às pessoas que esqueci de agradecer, não foi por má fé, apenas por serem tantas as pessoas que me ajudaram que infelizmente, esqueci de citá-las. A estas e a todas as pessoas, que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos sinceros.

MUITO OBRIGADO.

## BIOGRAFIA

Leandro Eugenio Cardamone Diniz, filho de Ubirajara Dorival Diniz (*in memoriam*) e Alice Cardamone Diniz, nasceu no dia 06 de setembro de 1976, em Ibiporã, Estado do Paraná.

Cursou o primeiro grau na Escola Marista e o segundo grau na Escola Canadá, em Londrina, PR.

Em fevereiro de 1994, ingressou no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em Londrina, PR, diplomando-se no dia 17 de dezembro de 1997, obtendo o grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Em março de 1998, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na UEL, submetendo-se à defesa de tese em 22 de fevereiro de 2000.

Em dezembro de 1999 obteve o grau de Bacharel em Ciências Biológicas, habilitação feita junto com o 2º ano de Mestrado.

Em março de 2000, iniciou o Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na UFV, submetendo-se à defesa de tese em 11 de fevereiro de 2004.

Em 2002, desenvolveu no Instituto de Pesquisa para o Desenvolvimento (IRD), situado em Montpellier, França, parte de seu doutorado, sendo orientado pelo Dr. Philippe Lashermes.

## ÍNDICE

	Página
<b>Lista de Figuras</b>	viii
<b>Lista de Tabelas</b>	x
<b>Resumo</b>	xi
<b>Abstract</b>	xiii
<b>Revisão de Literatura</b>	01
Identificação de nematóides	03
Resistência do cafeeiro a <i>Meloidogyne exigua</i>	04
Cultivares resistentes a <i>Meloidogyne exigua</i>	04
Iapar 59	04
Porta-enxerto Apatã IAC 2258	05
Resistência e genes-R	05
Mecanismos moleculares de resistência à doenças em plantas	07
Clonagem do gene de resistência <i>Mex-1</i> em café utilizando sondas RGA	08
Genes de resistência clonados	10
Bibliotecas BAC como fonte de grandes insertos	11
Bibliotecas BAC em Café	12
Análise do perfil de restrição e de seqüências das extremidades BAC	13
Aplicação da técnica	13
Referências Bibliográficas	14
<b>Capítulo 1. Mapeamento detalhado da região <i>Mex-1</i> e identificação de clones BAC contendo prováveis genes de resistência em café (<i>Coffea arabica</i> L.)</b>	
Resumo	24
Introdução	25
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	31

Conclusão	42
Referências Bibliográficas	42
<b>Capítulo 2. Análise da presença do <i>locus Mex-1</i> que confere resistência ao nematóide <i>Meloidogyne exigua</i> em cultivares Icatu coletados em Viçosa e Patrocínio, MG, utilizando marcadores AFLP</b>	
Resumo	47
Introdução	47
Material e Métodos	49
Resultados e Discussão	53
Conclusão	57
Referências Bibliográficas	57
<b>Capítulo 3. Isolamento de um cDNA de catalase de café</b>	
Resumo	59
Introdução	59
Material e Métodos	62
Resultados e Discussão	67
Conclusão	74
Referências Bibliográficas	75
<b>ANEXOS</b>	81

## LISTA DE FIGURAS

---

### CAPÍTULO 1

---

- Figura 1.** Mapa genético da região cromossômica contendo o locus *Mex-1* em café para a resistência a *Meloidogyne exigua* baseado em uma população F<sub>2</sub> 27
- 
- Figura 2.** Filtros de alta densidade selecionados com a sonda Exi-3. Onze clones positivos foram detectados entre os 27.648 clones duplo-plotados. 34  
As setas indicam os clones positivos obtidos com esta sonda.
- 
- Figura 3.** Gel do perfil de restrição do DNA dos clones BAC hibridizados pelo produto de digestão do marcador Exi-3 com a enzima de restrição *Hind*III. Os clones BAC estão identificados no alto de cada linha. M, marcador de peso molecular. 35
- 
- Figura 4.** Organização dos 5 contigs encontrados para o gene *Mex-1*. Colineariedade entre os dois contigs homeólogos Exi-3. Os clones BAC foram agrupados em ‘contigs’ baseado no perfil de restrição do DNA das BACs e estão indicadas pelas linhas horizontais grossas, com seus respectivos códigos. Sítios de PCR das extremidades BAC e primers Exi-2, Exi-3 e Exi-4 estão indicados por linhas verticais contínuas, enquanto marcadores do tipo RFLP estão indicados por linhas verticais pontilhadas. A marcação dos 3 marcadores centrais por um colchete foi feita pela impossibilidade de determinar a ordem correta destas marcadores entre si. Estão aqui representados também os contigs Exi-2 e Exi-4. 38
- 
- Figura 5.** Distribuição dos clones BAC Exi-3 positivos em dois grupos, chamados de Exi-3 I e Exi-3 II. O DNA das BACs dos clones positivos foram digeridos com *Hind*III e hibridizados com a sonda SCAR Exi-3. 39
- 
- Figura 6.** Clones BAC que constituem a região *Mex-1*. O DNA das BACs foi digerido com *Hind*III (a) e *Eco*RI (b) e hibridizados com uma sonda RGA, de café, da família F. Em cima da figura os códigos dos clones utilizados, dois para cada marcador Exi-2, Exi-3 e Exi-4 utilizado. 41
-



---

## CAPÍTULO 2

---

**Figura 1.** Gel de agarose com o marcador AFLP Exi-2 (banda de 141pb). A seta indica a presença do fragmento introgridido que leva o locus *Mex-1*. 54  
T<sub>1</sub>: Iapar 59, T<sub>2</sub>: Catuaí e T<sub>3</sub>: Híbrido de Timor. 1 a 21: linhagens de Icatu.

---

**Figura 2.** Gel de agarose com o marcador SCAR Exi-2 (banda de 141pb). A seta indica a presença do fragmento associado ao locus *Mex-1*. T<sub>1</sub>: Iapar 59, T<sub>2</sub>: Catuaí, T<sub>3</sub>: Híbrido de Timor e T<sub>4</sub>: Sarchimor. 1 a 21: linhagens de Icatu, M: marcador de peso molecular. 54

---

**Figura 3.** Gel de agarose com os marcadores AFLP (A) Exi-3 (banda de 109pb), (B) Exi-11 (banda de 194pb), (C) Exi-13 (banda de 114pb) e (D) Exi-1 (banda de 201pb). A seta indica a presença do fragmento 55  
introgridido associado ao locus *Mex-1*. M: Marcador de peso molecular.  
T<sub>1</sub>: Iapar 59, T<sub>2</sub>: Catuaí e T<sub>3</sub>: Híbrido de Timor. 1 a 21: linhagens de Icatu.

---

---

## CAPÍTULO 3

---

**Figura 1.** Seqüência de nucleotídeos de Cat-C (catalase de *Coffea arabica*) e sua seqüência deduzida de aminoácidos. Presença da seqüência peroxissomal 69  
na região C-terminal da catalase marcada com uma caixa (TRL) e em azul.

---

**Figura 2.** Alinhamento da seqüência parcial de nucleotídeos da catalase de café (Cat-C) (senso direto) com a seqüência parcial de nucleotídeos da catalase 71  
de ligação ao ácido salicílico (SR1) de *Nicotiana tabacum* (U03473).

---

**Figura 3.** Alinhamento da seqüência parcial de nucleotídeos da catalase de café (Cat-C) (senso direto) com a seqüência parcial de nucleotídeos da 72  
catalase de *Prunus persica* (Cat-1).

---

**Figura 4.** Alinhamento da seqüência parcial de aminoácido da catalase de café (Cat-C) (senso direto) com a seqüência parcial de aminoácidos da 73  
proteína de ligação ao ácido salicílico (SABP), a catalase (Cat-1) de *Nicotiana tabacum*, com destaque para as seqüências TRL e SRL, de *C. arabica* e *N. tabacum*, respectivamente, na posição C-terminal.

---

## LISTA DE TABELAS

---

### CAPÍTULO 1

---

**Tabela 1.** Clones BAC testados por Hibridização ou seleção baseada em PCR dos grupos de DNA das BAC. **33**

---

**Tabela 2.** Resultados de hibridização e amplificação de clones BAC contendo os marcadores Exi 2, 3 e 4 e seqüências RGA, utilizando primers degenerados e sondas de duas família RGA de café. **40**

---

---

### CAPÍTULO 2

---

**Tabela 1.** Lista dos materiais utilizados para a avaliação de resistência. **50**

---

**Tabela 2.** Relação dos primers utilizados com a respectiva combinação de cada um dos primers Eco e Mse utilizados na etapa de amplificação. **52**

---

---

### CAPÍTULO 3

---

**Tabela 1.** Solução de pré-hibridização e hibridização **65**

---

## RESUMO

DINIZ, Leandro Eugenio Cardamone. D.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Mapeamento físico da região cromossômica próxima ao gene de resistência a *Meloidogyne exigua* (*Mex-1*) em *Coffea arabica* L.** Orientador: Ney Sussumu Sakiyama. Conselheiros: Eunize M. Zambolim e Marcelo E. Loureiro.

O nematóide de galhas, *Meloidogyne exigua*, parasita o cafeeiro (*Coffea* sp.) e sua erradicação das regiões infestadas é impraticável. Estudos anteriores mostraram que a resistência a *M. exigua* é controlada por um gene de herança simples, designado *Mex-1*, presente em *C. canephora*. Linhagens de café arábica apresentando resistência têm sido desenvolvidas em programas de melhoramento genético por meio da introgressão deste gene. Uma biblioteca BAC de café foi avaliada inicialmente utilizando-se três marcadores (Exi-2, Exi-3 e Exi-4) ligados a *Mex-1*, obtidos a partir de marcadores AFLP previamente clonados. Os clones positivos associados à região *Mex-1* foram identificados e isolados. O DNA destes clones foi então analisado por hibridização e amplificação com marcadores SCAR (Exi-2 e Exi-3) e 9 combinações de primers das extremidades BAC. Os clones BAC positivos, relativos aos marcadores Exi-2, Exi-3 e Exi-4, foram reunidos em 5 contigs. O primeiro contig apareceu composto de dois clones BAC identificados com o marcador Exi-4. Dos cinco clones BAC identificados com o marcador Exi-2, dois contigs designados Exi-2 I e Exi-2 II foram distintos. Os clones BAC Exi-3 foram organizados em dois contigs distintos chamados Exi-3 I e Exi-3 II. No total, nove sítios de restrição ou de PCR, correspondendo a sete marcadores físicos, foram localizados na região Exi-3. As três regiões cromossômicas correspondentes ao contig Exi-4, aos dois contigs Exi-2 e aos dois contigs Exi-3 não apresentaram sobreposição. A presença de clones BAC contendo análogos de gene de resistência (RGA) na região *Mex-1* foi investigado por meio de amplificação com primers degenerados e hibridização com sondas RGA de café. Alguns clones BAC contendo

RGAs foram identificados. Para confirmar a introgressão do gene *Mex-1*, vinte e uma linhagens de Icatu foram comparadas a três testemunhas resistentes, “Iapar 59”, “Híbrido de Timor” e “Sarchimor” e a uma testemunha susceptível, “Catuaí”. Foi avaliada, por meio de marcadores AFLP, a presença do fragmento introgridido associado ao *locus Mex-1*. Nove marcadores AFLP foram amplificados. Destes, os marcadores Exi-1, Exi-2, Exi-3, Exi-11 e Exi-13 confirmaram a presença do fragmento associado à resistência a *M. exigua*, mostrando que esta marca pode ser utilizada em programas de seleção assistida. Uma biblioteca de cDNA de “Caturra” foi utilizada para se isolar fragmentos de genes associados à resistência, através da hibridização com sondas RGA. Após a utilização das nove famílias RGA de café, 32 colônias foram isoladas e seqüenciadas. Destas, 25 seqüências não apresentaram similaridade com outras seqüências disponíveis na base de dados do NCBI ou não puderam ser seqüenciadas. Seis amostras continham seqüências muito pequenas e não confiáveis, e apenas uma amostra resultou em uma seqüência de 428 nucleotídeos (142 aminoácidos). Esta seqüência apresentou alta homologia a catalases de outras plantas como *Nicotiana plumbaginifolia*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, entre outras. A esta catalase descoberta em café foi dado o nome de Cat-C. A catalase de ligação ao ácido salicílico (SR1) e a seqüência parcial de aminoácidos da proteína de ligação ao ácido salicílico (SABP), ambos de *N. tabacum*, apresentaram 82% e 77% de identidade, respectivamente, quando comparadas a Cat-C. Na região C-terminal desta catalase foi detectada a presença de uma seqüência peroxissomal. No entanto, ao invés de uma seqüência SRL (Serina-Arginina-Leucina), foi encontrada uma seqüência TRL (Treonina-Arginina-Leucina). Esta diferença é devido à troca de uma timina por uma adenina. Estes dados sugerem que Cat-C pode estar associado ao mecanismo de resistência em café.

## ABSTRACT

DINIZ, Leandro Eugenio Cardamone. D.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2004. **Physical mapping of the chromosomal region close to *Meloidogyne exigua* resistance gene (*Mex-1*) in *Coffea arabica* L.** Advisor: Ney Sussumu Sakiyama. Committee members: Eunize M. Zambolim and Marcelo E. Loureiro.

The root-knot nematode *Meloidogyne exigua* parasites the arabica coffee tree (*Coffea* sp.) and its eradication of the infested areas is impracticable. Previous studies showed that the resistance to *M. exigua* is controlled by a simple inheritance gene, designated *Mex-1*, present in *C. canephora*. Lineages of resistant Arabica coffee have been developed in some genetic breeding programs through the introgression of this gene. The BAC library of coffee was initially evaluated by three markers (Exi-2, Exi-3 and Exi-4) linked to *Mex-1*, previously obtained from cloned AFLP markers. The positive clones associated with *Mex-1* region were identified and isolated. DNA clones were then analyzed by hybridization and amplification with SCAR (Exi-2 and Exi-3) markers and 9 combinations of primers of the BAC-end. The positive BAC clones, relative to the Exi-2, Exi-3 and Exi-4 markers, were assembled in 5 contigs. The first contig identified with the Exi-4 marker is composed of two positive BAC clones. Of the five BAC clones identified with Exi-2 markers, two contigs designated Exi-2 I and Exi-2 II were different from each other. The BAC clones Exi-3 were organized in two different contigs called Exi-3 I and Exi-3 II. In the total, nine restriction sites or PCR, corresponding to seven physical markers were located in the Exi-3 region. The three chromosomal regions that corresponded to the Exi-4 contig, the two Exi-2 contigs and the two Exi-3 contigs did not present any superposition. The presence of BAC clones containing resistance gene analogs (RGA) in the *Mex-1* region was investigated by both PCR amplification with degenerate primers, and hybridization with coffee RGA probes. Some BAC clones containing RGA were identified. To confirm the introgression of *Mex-1* gene, twenty-one Icatu lineages

were compared to three resistant cultivars, Iapar 59, Híbrido de Timor and Sarchimor and to a susceptible cultivar Catuaí, through AFLP markers, evaluating the presence or not of the introgressed fragment associated with the *Mex-1 locus*. Nine AFLP markers were amplified. Among these, Exi-1, Exi-2, Exi-3, Exi-11 and Exi-13 markers confirmed the presence of the fragment associated to the resistance to *Meloidogyne exigua*, showing that this marker can be used in selected assistent programs. A cDNA library of “Caturra” was used to isolate fragments of genes associated with the resistance, through the hybridization using RGA probes. After the use of the nine coffee RGA families, 32 colonies were isolated and sequenced. Among these, 25 sequences either did not present similarity with other available sequences in the NCBI data base or could not be sequenced. Six samples contained very small and not trustable sequences, and just one sample resulted in a sequence of 428 nucleotides (142 aminoacids). This sequence presented high homology to catalases of other plants such as *Nicotiana plumbaginifolia*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, etc. To this discovered coffee catalase was given the name of Cat-C. The salicylic acid receptor (SR1) and the partial sequence of aminoacids of the salicylic acid binding protein (SABP), both in *Nicotinana tabacum*, showed 82% and 77% of identities, respectively, when compared with Cat-C. In the C-terminal region of this catalase was detected the presence of a peroxisomal sequence. However, instead of a SRL sequence (Serine-Arginine-Leucine), a TRL sequence was found (Treonine-Arginine-Leucine). This difference is due to the change of a timine by an adenine. These data suggest that Cat-C can be associated with resistance mecanism in coffee.

## REVISÃO DE LITERATURA

Os nematóides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* são comumente conhecidos como nematóides de galhas e constituem o grupo de parasitas mais amplamente distribuídos e dos mais prejudiciais às culturas de interesse econômico, como o cafeeiro (Lordello, 1986). A doença é caracterizada por galhas nas raízes das plantas infectadas. Os sintomas incluem baixa produção de sementes, crescimento reduzido, murchamento e aumento da susceptibilidade a outros patógenos (Randig et al., 2002).

A repetitiva penetração, exploração e alimentação dos nematóides endoparasíticos nas raízes, e a modificação da própria raiz via formação de galhas prejudica a formação de raízes de crescimento, especialmente as raízes finas (Sijmons et al., 1994). A redução destas raízes resulta na menor exploração do solo pela planta e da mobilização de nutrientes, além da modificação da alocação de nutrientes entre raízes e brotos (Spiegel et al., 1982). Plantas infectadas por nematóides demonstram sintomas típicos de deficiência de nutrientes, principalmente nitrogênio e nutrientes com baixa mobilidade (Vaast et al., 1998). Estes endoparasitas têm desenvolvido relações muito complexas com o tecido das raízes de seus hospedeiros, nos quais induzem a formação de estruturas especializadas conhecidas como células gigantes (Williamson e Hussey, 1996).

Até o presente, pelo menos 38 espécies, representando 31 gêneros de fitonematóides, como *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Xiphinema* entre outros, foram encontrados associados a raízes de cafeeiros no Brasil (Lordello, 1972; Campos, 1997). Muitas destas espécies podem ocorrer simultaneamente no sistema radicular do cafeeiro, embora os danos causados por algumas delas não estejam ainda comprovados (Campos et. al., 1985).

O ataque de fitonematóides constitui um dos maiores problemas fitossanitários para a cultura do café no Brasil. Os nematóides parasitam o sistema radicular, ao qual causam distúrbios fisiológicos e anatômicos, cuja magnitude varia de acordo com a espécie do fitoparasita.

Entre as espécies de nematóide de raiz conhecidas por infectarem os cafeeiros, as espécies mais prejudiciais e de maior importância econômica são *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. exigua*, *M. coffeicola* e *M. arabicida* (Campos et al., 1990; Carneiro et al., 1996; Lopez e Salazar, 1989).

Os danos provocados pelos nematóides do gênero *Meloidogyne* são mais severos quando a planta hospedeira é submetida a condições de estresses, causados por fatores abióticos (secas, deficiências nutricionais, frio, etc) e bióticos (pragas, doenças) do meio ambiente (Campos, 1997; Moura, 1997). Dentre esses danos, a clorose, queda de folhas, redução do crescimento e da produção, são alguns destes sintomas que podem levar a planta à morte (Campos et al., 1990).

*Meloidogyne incognita* é a espécie com maior disseminação nas regiões de arenito do Estado de São Paulo e com menor incidência no Paraná, constituindo-se em um fator limitante à implantação e a condução de cafezais nas áreas em que ocorrem. Foi detectada, também, em algumas propriedades cafeeiras dos Estados do Espírito Santo (Lordello e Hashizume, 1971), Minas Gerais (Lima et. al., 1985; Marcuzzo et. al., 2000) e Bahia (Souza et. al., 2000).

*Meloidogyne paranaensis* é uma espécie que causa danos severos ao cafeeiro arábica e algumas pesquisas indicam um substancial aumento de sua distribuição (70%) e decréscimo de *M. incognita* (30%) no Estado do Paraná (Carneiro e Almeida, 2000). Esse nematóide encontra-se também disseminado, em frequências que variam de 10,7 a 24,5% das amostras em que foram encontrados nematóides do gênero *Meloidogyne* em cafezais paulistas (Lordello e Lordello, 2001), enquanto, em Minas Gerais, há apenas um relato de sua ocorrência (Santos, 1997).

*Meloidogyne exigua* é a mais amplamente distribuída, presente em quase todas as plantações de café de países da América do Sul e Central, ou como espécies separadas ou misturadas com outras espécies (Campos et al., 1990). Produz pequenas galhas nas raízes do cafeeiro, principalmente se o material sofrer dessecação (Tronconi, 1985).

As galhas são engrossamentos, de diâmetro variável, quase sempre observados nas raízes infestadas por *Meloidogyne*, resultam de hiperplasia e, principalmente, hipertrofia celular no cilindro central e, mais marcantemente, no parênquima cortical, ao redor do corpo do nematóide em desenvolvimento. São muito comuns nas plantas hospedeiras, mas não constituem sintoma obrigatório, estando ausentes em certas associações, como a de *M. coffeicola* e cafeeiro arábica, por exemplo (Ferraz e



Monteiro, 1995). As galhas estão localizadas principalmente nas extremidades das raízes, porém, em muitos casos, raízes infectadas não exibem nenhuma deformação, mas, fendilhamentos e forte descolamento dos tecidos corticais. O sistema radicular infestado apresenta-se inicialmente muito reduzido, sendo as raízes absorventes praticamente ausentes. Na parte aérea verifica-se clorose, queda prematura de folhas e decadência geral, conduzindo muitas plantas à morte, principalmente nas épocas de seca e frio (Vernalha et al., 1967/1970; Leguizamon e Lopez, 1972).

*Meloidogyne exigua* acha-se amplamente disseminada na cafeicultura brasileira, até mesmo em regiões como Triângulo mineiro e Alto Parnaíba, em Minas Gerais. As demais espécies concentram-se nos estados de São Paulo e Paraná (Gonçalves et al., 1998). A ampla disseminação de *M. exigua* nos cafeeiros do Sul de Minas, tem causado grandes prejuízos aos cafeicultores desta região. O plantio de mudas infestadas ou a infestação de plantas novas no campo tem induzido a má formação do cafezal, invariavelmente levando o produtor ao desestímulo (Almeida, 1990). Em áreas infestadas por *M. exigua* e com baixa incidência de plantas susceptíveis a este parasita, ciclos de rotação de cultura, utilizando milho, algodão, soja e capim-gordura, reduz drasticamente a população deste nematóide (Alvarenga, 1974; Moraes et al., 1977).

## 1. Identificação de nematóides

A identificação dentro do gênero *Meloidogyne* foi inicialmente baseada em características morfológicas e preferências do hospedeiro, mas estes aspectos estão sujeitos a variações difíceis de serem observadas. Além disso, já que muitas espécies de *Meloidogyne* se reproduzem por partenogênese, não são apropriados em experimentos de cruzamento para inferir relações genéticas entre grupos. Os marcadores podem diferenciar entre espécies, populações e patótipos, sendo então úteis para auxiliar os exames epidemiológicos (Fernandez e Lashermes, 2002). Outros recursos podem ser também empregados na identificação dessas espécies de nematóides, tais como: a citogenética, observações em microscópio óptico e eletrônico da parte anterior do corpo, estilete de machos, juvenis do segundo estágio e de fêmeas, RFLP (Polimorfismo de comprimento dos fragmentos digeridos), PCR (Reação em cadeia da polimerase), sondas específicas do DNA (“dot blot” por exemplo). Atualmente, a análise de isoenzimas é o método mais amplamente utilizados para classificação das espécies de *Meloidogyne* (Esbenshade e Triantaphyllou, 1985).

## 2. Resistência do cafeeiro a *M. exigua*

A planta hospedeira apresenta muitos graus de suscetibilidade. Nas consideradas alta e moderadamente suscetíveis, a reprodução do nematóide é normal, isto é, uma grande porcentagem das larvas que penetram, desenvolvem-se e, na fase adulta, produzem muitos ovos.

Em termos simples, resistência pode ser definida como o caracter da planta que inibe a reprodução do nematóide. No caso dos nematóides do gênero *Meloidogyne*, pode ser específica a raças e/ou espécies. Fontes de resistência a estes nematóides estão presentes em outras espécies de café. As espécies *C. canephora*, *C. congensis* e *C. dewevrei* podem ser utilizadas como porta-enxerto resistente ou para trabalhos de melhoramento, isto ocorre pois a resistência aos nematóides está aliada a um sistema radicular mais desenvolvido nessas espécies e/ou porque essas espécies apresentam resistência a nematóides bem como a outros patógenos. Diversos autores têm descrito resistência de *C. canephora*, *C. congensis*, *C. dewevrei*, *C. liberica*, *C. racemosa* e *C. salvatrix* a *M. exigua* (Curi *et al.*, 1970a, b; Fazuoli e Lordello, 1978).

Os híbridos entre *C. arabica* x *C. canephora*, como Icatu, Sarchimor, Catimor entre outras, vêm também sendo intensivamente estudadas em relação ao agente causador da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.), em vista de muitas plantas serem resistentes a este fungo. Têm-se verificado que essas populações apresentam também plantas resistentes a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, porém segregantes para essa característica. Algumas plantas do Híbrido de Timor e Catimor são homozigotas para resistência a *M. exigua* e apresentam características agrônomicas desejáveis (Gonçalves *et al.*, 1998).

## 3. Cultivares resistentes a *Meloidogyne exigua*

### 3.1. Iapar 59

A cultivar Iapar 59 originou-se do cruzamento entre *Coffea arabica* var. Villa Sarchi 971/10 e o Híbrido de Timor 832/2, realizado no CIFC – Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, em Portugal, onde recebeu a denominação de H361. A geração F<sub>2</sub> foi recebida pelo IAC, que a denominou LC 1669. Em 1975 o IAPAR introduziu a geração F<sub>3</sub> que passou a ser denominada Iapar 75163. Nos estudos realizados pelo IAPAR, a progênie 75163-22 destacou-se pelas características agrônomicas e resistência à ferrugem. Seu desempenho na região norte do Paraná demonstrou condições para seu lançamento como cultivar, passando a receber a

denominação de Iapar 59. É ideal para plantios adensados e superadensados, devido ao pequeno porte, resistência à ferrugem e a alguns nematóides, no entanto, é susceptível a *Cercospora coffeicola*, *Pseudomonas siringae* pv. *garcae* e ao bicho mineiro. Em estudos posteriores, verificou-se que esta cultivar apresenta resistência completa a *M. exigua*. Possui grãos de bom tamanho (peneira média 16) e qualidade de bebida semelhante à do Catuaí, além de apresentar amadurecimento mais precoce e uniforme do que a cultivar Catuaí (Diniz, 2000).

### **3.2. Porta-enxerto Apatã IAC 2258**

Dentre os germoplasmas de *C. canephora*, a cultivar porta enxerto Apatã IAC 2258, proveniente da coleção de Turrialba, Costa Rica, vem se mostrando altamente resistente a *M. exigua* e resistente e/ou tolerante a várias populações de *M. incognita* e *M. paranaensis* (Fazuoli et al., 2002). Entretanto, a tolerância à *M. paranaensis* é bastante variável (Sera et al., 2002).

## **4. Resistência e genes-R**

A caracterização de mais de 30 genes associados à resistência a doenças já foi realizada em diferentes espécies vegetais. A estrutura da maioria destes genes é consistente com o papel no reconhecimento do patógeno e na sinalização do sistema de defesa. No contexto das interações ‘gene-a-gene’, as análises genética e molecular têm mostrado que os diversos produtos desses genes de resistência (R), apresentam domínios conservados de peptídeos comuns e específicos que participam da interação proteína-proteína e da transdução de sinais (Hulbert et al., 2001). Vários estudos têm sido realizados sobre a função ou evolução destes genes (Noir e Lashermes, 2000).

A principal classe de genes-R clonados de plantas contém um sítio de ligação de nucleotídeo (NBS) e domínios de repetição ricos em leucina (LRR), além de zíper de leucina (LZ), domínios transmembrana (TM) e de interação proteína-proteína, homólogo ao receptor da interleucina-1 (TIR – “Toll/Interleukin-1 receptor”) e domínios com funções catalíticas, entre outros (Hammond-Kosack e Jones, 1997).

As regiões ricas em leucina (LRR) de alguns destes genes apresentam regiões com altos níveis de seqüências homólogas entre as repetições. Isto permite o pareamento e a recombinação de diferentes regiões dentro de um único gene, levando a genes com números diferentes de repetições (Hulbert et al., 2001).

O NBS é um elemento protéico comum e essencial para as atividades

catalíticas de várias proteínas eucarióticas e procarióticas, apresentando domínios conservados que podem ser usados para classificar as seqüências em subgrupos com funções discretas. As proteínas de resistência NBS-LRR das plantas são membros de um subgrupo distinto e específico das proteínas NBS que contém domínios adicionais de proteínas. As proteínas NBS-LRR são divididas com base na presença ou ausência de uma região homóloga TIR na posição N-terminal. As proteínas que perderam esta região TIR apresentam um domínio do tipo CC (“coiled-coil”), também na região N-terminal. A diversidade observada nas proteínas NBS-LRR indica a variedade de moléculas de reconhecimento disponíveis em um genótipo para detectar as várias mudanças bióticas (Meyers et al., 2003).

As regiões muito-conservadas dos domínios NBS têm sido utilizadas para desenhar primers degenerados que permitam a amplificação, via PCR, de análogos de genes de resistência (RGAs). Estes RGAs (“Resistance Gene Analogs”) são uma classe de genes de resistência que vem sendo estudada em diversas espécies cultivadas. Todos os membros dessa família, já identificados, possuem domínios protéicos comuns e bastante conservados com relação à seqüência de aminoácidos. Esses domínios têm função associada com o reconhecimento de proteínas de avirulência produzidas por patógenos. A importância da expressão dos RGAs durante o mecanismo de defesa das plantas é fundamental (Maluf et al., 2001). Muitos destes RGAs estão associados a loci de genes conhecidos, conferindo resistência a vírus, bactérias, fungos ou nematóides (Yu *et al.*, 1996).

Estudos prévios mostraram que genes R e RGAs tendem a se agrupar no genoma das plantas (Meyers *et al.*, 1998; Zhu et al., 2002). Para entender a organização de genes R ou grupos de RGA, grandes fragmentos de DNA, como insertos ou contigs BAC (Cromossomo Artificial de Bactéria) são necessários. As bibliotecas BAC vêm sendo usadas para várias aplicações genômicas estruturais. Em *Arabidopsis* e arroz, estas bibliotecas são usadas para o desenvolvimento de mapas físicos, permitindo examinar e comparar grandes regiões genômicas (Liu *et al.*, 2001). Algumas bibliotecas BAC foram desenvolvidas para permitir a clonagem posicional de genes de interesse como genes de resistência a doenças (Song *et al.*, 1995).

Estes genes-R são muito abundantes no genoma das plantas e apresentam-se em séries alélicas ou em agrupamentos de seqüências homólogas constituindo famílias multigênicas importantes. Estes agrupamentos individuais conferem resistência específica a vários tipos de patógenos e embora frequentemente contenham seqüências

muito relacionadas, estes genes individuais podem mostrar relações filogenéticas próximas a genes de outros agrupamentos dentro do mesmo genoma.

Diversos mecanismos moleculares incluindo duplicação, recombinação recíproca, substituição, crossing-over desigual, conversão gênica, elementos transponíveis, etc. têm sido propostos para o entendimento da estrutura dos agrupamentos de genes-R e da evolução dos tipos de resistência (Zhu et al., 2002).

O avanço destes conhecimentos representa um recurso considerável em termos de melhoramento de resistência de plantas a doenças e a conservação dos recursos genéticos. Genes de resistência podem interagir com os elicitores conservados dos patógenos ou condicionar respostas de resistência, independentes das interações específicas do gene de avirulência (Avr). A biotecnologia poderá dar suporte e permitir a transferência dos genes-R entre gêneros relacionados e a identificação ou construção de genes que proporcionem a resistência durável a vários patógenos (Etienne et al., 2002).

## **5. Mecanismos moleculares de resistência à doenças em plantas**

O pronto reconhecimento entre a proteína R e o produto do gene Avr do patógeno leva a rápida ativação de várias respostas de defesa da planta, estimulando a resistência à doença. Entre estas respostas está a morte celular localizada no local da infecção, chamada de resposta hipersensível (HR), a qual pensava-se limitar a invasão na planta pelo patógeno.

Nos últimos anos, uma procura sistemática de genes envolvidos nos sinais das vias de transdução levando a HR e a expressão de resistência tem sido feitas em *Arabidopsis*, tomate e cevada. O entendimento da base molecular da expressão e da especificidade de resistência à doença em plantas é extremamente importante. Até o momento, tem sido mostrado que sinais distintos nas vias da transdução são necessários por proteínas R estruturalmente diferentes. Há também evidências claras para a existência de pontos convergentes sinalizando vias ativadas por múltiplos genes-R. Muitos genes-R requerem genes adicionais para o seu funcionamento. A via do gene *Pto* em tomate, a qual leva a resistência à *Pseudomonas syringae*, é um dos exemplos mais bem caracterizados. Sinais de transdução originados do evento de reconhecimento Avr-*Pto* envolvem proteínas adicionais, tais como *Prf* e a proteína kinase *Pti1* a qual interage fisicamente com *Pto* (Bogdanove e Martin, 2000).

A expressão efetiva de resistência seria então arriscada pela transferência de um gene R de interesse em um fundo genético destituído dos componentes apropriados que deveriam retransmitir a informação de reconhecimento específica. Embora os dados gerados a partir de *Arabidopsis* e outras culturas contenham informações dos mecanismos moleculares que conduzem a ativação de respostas de defesa de plantas, sua aplicação direta para controlar doenças em café poderia não ser possível.

Recentemente, um projeto de ESTs (Seqüências marcadas expressas) com o intuito de caracterizar genes expressos durante a reação hipersensível de café (*C. arabica*) à ferrugem e nematóide foi iniciado (Fernandez et al., 2003). Análise funcional e clonagem de genes envolvidos nas vias de resistência a *H. vastatrix* e *Meloidogyne* sp. não conduzirão apenas a identificação de alguns componentes genéticos que controlam a resistência à doença e a morte celular, mas também poderão permitir a manipulação destes genes não-patogênicos específicos para alcançar um grande espectro de resistência em café (Fernandez et al., 2001a).

Utilizando métodos de hibridização por supressão substrativa (Diatchenko et al., 1996), bibliotecas de cDNA de café enriquecidas com seqüências especificamente expressadas durante a HR foram obtidas (Fernandez et al., 2001b; Fernandez et al., 2003). Além disso, clones recombinantes foram selecionados por hibridização diferencial com sondas de cDNA complexas geradas de grupos de mRNA resistentes e susceptíveis. Sessenta por cento dos clones seqüenciados mostraram alta similaridade com seqüências de planta em bancos de dados, e a metade deles com proteínas cujo papel em reações de defesa de plantas foi sugerido ou demonstrado como quitinases, proteínas de choque térmico, citocromo P450, metalotioneínas e canais iônicos (Choi *et al.* 1996; Guy e Li, 1998; Van Loon e Van Strien, 1999; Clough *et al.*, 2000; Whitbred e Schuler, 2000).

## **6. Clonagem do gene de resistência Mex-1 em café utilizando sondas RGA**

Noir et al. (2003) basearam-se na análise de dados de segregação de progênies F<sub>2</sub> para mostrar que a resistência a *M. exigua* é controlada por um gene principal de herança simples, designado *locus Mex-1*, introgridido a partir de *C. canephora*. Quatorze marcadores AFLP foram encontrados associados à resistência a *M. exigua* e, a partir destes resultados, um mapa genético para o *locus Mex-1* foi elaborado. Além disso, uma biblioteca BAC foi recentemente construída a partir da cultivar Iapar 59 resistente à *M. exigua*, oferecendo a possibilidade de clonagem deste gene.

Comparações de genes de resistência contra diversos patógenos de uma variedade de planta revelaram que muitas compartilham seqüências conservadas (Richter e Ronald, 2000). Avanços vêm sendo obtidos na clonagem de genes de resistência em café. Utilizando primers degenerados baseados em seqüências conservadas, nove classes distintas de análogos de genes de resistência do tipo NBS, isto é, RGAs, foram isolados das espécies *C. arabica* e *C. canephora* (Noir et al., 2001). Este trabalho descreve as relações filogenéticas entre seqüências RGAs de café e um grupo representativo de domínios do tipo NBS de genes-R conhecidos. A alta similaridade entre estes RGAs de café e os genes-R isolados de outras espécies de Angiospermas como *Arabidopsis*, tomate e arroz indicam a existência de ancestrais comuns.

A identificação por PCR de seqüências correspondentes a RGAs em diversas espécies de *Coffea* tem sido realizada utilizando seqüências correspondentes aos domínios protéicos conservados para amplificar fragmentos gênicos homólogos. Estes fragmentos gerados são então clonados, seqüenciados e comparados com bases de dados para comprovar a homologia com outros RGAs (Maluf et al., 2001). Os resultados obtidos têm sido bastante promissores, uma vez que a diversidade genética avaliada para essa família de genes nas espécies *C. canephora*, *C. racemosa* e *C. arabica* é relativamente ampla.

As principais linhas de pesquisa dos programas de melhoramento do cafeeiro, de uma maneira geral, relacionam-se à seleção de cultivares resistentes às pragas e doenças mais comuns do cafeeiro, tais como ferrugem, bicho-mineiro e nematóides. A seleção de progênies resistentes vem sendo dificultada pela crescente diversidade genética de populações de patógenos encontrada em campos cultivados. Uma alternativa para acelerar essa seleção é a identificação e a caracterização molecular dos genes diretamente associados à resistência a esses patógenos. Uma vez identificados, estes genes podem ser diretamente utilizados como marcadores em programas de seleção assistida, ou transferidos, via transformação *in vitro*, para progênies susceptíveis (Maluf et al., 2001).

A ativação dos mecanismos de defesa da planta, sem provocar alterações no genoma, denominado resistência sistêmica adquirida (SAR), representa um método promissor de proteção das plantas, o qual, em combinação com medidas convencionais, pode contribuir para o controle de doenças (Lyon e Newton, 1997).

A transferência de características desejáveis, particularmente resistência a doenças, a partir de espécies diplóides como *C. canephora* ou *C. liberica* para cultivares de *C. arabica*, sem afetar a qualidade do café, tem sido uma prioridade contínua no melhoramento do cafeeiro (Carvalho, 1988). Progenies de um híbrido interespecífico espontâneo entre *C. arabica* e *C. canephora*, o Híbrido de Timor, têm sido extensivamente utilizadas como fonte principal de resistência a ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e nematóides (*Meloidogyne* spp.) (Bettencourt, 1973; Sreenivasan et al., 1993). Entretanto, os métodos tradicionais de melhoramento do cafeeiro têm encontrado algumas dificuldades. Em particular, fortes limitações surgem em função do longo ciclo do cafeeiro, do alto custo de manutenção em campo e da perda de eficiência das estratégias atuais (Etienne et al., 2002).

## 7. Genes de resistência clonados

Durante os últimos anos ocorreu uma inovação na clonagem molecular de genes de resistência a doenças (Michelmore, 1995). A crescente lista de genes de resistência clonados inclui *HMI* (Johal e Briggs, 1992) em milho, *Pto* (Martin et al., 1993) e *Cf9* (Jones et al., 1994) em tomate, *N* (Whitham et al., 1994) em tabaco, *L6* (Lawrence et al., 1995) em linho, *RPS2* (Bent et al., 1994; Mindrinos et al., 1994) e *RPM1* (Grant et al., 1995) em *Arabidopsis* e *Xa21* (Song et al., 1995) em arroz.

Um achado notável dos genes de resistência a doenças já clonados é a semelhança de seqüências de aminoácidos ou estruturas conservadas (Michelmore, 1995). A maioria dos genes de resistência, incluindo *N*, *RPS2*, *L6* e *RPM1*, têm um sítio de ligação de nucleotídeo e repetições ricas em leucina. Se estas estruturas altamente conservadas são comuns entre muitos genes de resistência, há um potencial enorme para se isolar novos genes de resistência baseando-se em seqüências homólogas.

A utilização de *primers* de oligonucleotídeos degenerados via PCR é mais sensível no isolamento de seqüências conservadas (Lee et al., 1988; Grossberger e Parham, 1992) e será mais efetivo no potencial isolamento de genes de resistência do tipo NBS/LRR. O uso de PCR, no entanto, pode resultar na identificação de numerosos genes que contenham um domínio comum conservado, mas nada para resistência a doença (Michelmore, 1995), especialmente se os genes que contenham estes domínios forem super abundantes. *Primers* de oligonucleotídeos degenerados também foram utilizados para amplificar regiões contendo seqüências do tipo NBS para a identificação inicial de genes de resistência em soja (Yu et al., 1996).



## 8. Bibliotecas BAC como fonte de grandes insertos

A disponibilidade de uma biblioteca de DNA genômico de grandes-insertos é essencial para o mapeamento físico, para a clonagem de genes baseado em mapa, para o sequenciamento genômico (Shizuya et al., 1992; Martin et al., 1993; Sasaki e Burr, 2000) e para a análise da estrutura e função dos genes das plantas (Salimath e Bhattacharyya, 1999). Durante a última década, foram desenvolvidos alguns vetores clonando-se grandes insertos de DNA, como o bacteriófago P1 (Sternberg, 1990), o cromossomo artificial derivado de P1 (PAC) (Ioannou et al. 1994) e o cromossomo artificial de bactéria (BAC) (Shizuya et al. 1992).

O vetor BAC, desenvolvido de um plasmídeo contendo o fator-F de *Escherichia coli*, mostrou-se útil para manter estáveis fragmentos de DNA humano de 300 kb (Shizuya et al., 1992). Nestes últimos anos, este vetor também foi usado para gerar bibliotecas de DNA genômico em plantas de culturas economicamente importantes como arroz (Wang et al., 1995; Zhang et al., 1996a; Yang et al., 1997), sorgo (Woo et al., 1994), alface (Frijters et al., 1997) e soja (Marek e Shoemaker, 1997; Danesh et al., 1998). A fácil manipulação e propagação dos clones, associado a estabilidade relativamente alta e o baixo grau de quimerismo comparado aos vetores YAC (cromossomo artificial de levedura), torna as BACs uma ferramenta inigualável (Osoegawa et al., 2000).

O sucesso do desenvolvimento de um mapa físico baseado em BAC associado a uma grande cobertura do genoma, é essencial para completar o sequenciamento de todo o genoma e depende de vários fatores, incluindo o tamanho dos insertos, a representação do genoma na biblioteca fonte, o tamanho e a complexidade do genoma alvo, a metodologia e a disponibilidade de outros recursos relacionados. Para um dado genoma, o tamanho dos insertos dos clones fontes reduzem não só o número de clones necessários para desenvolvimento do mapa, mas também assegura o sucesso no desenvolvimento de um mapa físico de alta qualidade baseado em BAC.

A cobertura genômica do mapa depende de uma grande representação do genoma na biblioteca. Atualmente, a representação genômica de uma biblioteca é estimada por um cálculo simples com o número de clones multiplicado pelo tamanho médio dos insertos e dividido pelo tamanho do genoma (99% de cobertura é equivalente a aproximadamente 4,7X o genoma haplóide) (Clarke e Carbon, 1976).

Segundo Zhang e Wu (2001) a cobertura genômica teórica de uma biblioteca BAC é geralmente menor do que a sua verdadeira cobertura do genoma em cerca de

15%, e a cobertura genômica verdadeira da biblioteca pode não ser aumentada significativamente pelo simples aumento do número de clones na biblioteca. Este resultado é consistente com o resultado do mapeamento físico do genoma de *Caenorhabditis elegans* utilizando clones de cosmídeos (Hodgkin et al., 1995), no qual o número de clones equivalente a 7X o genoma haplóide (> 99%) foi usado. Entretanto, neste caso, o mapa físico gerado cobriu apenas cerca de 85% do genoma.

Todas as bibliotecas BAC atualmente utilizadas foram geradas a partir da digestão parcial de DNA de alto peso molecular com enzimas de restrição. Estudos mostraram que a distribuição dos sítios da enzima de restrição dentro de um genoma é desigual. As regiões do genoma com uma densidade particularmente alta ou baixa em sítios de restrição são difíceis de serem clonadas. Isto porque os fragmentos de DNA, muito pequenos (<40 kb) ou muito grandes (> 400 kb), gerados pela digestão parcial, são removidos durante a seleção do tamanho dos insertos a serem clonados em vetores BAC (Zhang et al., 1996b). Como resultado, ausência de seqüências clonadas pode ser encontrada em tais regiões quando a biblioteca for usada para o mapeamento físico e conseqüentemente o sequenciamento genômico. Por isso, é recomendado o desenvolvimento de várias bibliotecas BAC do mesmo genótipo com diferentes enzimas de restrição de diferentes padrões e sítios de restrição.

Várias alternativas para identificar a sobreposição de clones são usadas (Xu et al., 1998). A hibridização DNA-DNA com marcadores de DNA mapeados, combinado com “chromosome walking” é amplamente utilizado para identificar sobreposição de clones BAC. Outra alternativa para unir os clones sobrepostos (contigs) está baseado na análise do perfil de digestão do DNA de clones aleatórios (Olson e al., 1986). Um fragmento de restrição de cada clone de DNA mostra padrões de bandamento típicos quando separados em géis de alta-resolução e/ou hibridizado com sondas de DNA. Clones sobrepostos foram identificados através de fragmentos de restrição compartilhados. Utilizando este perfil de digestão do DNA de clones de cosmídeos, um mapa físico de alta qualidade do genoma do nematóide *C. elegans* foi construído (Riles et al., 1993). No entanto, sua aplicação para um genoma grande pode ser difícil (Chumakov et al., 1995).

## **9. Bibliotecas BAC em Café**

A construção de uma biblioteca BAC depende tanto de uma alta eficiência de transformação, como de uma alta proporção de vetores BAC com um tamanho

desejado de insertos. Em ambos os aspectos, o protocolo adotado por Noir et al. (comunicação pessoal) mostrou-se altamente satisfatório. Esta biblioteca consiste de 88.320 clones armazenados em placas de 384 poços. Levando em consideração os clones de organelas (4,5%) e os falso-positivos, estimados em cerca de 4%, pode-se considerar que esta biblioteca é realmente composta por 80.813 clones BAC diferentes de DNA nuclear de *C. arabica*. O tamanho do genoma di-haplóide de *C. arabica* foi estimado em cerca de 1.300Mb (Cros et al., 1995). Assim, considerando-se o tamanho médio dos insertos BAC em 130kb, a biblioteca inteira corresponderia a cerca de 10.506Mb de DNA nuclear clonado, representando aproximadamente 8X o genoma equivalente de *C. arabica* (Noir, comunicação pessoal).

Considerando um tamanho médio de inserto (I) de 130 kb, um total (N) de 80.813 clones na biblioteca e um tamanho de genoma (GS) de 1.300 Mb, a probabilidade (P) de ter uma seqüência nuclear particular representada pelo menos uma vez nesta biblioteca seria de:  $P = 1 - e^{-N \ln(1 - I/GS)}$  = 0,9997. Ou seja, há 99,97% de possibilidade de se encontrar esta determinada seqüência.

## **10. Análise do perfil de digestão e de seqüências das extremidades BAC**

A análise do perfil de digestão e das seqüências das extremidades BAC é uma estratégia associada à digestão do DNA para o mapeamento físico do genoma. Esta estratégia foi proposta por Venter et al. (1996) e posteriormente utilizada nos projetos de sequenciamento dos genomas de *Arabidopsis* (Lin et al., 1999; Mayer et al., 1999), *Drosophila* (Adams et al., 2000) e humano (Hattori et al., 2000) para selecionar clones como substrato para sequenciamento. Nesta estratégia, o sequenciamento do genoma e o mapeamento físico são executados simultaneamente.

## **11. Aplicação da técnica**

Como o uso de nematicidas em lavouras, sob o ponto de vista econômico, é muito alto por ser preciso tratar grande volume de solo e, ainda, por já estarem as raízes primárias do cafeeiro, na maioria dos casos, bastante comprometidas, com difícil recuperação (Godoy et al., 1997), o controle de nematóides através da resistência genética apresenta inúmeras vantagens, principalmente por ser um método eficiente, econômico e não-poluente (Salgado et al., 2001).

Considerando o impacto agrícola de *M. exigua* e a diversidade de populações de nematóides em campo, seria altamente útil desenvolver sondas de DNA específicas

para detecção. Entretanto, pouco é conhecido sobre a biologia molecular destes organismos (Randig et al., 2002). Entre os genótipos de *C. arabica*, a cultivar Iapar 59 apresenta resistência completa a *M. exigua* (Bertrand et al., 1999), enquanto que a linhagem de Icatu IAC 4782-925, apresenta resistência incompleta a *M. exigua* bem como a grandes populações de *M. incognita* no solo (Matiello et al., 1998).

## 12. Referências Bibliográficas

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., et al., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Almeida, V.F. 1990. Reprodutividade e sobrevivência de *Meloidogyne exigua* em áreas de cafezal infestadas submetidas a alternância de culturas. Tese de Mestrado, Lavras, 75p.
- Alvarenga, G. 1974. Determinação preliminar da longevidade, no solo, do nematóide *Meloidogyne exigua*. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 2, 1974, Poços de Caldas. Resumos... Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1974, p.45.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R.L., Giraudat, J., Leung, J.L. e Staskawicz, B.J. 1994. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, 265: 1856-1859.
- Bertrand, B., Aguilar, G., Santacreo, R. e Anzueto, F. 1999. El mejoramiento genético en América Central. In: Bertrand, B. e Rapidez, B. (eds.). Desafios de la caficultura centroamericana, IICA-CIRAD, San José, Costa Rica, p.405-456.
- Bettencourt, A. 1973. Considerações gerais sobre o Híbrido de Timor. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, Brasil, p.256.
- Bogdanove, A.J. e Martin, G.B. 2000. AvrPto-dependent *Pto*-interacting proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(16): 8836-8840.
- Campos, V.P. 1997. Café (*Coffea arabica* L.). Controle de doenças: Doenças causadas por nematóides. In: Vale, F.X.R. e Zambolim, L. (eds.). Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, UFV, v.1, p.141-180.
- Campos, V.P., Lima, R.D. e Almeida, V.F. 1985. Nematóides parasitas do cafeeiro. Informe Agropecuário, 11: 50-58.
- Campos, V.P., Sivapalan, P. e Gnanapragasam, C. 1990. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: Luc, M., Sikora, R.A. e Bridge, J. (eds.). Plant parasitic

- nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, UK: CAB International., p.387-430.
- Carneiro, R.M.D.G. e Almeida, M.R.A. 2000. Distribution of *Meloidogyne* spp on Coffee in Brazil: identification, characterization and intraspecific variability. In: Mejoramiento sostenible del Café arabica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, com énfasis en la resistencia a los nemátodos, 2000, Turrialba. Publicación Especial. CATIE/IRD, Turrialba, p.43-48.
- Carneiro, R.M.D.G., Carneiro, R.G., Abrantes, I.M.O., Santos, M.S.N. e Almeida, M.R.A. 1996. *Meloidogyne paranaensis* sp. (Nemata: Meloidogynidae) a root-knot nematode parasitizing coffee from Brazil. J. Nematology, 28: 177-189.
- Carvalho, A. 1988. Principles and practices of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In "Coffee vol 4: Agronomy". Clarke R.J. e Macrae R. (eds.), London, p.129-165.
- Choi, D., Kim, H.M., Yun, H.K., Park, J.A., Kim, W.T. e Bok, S.H. 1996. Molecular cloning of a metallothioneine-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. Plant Physiol., 112: 353-359.
- Chumakov, I.M., Rigault, P., Le Gall, I., Bellanne-Chantelot, C., Billault, A., Guillou, S., Soularue, P., Guasconi, G., Poullier, E. e Gros, I. 1995. A YAC contig map of the human genome. Nature, 377(6547 Suppl): 175-297.
- Clarke, L. e Carbon, J. 1976. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. Cell, 9: 91-100.
- Clough, S.J, Fengler, K.A., Yu, I.C., Lippok, B., Smith, R.K. e Bent, A.F. 2000. The *Arabidopsis* dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 16: 9323-8.
- Cros, J., Combes, M.-C., Chabrillange, N., Duperray, C., Monnot des Angles, A. e Hamon, S. 1995. Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (Rubiaceae): inter and intra-specific variation in African species. Can. J. Bot., 73: 14-20.
- Curi, S.M., Carvalho, A., Moraes, F.P., Mônaco, L.C. e Arruda, H.V. 1970a. Novas fontes de resistência genética de *Coffea* no controle de nematóide do cafeeiro *Meloidogyne exigua*. O Biológico, 36: 293-295.
- Curi, S.M., Lordello, L.G.G., Bona, A. e Cintra, A.F. 1970b. Atual distribuição geográfica dos nematóides do cafeeiro (*Meloidogyne coffeicola* e *M. exigua*) no Estado de São Paulo. O Biológico, São Paulo, 36:26-28.

- Danesh, D., Peñuela, S., Mudge, J., Denny, R., Nordstrom, H., Matinez, J. e Youn, N. 1998. A bacterial artificial chromosome library for soybean and identification of clones near a major cyst nematode resistance gene. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 196-202.
- Diatchenko, L., Lau, Y-F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. e Siebert, P.D. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6025-6030.
- Diniz, L.E.C. 2000. Relação genética entre 40 acessos de *Coffea arabica* L. indicada pela técnica de RAPD associada a digestão por enzimas de restrição. Tese de Mestrado. Londrina, 172p.
- Esbenshade, P.R. e Triantaphyllou, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *J. Nematology*, 17: 6-20.
- Etienne H., Anthony F., Dussert S., Fernandez D., Lashermes P. e Bertrand B. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica*). *In vitro Cell Dev. Biol-Plant*, 38: 129-138.
- Fazuoli, L.C. e Lordello, R.R.A. 1978. Fontes de resistência em espécies de cafeeiros ao nematóide *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, 3: 49-52.
- Fazuoli, L.C., Medina Filho, H.P., Gonçalves, W., Guerreiro Filho, O. e Silvarolla, M.B. 2002. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônomo de Campinas. In: Zambolim, L. (ed.). O Estado da arte de tecnologias na produção de café, p.163-215.
- Fernandez D. e Lashermes P. 2002. Molecular tools for improving coffee (*Coffea arabica* L.) resistance to parasites. In: Molecular techniques in crop improvement. Mohan Jain, S., Brar, D.S. e Ahloowalia, B.S. (eds.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, p.327-346.
- Fernandez, D., Noir, S., Agostini, C., Bon, M-C., Combes, M-C., Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L., Anthony, F., Bertrand, B. e Lashermes, P. 2001a. Molecular physiology and genetics of coffee resistance to parasites. Proceedings of the XIX Scientific Colloquium on Coffee, ASIC, Trieste, Italy, Asic (eds.), Paris, CD-Rom, 7p.
- Fernandez, D., Santos, P., Bom, M-C., Combes, M-C., Agostini, C., Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L. e Ribeiro, A. 2001b. Construction of libraries of coffee cDNA sequences early expressed during hypersensitive response to the rust pathogen *Hemileia vastatrix*, using subtractive suppressive hybridization. In:

- Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 11., e Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, 3., 17-20 de setembro de 2001. Proceedings... Evora, Portugal, p.196-198.
- Fernandez, D., Santos, P., Agostini, C., Bom, M-C., Petitot, A-S., Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L., Ribeiro, A. e Nicole, M. 2003. Early expressed coffee genes in the hypersensitive reaction to the rust fungus *Hemileia vastatrix*. Poster apresentado no 11º Congresso MPMI, 18-26 Julho, São Petersburgo, Rússia.
- Ferraz, L.C.C.B. e Monteiro, A.R. 1995. Nematóides. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. e Amorim, L. (eds.). Manual de Fitopatologia, Ed. Agronômica Ceres, p.168-201.
- Frijters, A.C.J., Zhang, Z., van Damme, M., Wang, G-L., Ronald, P.C. e 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.
- Godoy, C.V., Bergamin Filho, A. e Salgado, C.L. 1997. Doenças do Cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. e Rezende, J.A.M. (eds.). Manual de Fitopatologia, Doenças das Plantas Cultivadas, v.2, p.184-200.
- Gonçalves, W., Silvarolla, M.B. e Lima, M.M.A. 1998. Estratégias visando a implementação do manejo integrado dos nematóides parasitas do cafeeiro. *Informe Agropecuário*, 19(193): 36-47.
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W. e Dangl, J.L. 1995. Structure of the Arabidopsis *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269: 843-846.
- Grossberger, D. e Parham, P. 1992. Reptilian class I major histocompatibility complex genes reveal conserved elements in class I structure. *Immunogenetics*, 36(3): 166-174.
- Guy, C.L. e Li, Q.B. 1998. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell*, 10: 539-556.
- Hammond-Kosack K.E. e Jones J.D.G. 1997. Plant disease resistance genes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 575-607.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., et al., 2000. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405(6784): 311-319.
- Hodgkin, J., Plasterk, R.H.A. e Waterston, R.H. 1995. The nematode *Caenorhabditis elegans* and its genome. *Science*, 270: 410-414.
- Hulbert, S., Webb, C.A., Smith, S.M. e Sun, Q. 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 39: 285-312.

- Ioannou, P.A., Amemiya, C.T., Garnes, J., Kroisel, P.M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M.A. e de Jong, P.J. 1994. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Genet.*, 6: 84-89.
- Johal, G.S. e Briggs, S.P. 1992. Reductase activity encoded by the *Hm1* disease resistance gene in maize. *Science*, 258: 985-987.
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. e Jones, J.D.G. 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, 266: 789-793.
- Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A. e Ellis, J.G. 1995. The *L6* Gene for Flax Rust Resistance Is Related to the *Arabidopsis* Bacterial Resistance Gene *RPS2* and the Tobacco Viral Resistance Gene *N*. *Plant Cell*, 7: 1195-1206.
- Lee, C.C., Wu, X., Gibbs, R.A., Cook, R.G., Munzy, D.M. e Caskey, C.T. 1988. Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence: cloning of urate oxidase. *Science*, 239: 1288-1291.
- Leguizamón, J.C. e Lopez, D.S. 1972. Nematodos en plantaciones de café em Colombia. *Cenicafe, Avances Técnicos* 20, 4p.
- Lima, R.D., Campos, V.P., Huang, S.P. e Melles, C.C.A. 1985. Reprodutividade e parasitismo de *Meloidogyne exigua* em ervas daninhas que ocorrem em cafezais. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, 9: 63-72.
- Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., et al., 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 402: 761-768.
- Liu, H., Sachidanandam, R. e Stein, L. 2001. Comparative genomics between rice and *Arabidopsis* shows scant collinearity in gene order. *Genome Res.*, 11: 2020-2026.
- Lopez, R. e Salazar, L. 1989. *Meloidogyne arabicida* sp. (Nematoda: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: un nuevo y severo patógeno del café, *Turrialba*, 39, 313-323
- Lordello, L.G.E. 1972. Nematode pests of coffee. In: Webster, J.M. ed. *Economic Nematology*, London, Academic Press, 563p.
- Lordello, L.G.E., 1986. Plant-parasitic nematodes that attack coffee. In: Union Carbide Agricultural Products Company Inc. (ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of Bananas, Citrus, Coffee, Grapes, and Tobacco*. Union Carbide, North Carolina, p.33-41.
- Lordello, A.I.L. e Lordello, R.R.A. 2001. Nematóides encontrados em cafezais do Estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 23, 2001, Garça. Resumos... Garça: SBN/FAEF, p.85.



- Lordello, L.G.E. e Hashizume, H. 1971. Suscetibilidade da variedade Kouillou de *C. canephora* a um nematóide. Revista de Agricultura, Piracicaba, 46: 157-158.
- Lyon, G.D. e Newton, A.C. 1997. Do resistance elicitors offers new opportunities in integrated disease control strategies. Plant Pathology, 46: 636-641.
- Maluf, M.P., Guerreiro Filho, O. e Fazuoli, L.C. 2001. Biotecnologia: aporte tecnológico ao Melhoramento do cafeeiro no IAC. O Agrônomo, 53(2): 5-7.
- Marcuzzo, K.V., Santos, M.A., Juliatti, F.C., Melo, B. e Severino, G.M. 2000. Uso de nematicidas no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. exigua* em cafeeiro, no município de Indianópolis, MG. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 1, 2000, Poços de Caldas. Resumos expandidos. Brasília: EMBRAPA, p.260-261.
- Marek, L. e Shoemaker, R. 1997. BAC contig development by fingerprint analysis in soybean. Genome, 40: 420-427.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D. e Tanksley, S.D. 1993. Map-based-cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science 262: 1432-1436.
- Matiello, J.B., Almeida, S.R. e Carneiro Filho, F. 1998. Novo cultivar resistente ao nematóide *Meloidogyne incognita*, à ferrugem do cafeeiro e com boa produtividade. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 24, Poços de Caldas, MG. Resumos... Rio de Janeiro, IBC/GERCA, p.2-3.
- Mayer, K., Schüller, C., Wambutt, R., et al., 1999. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature, 402: 769-777.
- Meyers, B.C., Chin, D.B., Shen, K.A., Sivaramakrishnan, S., Lavelle, D.O., Zhang, Z. e Michelmore, R.W. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. Plant Cell, 10: 1817-1832.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. e Michelmore, R.W. 2003. Genome-Wide Analysis of NBS-LRR-Encoding Genes in Arabidopsis. Plant Cell, 15: 809-834.
- Michelmore, R.W. 1995. Isolation of disease resistance genes from crop plants. Curr. Opin. Biotechnol., 6: 145-152.
- Mindrinos, M., Katagiri, F., Yu, G-L. e Ausubel, F.M. 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. Cell, 78: 1089-1099.
- Moraes, M.V., Lordello, L.G.E., Reis, A.J., Thomasiello, R.A., Lordello, R.R.A. e Gonçalves, N. 1977. Ensaio de rotação de cultura para reaproveitamento, com cafeeiro, de terras infestadas por *Meloidogyne exigua*. In: Reunião Brasileira de

- Nematologia, 2, Piracicaba, 1977, Piracicaba, Sociedade Brasileira de Nematologia, p.257-65.
- Moura, R.M. 1997. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte II. In: LUZ, W.C. (Ed.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo: Gráfica e Editora Pe. Berthier, 1997. v.5, p.281-315.
- Noir, S. e Lashermes, P. 2000. Organisation et évolution des gènes de résistance chez les plantes. Cahiers Agricultures, 8: 301-309.
- Noir, S., Anthony, F., Bertrand, B., Combes, M.-C. e Lashermes, P. 2003. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. Plant Pathol., 52: 97-103.
- Noir, S., Combes, M.-C., Anthony, F. e Lashermes, P. 2001. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). Mol. Genet. Genomics, 265: 654-662.
- Olson, M.V., Dutchik, J.E., Graham, M.Y., Brodeur, G.M., Helms, C., Frank, M., MacCollin, M., Scheinman, R. e Frank, T. 1986. Random-clone strategy for genomic restriction mapping in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(20): 7826-30.
- Osoegawa, K., Tateno, M., Woon, P.Y. Frengen, E., Mammoser, A.G., Catanese, J.J., Hayashizaki, Y. e Jong. P.J. 2000. Bacterial Artificial Chromosome Libraries for Mouse Sequencing and Functional Analysis. Genome Res., 10: 116-128.
- Randig, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R.M.D.G., Sarah, J.-L. e Castagnone-Sereno, P. 2002. A species-specific satellite DNA family in the genome of the coffee root-knot nematode *Meloidogyne exigua*: application to molecular diagnostics of the parasite. Mol. Plant Pathol., 3(6): 431-437.
- Richter, T.E. e Ronald, P.C. 2000. The evolution of disease resistance genes. Plant Mol. Biol., 42: 195-204.
- Riles, L., Dutchik, J.E., Baktha, A., McCauley, B.K., Thayer, E.C., Leckie, M.P., Braden, V.V., Depke, J.E. e Olson, M.V. 1993. Physical Maps of the Six Smallest Chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae* at a Resolution of 2,6 Kilobase pairs. Genetics, 134: 81-150.
- Salgado, S.M.L., Campos, V.P., Krzyzanowski, A.A. e Resende, M.L.V. 2001. Resistência de cafeeiros IAPAR-59 a *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887. In: II Simposio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, p.1397-1403.

- Salimath, S.S. e Bhattacharyya, M.K. 1999. Generation of a soybean BAC library, and identification of DNA sequences tightly linked to the *RPS1* disease resistance gene. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 712-720.
- Santos, J.M. 1997. Estudo das principais espécies de *Meloidogyne* Goeldi que infectam o cafeeiro no Brasil com descrição de *Meloidogyne goeldii* sp. Tese de Doutorado. UNESP, Botucatu. 153p.
- Sasaki, T. e Burr, B. 2000. International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3: 138-141.
- Sera, T., Alteia, M.Z. e Petek, M.R. 2002. Melhoramento do Cafeeiro: Variedades Melhoradas no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR). In: Zambolim, L. (ed.). O Estado da arte de tecnologias na produção de café. Cap. 6, p.217-251.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. e Simon, M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using a F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8794-8797.
- Sijmons, P.C., Atkinson, H.J. e Wyss, U. 1994. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 32: 235-259.
- Song, W.-Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.-S., Pi, L.-Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.-X., Zhu, L.-H., Fauquet, C. e Ronald, P. 1995. A receptor kinase protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science*, 270: 1804-1806.
- Souza, S.E., Santos, J.M., Matos, R.V., Ramos, J.A., Santos, F.S., Ferraz, R.C.N., Carvalho, G.S. e Oliveira, C.A. 2000. Levantamento preliminar de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado da Bahia - Planalto de Vitória da Conquista e Chapada Diamantina. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 1, 2000, Poços de Caldas. Resumos expandidos. Brasília: EMBRAPA, p.167-170.
- Spiegel, Y., Cohn, E. e Kafkaki, U. 1982. The influence of ammonium and nitrate nutrition of tomato plants on parasitism by root-knot nematode. *Phytoparasitica*, 10: 33-40.
- Sreenivasan, M.S., Ram, A.S. e Prakash, N.S. 1993. Tetraploid interespecific hybrids in coffee breeding in India. Proceedings of 15<sup>th</sup> Colloquium of International Coffee Science Association, Montpellier, França. ASIC: Paris: p.226-233.
- Sternberg, N. 1990. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 103-107.

- Tronconi, N.M. 1985. Alguns aspectos ecológicos de *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, parasitando mudas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.). Dissertação de Mestrado, Viçosa, UFV, 80p.
- Vaast, Ph., Caswell-Chen, E.P. e Zasoski, R.J. 1998. Effects of two endoparasitic nematodes (*Pratylenchus coffeae* and *Meloidogyne konaensis*) on ammonium and nitrate uptake by Arabica coffee (*Coffea arabica* L.). *Applied Soil Ecol.*, 10: 171-178.
- Van Loon, L.C. e Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 55: 85-97.
- Venter, J.C., Smith, H.O. e Hood, L. 1996. A new strategy for genome sequencing. *Nature*, 381: 364-366.
- Vernalha, M.M., Zappia, O., Mansur, R. e Rodríguez, S. 1967/1970. Sobre a ocorrência de nematóides do cafeeiro no estado do Paraná. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 13(4): 33-39.
- Wang, G.L., Holsten, T.E., Song, W.Y., Wang, H.P. e Ronald, P.C. 1995. Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa-21 disease resistance locus. *Plant J.*, 7: 525-533.
- Whitbred, J.M. e Schuler, M.A. 2000. Molecular Characterization of Cyp73a9 and Cyp82a1 P450 Genes Involved in Plant Defense in Pea. *Plant Physiology*, 124:47-58.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. e Baker, B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78: 1101-1115.
- Williamson, V.M. e Hussey, R.S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*, 8: 1735-1745.
- Woo, S., Jiang, J., Gill, B., Paterson, A. e Wing, R. 1994. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucl. Acids Res.*, 22: 4922-4931.
- Xu, J., Yang, D., Domingo, J., Ni, J. e Huang, N. 1998. Screening for overlapping bacterial artificial chromosome clones by PCR analysis with an arbitrary primer (bacterial artificial chromosome library contig physical mapping). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5661-5666.
- Yang, D., Parco, A., Nandi, S., Subudhi, P., Zhu, Y., Wang, G. e Huang, N. 1997. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and identification of

- overlapping BAC clones with chromosome 4-specific RFLP markers in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 1147-1154.
- Yu, Y.G., Buss, G.R. e Saghai Maroof, M.A. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11751-11756.
- Zhang, H.B., Choi, S., Woo, S.S., Li, Z e Wing, R.A. 1996a. Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. *Mol. Breed.*, 2: 11-24.
- Zhang, H.B, Woo, S.S. e Wing R.A. 1996b. BAC, YAC and cosmid library construction. In: Foster G., Twell D. (eds.). *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*, John Wiley e Sons Ltd, England, p.75–99.
- Zhang, H.B. e Wu, C. 2001. BAC as tools for genome sequencing. *Plant Physiol. Biochem.*, 39: 195-209.
- Zhu, H., Cannon, S.B., Young, N.D. e Cook, D.R. 2002. Phylogeny and Genomic Organization of the TIR and non-TIR NBS-LRR Resistance Gene Family in *Medicago truncatula*. *MPMI*, 15(6): 526-539.

## Capítulo 1

### Mapeamento detalhado da região *Mex-1* e identificação de clones BAC contendo prováveis genes de resistência em café (*Coffea arabica* L.)

#### RESUMO

O nematóide de galhas *Meloidogyne exigua*, parasita o cafeeiro e sua erradicação das regiões infestadas é impraticável. Estudos anteriores mostraram que a resistência a *M. exigua* é controlada por um gene de herança simples, designado *Mex-1*, presente em *C. canephora*. Linhagens de café arábica apresentando resistência têm sido desenvolvidas em programas de melhoramento genético por meio da introgressão deste gene. Uma biblioteca BAC de café foi desenvolvida e permitirá acelerar o mapeamento do gene *Mex-1*. Ela foi avaliada inicialmente utilizando-se 3 marcadores (Exi-2, Exi-3 e Exi-4) ligados a *Mex-1*, obtidos a partir de marcadores AFLP previamente clonados. Dezoito clones positivos associados à região *Mex-1* foram identificados e isolados. Os clones BAC Exi-2 e Exi-3 foram separados em 2 contigs homeólogos sugerindo que o fragmento introgridido associado a *Mex-1* é o resultado de uma recombinação homóloga entre os genomas de *C. canephora* e um dos dois subgenomas de *C. arabica*. O DNA dos clones foi então analisado por hibridização e amplificação com marcadores SCAR (Exi-2 e Exi-3) e 9 combinações de primers das extremidades BAC. Os clones BAC positivos, relativos aos marcadores Exi-2, Exi-3 e Exi-4, foram reunidos em 5 contigs. O primeiro contig apareceu composto de dois clones BAC positivos com o marcador Exi-4. Dos cinco clones BAC identificados com o marcador Exi-2, dois contigs designados Exi-2 I e Exi-2 II foram distintos. Os clones BAC positivos Exi-3 foram organizados em dois contigs distintos chamados Exi-3 I e Exi-3 II. No total, nove sítios de restrição ou de PCR, correspondendo a sete marcadores físicos foram localizados na região Exi-3. As três regiões cromossômicas correspondentes ao contig Exi-4, aos dois contigs Exi-2 e aos dois contigs Exi-3 não apresentaram sobreposição. A presença, na região *Mex-1*, de clones BAC contendo análogos de genes de resistência (RGA) foi investigado por amplificação com primers degenerados e hibridização com sondas RGA. Clones BAC positivos foram identificados para várias famílias de RGA. A região *Mex-1* parece formar um complexo agrupamento de genes de resistência.

## INTRODUÇÃO

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas cultivados no mundo, sendo *Coffea arabica* a espécie responsável por cerca de 70% do total da produção mundial de café e é caracterizado por uma baixa diversidade genética (Anthony *et al.*, 2002). A transferência de características desejadas das espécies diplóides tem sido uma prioridade contínua no melhoramento do café (Carvalho, 1988).

Progênes de “Híbrido de Timor”, um híbrido interespecífico espontâneo entre *C. arabica* e *C. canephora*, vem sendo extensivamente utilizado como fonte principal de resistência a doenças (Cramer, 1957; Bettencourt, 1973; Sreenivasan *et al.*, 1993; Etienne *et al.*, 2002), entre elas aquelas causadas pelos nematóides do gênero *Meloidogyne* spp.

Dentre as espécies desses nematóides que infestam as raízes do cafeeiro, as que causam os maiores danos à cafeicultura brasileira são *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. coffeicola* e *M. exigua*. Dentre elas, a que está mais disseminada no Brasil é *M. exigua*, no entanto, em comparação com as demais é a que causa os menores danos à planta. Considerando o impacto agrícola de *M. exigua* e a diversidade de populações de nematóides no campo, seria altamente útil desenvolver sondas de DNA específicas para sua detecção. Entretanto, pouco é conhecido sobre a biologia molecular destes organismos (Randig *et al.*, 2002). Entre as cultivares de *C. arabica* resistentes a nematóide, a cultivar Iapar-59, derivada do “Híbrido de Timor” apresenta resistência completa a *M. exigua* (Bertrand *et al.*, 1999; Sera, 2001; Sera *et al.*, 2002), enquanto que a linhagem Icatu IAC 4782-925 apresenta resistência incompleta a *M. exigua* e a grandes populações de *M. incognita* no solo (Matiello *et al.*, 1998).

A seleção de progênes resistentes vem sendo dificultada pela crescente diversidade genética de populações de patógenos encontrada. Uma alternativa para acelerar essa seleção é a identificação e a caracterização molecular dos genes diretamente relacionados com a resistência a esses patógenos. Uma vez identificados, poderão ser utilizados como marcadores em programas de seleção assistida, ou transferidos, via transformação *in vitro* de tecidos indiferenciados, para progênes susceptíveis (Maluf *et al.*, 2001). Dessa maneira, pode-se desenvolver cultivares de café resistentes a diversas pragas e doenças a partir da introdução de genes específicos para a resistência a cada um dos agentes fitopatogênicos.

Avanços recentes têm sido obtidos na clonagem de genes de resistência em café. Comparações de genes de resistência contra diversos patógenos de plantas revelaram que muitas compartilham seqüências conservadas (Richter e Ronald, 2000). Utilizando primers degenerados baseados em seqüências conservadas, nove classes distintas de análogos de genes de resistência do tipo NBS, isto é, RGAs, representando uma grande diversidade já foram isolados das espécies *C. arabica* e *C. canephora* (Noir et al., 2001).

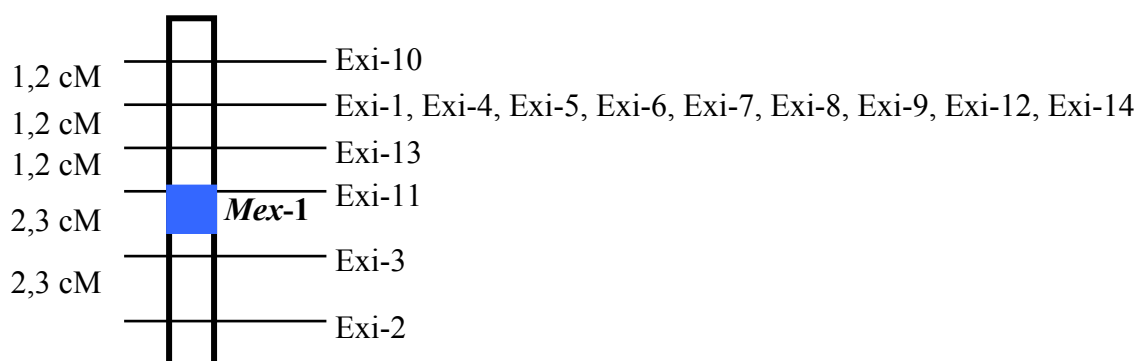
As relações filogenéticas entre seqüências de RGAs de café e um grupo representativo de domínios do tipo NBS de genes-R conhecidos (isolados de *Arabidopsis*, tomate, batata, pimenta, alface, milho e arroz) foi investigado. A maioria dos RGAs de café são proximamente relacionados à seqüências de pelo menos um gene-R conhecido. A alta similaridade entre RGAs específicos de café e genes-R isolados de outras espécies de Angiospermas como *Arabidopsis*, tomate e arroz, indicam a existência de ancestrais comuns (Noir et al., 2001). Esforços têm sido feitos para explorar a possibilidade de uso de famílias de RGAs de café isolados em resistência específica (Fernandez e Lashermes, 2002).

A identificação de seqüências correspondentes a RGAs em diversas espécies de *Coffea* tem sido realizada utilizando seqüências correspondentes aos domínios protéicos conservados, via PCR, para amplificar fragmentos gênicos homólogos em café. Estes fragmentos gerados são então clonados, seqüenciados e comparados com bases de dados para comprovar a homologia com outros genes RGA (Maluf et al., 2001). Os resultados obtidos por este grupo têm sido bastante encorajadores, uma vez que a diversidade genética avaliada para essa família de genes em *C. canephora*, *C. racemosa* e *C. arabica* é relativamente ampla. Esses genes podem servir também como marcadores durante a seleção de progênies resistentes.

Um certo número de linhas introgridas de *C. arabica* exibindo um certo nível de resistência a *M. exigua* foi selecionado. Estudos anteriores mostraram que a resistência a *M. exigua*, introgrida de *C. canephora*, é controlado por um gene maior de herança simples designado *Mex-1* (Figura 1) (Noir et al., 2003). Quatorze marcadores AFLP foram encontrados associados com a resistência a *M. exigua* e um mapa genético posicionando o *locus Mex-1* foi construído. Além disso, uma biblioteca BAC foi recentemente construída a partir da cultivar Iapar 59 (Noir et al., comunicação pessoal), resistente a *M. exigua*, oferecendo a possibilidade de clonagem deste gene. Muitos pesquisadores têm demonstrado que bibliotecas BAC



são apropriadas para a clonagem baseada em mapa e para o mapeamento físico. Os resultados apresentados demonstram a viabilidade de tais aproximações na espécie alotetraplóide *C. arabica*.



**Figura 1.** Mapa genético da região cromossômica contendo o *locus Mex-1* em café para a resistência a *Meloidogyne exigua* baseado em uma população  $F_2$  (adaptado a partir de Noir et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi de construir um mapa físico da região do *locus Mex-1*, utilizando para isso, contigs BAC correspondendo a marcadores moleculares que flanqueiam *Mex-1*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Genetrop do ‘Institute de Recherche pour le Développement’ (IRD), Montpellier, França, sob coordenação do Dr. Philippe Lashermes. A presença dentro da região *Mex-1* de clones BAC contendo RGAs foi analisada por amplificação via PCR de primers degenerados, hibridização com sondas RGA e sequenciamento dos RGAs presentes na região *Mex-1*.

A biblioteca BAC utilizada neste trabalho foi previamente construída por Noir et al. (2003) a partir do DNA genômico da cultivar Iapar 59, que apresenta o fragmento de DNA introgrado, o gene *Mex-1*, o qual confere resistência a *M. exigua*.

Para alcançar os objetivos propostos neste trabalho, sondas RGAs foram utilizadas para hibridizar uma biblioteca BAC para fins de identificação de genes ou fragmentos de genes de resistência. Além das sondas RGA, primers degenerados foram utilizados, via PCR, para identificar as regiões conservadas do gene de resistência para serem utilizados como sondas. Dos marcadores AFLP acima descritos no mapa genético, nove marcadores foram utilizados. Não foi possível converter todos os marcadores AFLP utilizados em SCAR (Região amplificada de seqüências caracterizadas) para que fossem utilizados para hibridização dos filtros BAC.

Filtros de alta-densidade foram feitos utilizando o robô Q-Bot (Genetix). Os clones BAC foram duplamente plotados (pontos) sobre filtros de nylon Hybond-N+ (Amersham-Pharmacia) utilizando um padrão de 5 x 5 com 24 clones em 2 repetições de 12. Os clones da reação de ligação dos fragmentos esperados de tamanho variando entre 250-300 e 300-350 kb foram utilizados como padrão. No total, 27.648 clones, ou seja, 72 placas de 384 poços da biblioteca BAC foram plotados sobre um filtro de 22,5 x 22,5cm. Os filtros inoculados foram incubados por 14h a 37°C e a transferência do DNA das colônias nos filtros foi feita.

### **1) Avaliação da biblioteca BAC e identificação de clones positivos**

A identificação dos clones BAC que correspondiam aos marcadores moleculares AFLP (Exi-2, Exi-3 e Exi-4) flanqueando o gene de resistência *Mex-1* foi realizada por hibridização e por seleção baseada em PCR. As bandas dos marcadores Exi-2, Exi-3 e Exi-4 foram clonadas e marcadores SCAR foram desenvolvidos (Noir *et al.*, 2003). Além das sondas acima citadas, foram também utilizadas para hibridização dos filtros BAC os marcadores AFLP Exi-11 e Exi-13.

Os filtros de alta densidade analisados continham 27.648 clones da biblioteca BAC da cultivar Iapar-59. Esta fração de clones analisados representa aproximadamente 3,5X o genoma equivalente de *C. arabica*.

A avaliação da biblioteca BAC realizada por amplificação, via PCR, foi realizada a partir de 36.864 clones BAC armazenadas em 96 placas de 384 poços. Estes clones BAC incluem os 27.648 clones, representados nos pontos das colônias dos filtros, e representam aproximadamente 4,2 vezes o genoma equivalente de

*C. arabica*. De cada placa, um grupo foi preparado pela mistura dos 384 clones. A partir da cultura celular de cada grupo, células de *E. coli* foram coletadas por centrifugação e ressuspendidas em TE com glicerol (10mM de Tris, 10mM de EDTA pH 8,0 e 5% de glicerol). O DNA das BACs destes 96 grupos foi extraído por quatro repetições de aquecimento (até a ebulição) e centrifugação por 5 minutos a 5.000g. Os sobrenadantes diluídos contendo o DNA das BACs foram utilizados como DNA molde para a avaliação. Os 96 grupos de DNA das BACs foram então submetidos a uma seleção por PCR utilizando os 3 marcadores SCARs, Exi-2, Exi-3 e Exi-4.

## 2) Desenvolvimento de contigs BAC

Os clones BAC selecionados foram crescidos por 48h a 37°C em 1,5mL de meio de cultura 2YT contendo cloranfenicol (12,5µg/mL). O DNA das BACs foi extraído através de lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Para conferir o tamanho de cada clone BAC, cada DNA plasmidial foi digerido pela enzima de restrição *NotI* e separados em gel de agarose 1% em TBE 0,5X, em um aparelho CHEF-DRIII (Bio-Rad), utilizando os seguintes parâmetros de eletroforese em campo pulsado (PFGE): pulsos variando de 1-40 segundos, com um ângulo de 120°, corrente de 6V/cm<sup>2</sup>, 11 horas de corrida à uma temperatura constante na cuba de 12°C.

Os plasmídeos destes clones BAC foram digeridos pela enzima *HindIII* a 37°C por 5 horas. O produto de digestão foi aplicado em gel de agarose 1% e submetido à eletroforese por 22 horas a voltagem constante (100V) em tampão TAE 1X mantidos sob temperatura controlada (12°C). Após a eletroforese, os géis foram corados com 'SYBR<sup>®</sup> Green' e visualizados sob luz ultravioleta. Os fragmentos de DNA dos clones BAC digeridos com *HindIII* foram recuperados e utilizados para a montagem do contig BAC.

### 2.1. Marcação das sondas e hibridização dos filtros de alta densidade

As sondas foram marcadas com [32P]-dCTP conforme as recomendações do fabricante (Megaprime DNA labelling systems kit, Amersham) e adicionadas à solução de hibridização. A hibridização foi realizada durante a noite a 60°C em uma solução de 5X SSC, 0,5% SDS, 5X Denhardt, 25mM de tampão fosfato de potássio pH 6,5 e 0,1mg/mL de DNA de esperma de salmão, previamente desnaturado.

Após a hibridização, os filtros foram lavados a 60°C três vezes por 15 minutos nas seguintes soluções: 2X SSC com 0,1% SDS, seguida da solução 1X SSC

e 0,1% SDS e, em alguns casos, foi necessário uma terceira e última lavagem em uma solução de 0,5X SSC com 0,1% SDS. Após as três etapas de lavagem, os filtros foram colocados em cassetes de revelação apropriados para exposição de filmes de raio-X à radiação. O filme permaneceu por pelo menos 6 horas a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , sendo retirados cerca de 30 minutos antes da revelação do filme.

Após a revelação do filme, identificaram-se os pontos hibridizados pelas sondas, os quais foram recuperados da biblioteca BAC. Os filmes de alta densidade utilizados foram armazenados em solução SSC 2X por pelo menos 3 semanas, para que a taxa de radiação emitida diminuísse e os filtros pudessem ser novamente utilizados.

## 2.2. Sequenciamento e mapeamento das extremidades BAC

As extremidades dos clones BAC associadas aos marcadores Exi-2, Exi-3 e Exi-4 foram seqüenciadas em um ou nos dois lados do inserto utilizando os primers universais, T7 e SP6 (Laboratório Genoma-Express, França). As combinações de primers específicos às seqüências das extremidades BAC foram desenhadas e utilizadas em uma reação de amplificação (PCR) com um volume de reação de  $50\mu\text{L}$  contendo os seguintes reagentes: 25ng de DNA plasmidial,  $1\mu\text{M}$  dos primers de cada extremidade BAC,  $50\mu\text{M}$  de dNTPs, tampão de PCR 1X (Promega),  $1,5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  e 0,5U de Taq DNA polimerase (Promega). Um termociclador da MJ Research, modelo PTC-200, foi utilizado para as amplificações de PCR. O ciclo de amplificação utilizado constituiu-se de uma denaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de denaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, anelamento a  $58^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos e alongamento (síntese) a  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, terminando com uma extensão final por 6 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . O produto da PCR foi separado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X.

Os DNAs plasmidiais dos clones BAC relacionados aos marcadores Exi-2, Exi-3 e Exi-4 foram digeridos com as endonucleases *Hind*III e *Eco*RI para análise por *Southern blot*. Os fragmentos digeridos foram separados em gel de agarose 1% e posteriormente transferidos para uma membrana de nylon Hybond-N+. Os primers das extremidades BAC foram utilizados para re-amplificar os produtos de PCR dos plasmídeos BAC correspondentes. Os produtos de PCR foram purificados, clonados e utilizados como sondas (sondas das extremidades BAC). A marcação e hibridização foram feitas como descritos acima para o screening da biblioteca BAC. Para o sequenciamento das extremidades BAC, um miniprep foi preparado.

### 2.2.1. Miniprep para as BACs

Para a obtenção de DNA puro, sem os plasmídeos, foi utilizada a técnica do mini-prep conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Depois de diluídos, os ‘minipreps’ foram testados para verificação da qualidade e da quantidade de DNA.

### 3) Identificação de clones BAC contendo RGAs

A busca de seqüências RGAs na região *Mex-1* foi feita por PCR e *Southern blot*. Doze combinações de primers degenerados (Ploop 1, 4, 5 ou 6 versus GLPL 1, 3 e 4) descritos por Noir et al. (2001) foram utilizados nas mesmas condições. Estas combinações foram testadas nos DNAs plasmidiais dos clones BAC positivos para os marcadores Exi-2, Exi-3 e Exi-4.

Para facilitar a identificação de BACs contendo RGAs, um clone representativo foi selecionado de cada uma das 9 famílias de RGA de café descritas por Noir et al. (2001) e utilizados como sondas no *Southern blot*. O número dos acessos dos 9 RGAs utilizados como sondas e depositados na EMBL, bem como a família dos RGA a qual cada um pertence foram: AJ298883 (CrgaA1), AJ298885 (ArgaB1), AJ298886 (ArgaC1), AJ298887 (CrgaD1), AJ298888 (CrgaE1), AJ298889 (CrgaF2), AJ298891 (ArgaG1), AJ298893 (CrgaH1) e AJ298895 (ArgaI1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1) Avaliação da biblioteca BAC e identificação de clones positivos

A avaliação da biblioteca BAC utilizando os marcadores moleculares Exi-2, Exi-3 (Fig. 2) e Exi-4, ligados ao gene de resistência *Mex-1*, foi realizada através de hibridização com marcadores do tipo SCAR e amplificação (Noir et al., 2003). Os marcadores AFLP Exi-11 e Exi-13 estão, respectivamente, sobre e a 1,2cM do *locus Mex-1*, no entanto, não foram utilizados por se tratarem de marcadores altamente repetitivos (Tabela 1) quando utilizados como sondas nos filtros BAC de alta densidade. Isto impossibilitou a utilização destas sondas para a clonagem do gene *Mex-1*, mesmo sendo os marcadores mais próximos do *locus* em questão, sendo por essa razão, desconsiderados (dados não apresentados).

Já os marcadores AFLP Exi-1, Exi-5, Exi-7 e Exi-10 não foram utilizados para análise dos filtros BAC de alta densidade por não ter sido possível cloná-los e convertê-

los em marcadores SCAR. O tamanho dos fragmentos e a proximidade das bandas no gel, impossibilitou o isolamento destas marcas e conseqüentemente o prosseguimento da técnica para conversão dos marcadores AFLP em marcadores do tipo SCAR. Por isso, o trabalho foi concentrado nos marcadores AFLP Exi-2 e Exi-3 localizados em um lado do *locus Mex-1* e no marcador Exi-4, situado do outro lado (Fig. 1).

Os dois métodos utilizados para seleção na biblioteca BAC, hibridização e PCR mostraram-se eficientes e principalmente, complementares. A combinação destes dois métodos de seleção para genomas poliplóides, permite a discriminação entre seqüências homólogas e heterólogas.

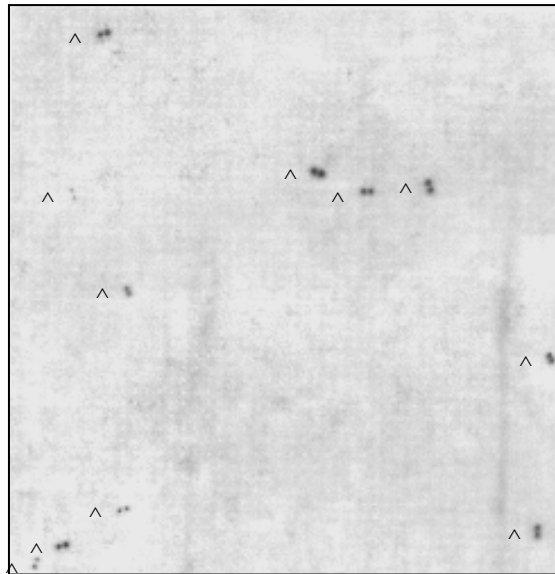
A seleção baseada em PCR, no grupo de DNA das BAC, com os marcadores SCAR Exi-2 e Exi-3, identificaram respectivamente 2 e 6 placas de grupos de DNA das BAC positivas. Nestes casos, os grupos detectados por PCR não foram os mesmos encontrados por hibridização, a qual detectou com os mesmos marcadores, 3 (Exi-2) e 5 (Exi-3) placas, perfazendo um total de clones identificados de 5 e 11, respectivamente (Tabela 1). Uma seleção por PCR permite o isolamento altamente específico de clones até mesmo quando a seqüência do marcador for de natureza repetitiva ou tiver cópias homólogas dispersas, como no caso de famílias gênicas (O'Sullivan et al., 2001).

Quando esta seleção foi feita com o marcador Exi-4, duas placas foram detectadas. Os clones BAC identificados com este marcador foram individualizados e submetidos a uma seleção com o mesmo primer SCAR Exi-4 até que os clones positivos fossem identificados, neste caso apenas dois (Tabela 1). Após diversos passos de seleção, estes dois clones BAC foram reunidos em um único contig. A hibridização com este marcador não obteve nenhum resultado, por isso, o menor número de clones identificados com este marcador se comparado a Exi-2 e Exi-3.

Os filtros de alta densidade foram selecionados com as duas sondas de cópia única, Exi-2 e Exi-3 (Figura 2). Cada clone foi identificado e isolado (Tabela 1). O tamanho dos insertos variou entre 130 e 250 kb (Noir, comunicação pessoal). As duas sondas não detectaram clones comuns.

**Tabela 1.** Clones BAC testados por Hibridização ou seleção baseada em PCR dos grupos de DNA das BAC.

<b>Marcadores</b>	<b>Método de Seleção</b>	<b>Número de clones positivos</b>		<b>Identificação (coordenadas e código do clone BAC)</b>
<b>Exi-2</b>	- Hibridização	3	5	2A(39C8); 2B(135L12); 2C(49B24); 2D(66A19); 2E(54L11)
	- PCR	2		
<b>Exi-3</b>	- Hibridização	5	11	3A(65K19); 3B(137O10); 3C(139G14); 3D(127J15); 3E(49P15); 3F(49P15); 3G(36A15); 3H(70O24); 3I(122F16); 3J(36L24); 3K(51P2)
	- PCR	6		
<b>Exi-4</b>	- PCR	2		4A(41D15); 4B(66P9)
<b>Exi-11</b>	- Hibridização	41		–
<b>Exi-13</b>	- Hibridização	44		–
<b>RG A</b>	- Hibridização	29		1
<b>RG B</b>	- Hibridização	1		4B(66P9)
<b>RG E</b>	- Hibridização	99		2
<b>RG F</b>	- Hibridização	112		2A(39C8); 2B(135L12)



**Figura 2.** Filtros de alta densidade selecionados com a sonda Exi-3. Onze clones positivos foram detectados entre os 27.648 clones duplo-plotados. As setas indicam os clones positivos obtidos com esta sonda.

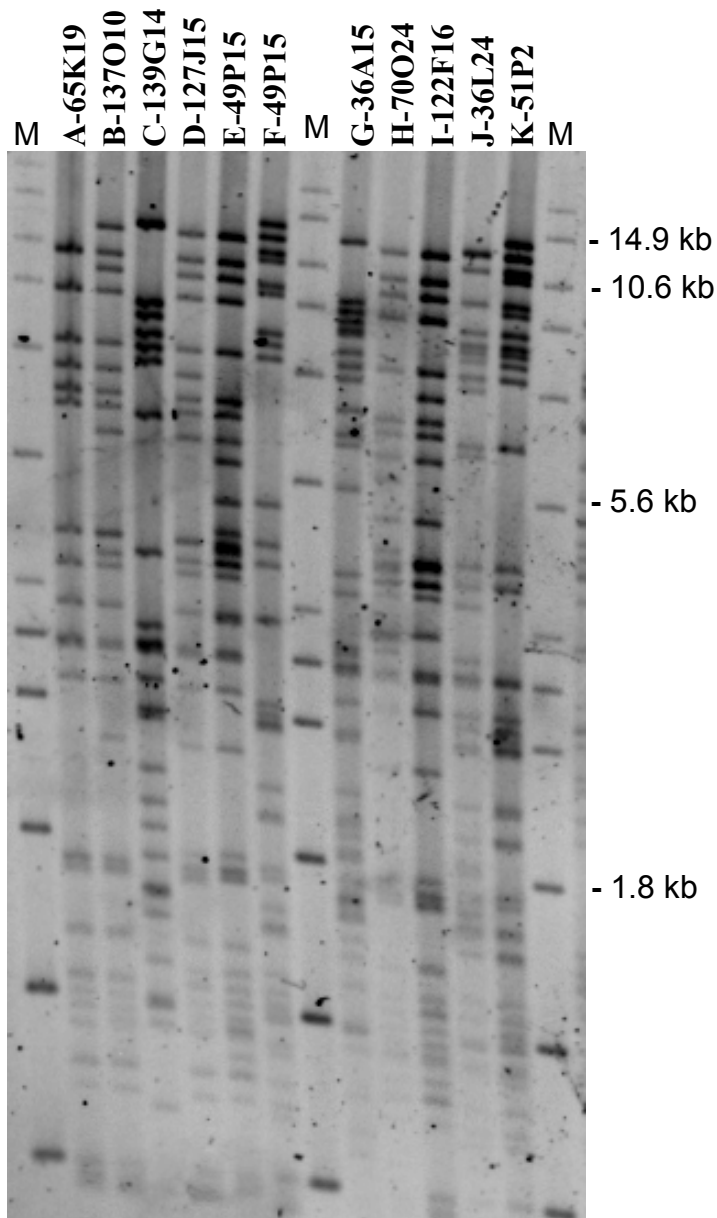
A seleção por hibridização permite a determinação direta das coordenadas dos clones detectados, em condições de estringência padrão. Esta aproximação detecta o clone do alelo de interesse e sua seqüência homóloga sem discriminação. Esta característica é um eficiente modo de isolar os membros de uma família gênica (Wang et al., 2001). Da mesma forma, pela manipulação da estringência da hibridização, este método de seleção permite o uso de sondas heterólogas (O'Sullivan et al., 2001).

## 2) Desenvolvimento dos contigs BAC

A biblioteca BAC de café foi avaliada inicialmente com 3 marcadores ligados a *Mex-1*. Os clones BAC identificados com os marcadores Exi-2, Exi-3 e Exi-4 foram analisados por seus perfis de digestão com a enzima de restrição *HindIII* e seus padrões de bandas foram comparados de forma a verificar se correspondiam a diferentes fragmentos croossômicos. Na figura 3 temos um destes perfis de digestão com o marcador Exi-3. A partir destes marcadores foram identificados 18 clones



positivos. O número de clones positivos em cada caso foi consistente com a cobertura estimada do genoma da fração de clones BAC analisados (aproximadamente 4X) e o fato de ambos os subgenomas serem hibridizados por análises de *Southern*.



**Figura 3.** Gel do perfil de restrição do DNA dos clones BAC hibridizados pelo produto de digestão do marcador Exi-3 com a enzima de restrição *HindIII*. Os clones BAC estão identificados no alto de cada linha. M, marcador de peso molecular.

O DNA destes clones foi analisado por hibridização e amplificação com os marcadores SCAR Exi-2 e Exi-3 e combinações de nove primers das extremidades dos clones BAC, codificadas por 3A-T7, 3B-T7, 3B-SP6, 3G-T7, 3H-T7, 3K-T7, 4A-T7, 4A-SP6 e 4B-T7 foram utilizados. As extremidades de cada clone BAC foram isoladas, clonadas e sequenciadas. Em alguns casos, não foi possível obter a seqüência de ambas as extremidades dos clones, mas apenas um dos lados, seja pelo fato do sequenciamento não ter sido eficiente ou a qualidade das amostras enviadas para sequenciamento não serem satisfatórias, seja pelo fato de nem todos os clones possuírem os sítios de amplificação dos primers universais SP6 e T7, sendo que dessa forma, não seria possível fazer o sequenciamento das extremidades desses clones. Para as extremidades que foram seqüenciadas, um par de primers para estas regiões foi desenhado, a exemplo do clone BAC Exi4A, seqüenciado na extremidade T7. O par de primers para esta região foi Exi4A-T7-1e: 5'-CACTTTGGATTGTCATGAAGGA-3' e Exi4A-T7-1d: 5'-GCGATCTCGGATTCTTCAA-3'.

Os 18 clones positivos associados aos marcadores Exi-2, Exi-3 e Exi-4 foram isolados, tendo o tamanho dos insertos variado entre 130 a 250kb. A análise do perfil de restrição dos clones plasmidiais positivos permitiu a construção de contigs relacionados aos três marcadores. Os clones BAC positivos relativos a estes marcadores foram reunidos em 5 contigs (Figura 4). O primeiro contig aparece composto de dois clones BAC positivos com o marcador Exi-4. O perfil de restrição destes clones mostrou forte similaridade, apresentando também o mesmo perfil RFLP com a sonda 4B-T7.

Dos 5 clones BAC identificados com o marcador SCAR Exi-2, dois contigs designados Exi-2 I e Exi-2 II foram distinguidos. O contig Exi-2 I consistiu dos clones BAC 2B e 2E, enquanto os clones BAC 2A, 2C e 2D formam o contig Exi-2 II. O marcador Exi-2 permitiu, por meio de PCR, a amplificação do DNA das BAC do contig Exi-2 I, enquanto a sonda Exi-2, por meio de hibridização, hibridizou os clones BAC dos dois contigs, revelando dois perfis distintos de RFLP.

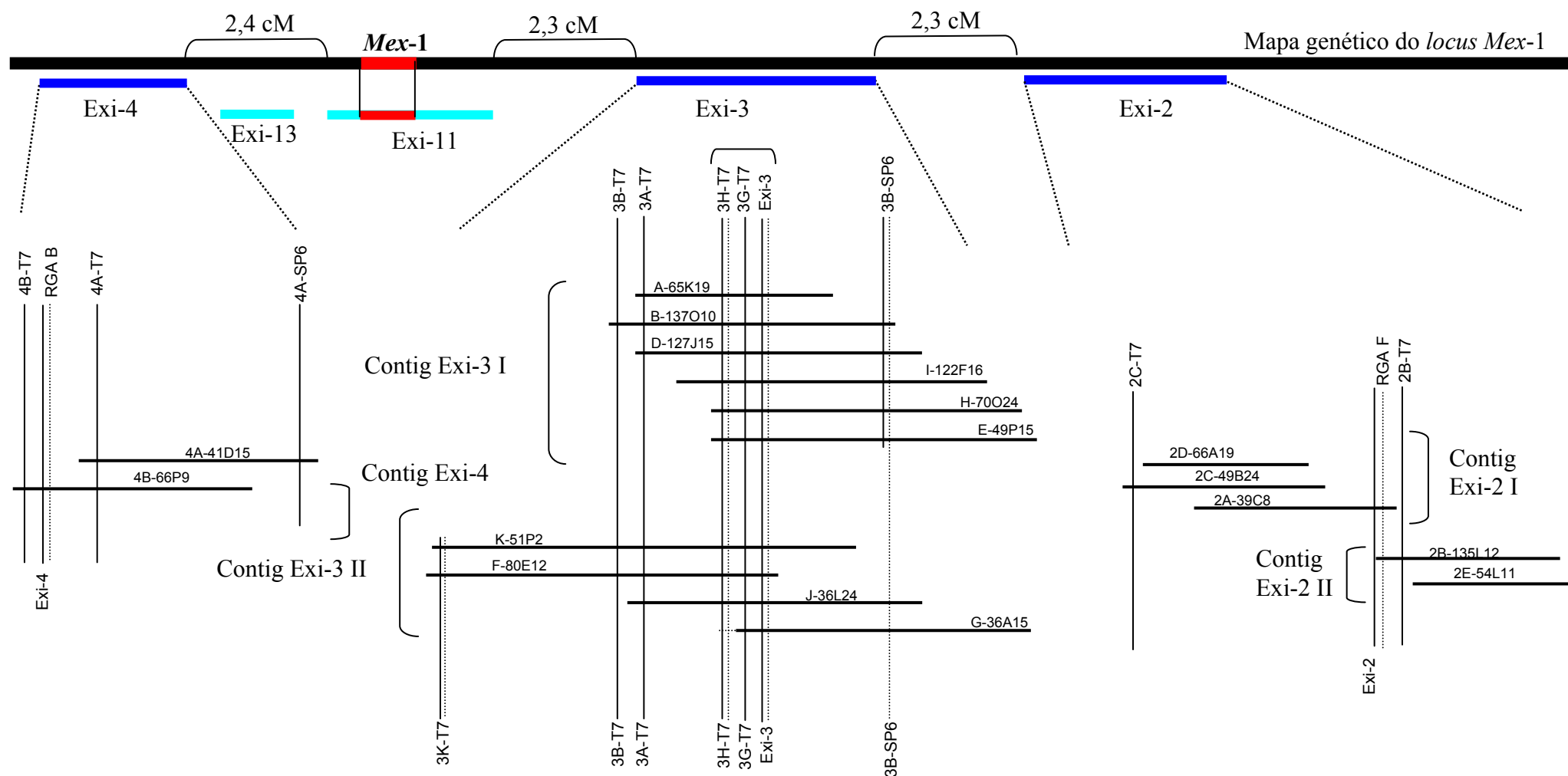
Os clones BAC positivos Exi-3 estão organizados em dois grupos distintos chamados Exi-3 I e Exi-3 II (Fig. 5). No total, nove sítios de restrição ou PCR (Fig. 5), correspondendo a sete marcadores físicos (seqüências identificadas por hibridização ou PCR) foram localizados na região Exi-3. Baseado nos seis marcadores físicos compartilhados, pelos dois grupos, foi observado uma certa

colinearidade entre eles (Fig. 4). Não houve diferença discernível na posição dos marcadores entre os dois grupos Exi-3. Ainda assim, os dois grupos homeólogos mostraram diferença significativa. As 3 sondas estudadas (Exi-2, Exi-3 e Exi-4), revelaram perfis de RFLP distintos entre os grupos, e uma das 6 combinações de primers examinadas amplificaram exclusivamente as BACs pertencentes a Exi-3 I. Tanto por PCR quanto por hibridização, nenhuma ligação (sobreposição) foi detectada entre as 3 regiões cromossômicas correspondendo ao contig Exi-4, aos dois contigs Exi-2 e aos dois contigs Exi-3 (Fig. 4).

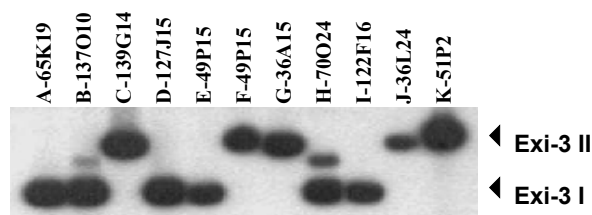
Após diversas análises, os clones Exi-2 e Exi-3 detectados por hibridização aparecem distribuídos em duas regiões cromossômicas homólogas. Os clones BAC Exi-2 e Exi-3 foram, respectivamente, separados em 2 contigs homeólogos. Isto é consistente com a estrutura alotetraplóide da espécie *C. arabica*. Cada contig homeólogo estaria contido em um dos 2 subgenomas de *C. arabica*. Além disso, a distinção de apenas 2 contigs homeólogos sugere que o fragmento introgridido levando *Mex-1* é o resultado de uma recombinação homóloga entre os genomas de *C. canephora* e um dos dois subgenomas de *C. arabica*.

### 3) Identificação de clones BAC contendo RGAs

A presença dentro da região *Mex-1* de clones BAC contendo RGAs foi investigada. Os 18 clones BAC identificados com os marcadores Exi foram avaliados por amplificação com 12 combinações de primers degenerados (Tabela 2) conhecidos por amplificar seqüências de RGAs (Tabela 1). O clone 3C(139G14) foi descartado, pois não foi possível o sequenciamento de suas extremidades nem a repetição dos resultados obtidos. O clone BAC detectado por hibridização pela sonda RGA A não foi utilizada, pois apresentou muitas seqüências repetitivas. Muitos dos clones obtidos através da sonda RGA E foram equivalentes a outros clones obtidos através da sonda RGA F. Estes dois clones obtidos com a família F dos RGAs foram equivalentes aos clones 2A(39C8) e 2B(135L12), os quais também foram selecionados com o marcador SCAR Exi-2.



**Figura 4.** Organização dos 5 contigs encontrados para o gene *Mex-1*. Colineariedade entre os dois contigs homeólogos Exi-3. Os clones BAC foram agrupados em ‘contigs’ baseado no perfil de restrição do DNA das BACs e estão indicadas pelas linhas horizontais grossas, com seus respectivos códigos. Sítios de PCR das extremidades BAC e primers Exi-2, Exi-3 e Exi-4 estão indicados por linhas verticais contínuas, enquanto marcadores do tipo RFLP estão indicados por linhas verticais pontilhadas. A marcação dos 3 marcadores centrais por um colchete foi feita pela impossibilidade de determinar a ordem correta destes marcadores entre si. Estão aqui representados também os contigs Exi-2 e Exi-4.



**Figura 5.** Distribuição dos clones BAC Exi-3 positivos em dois grupos, chamados de Exi-3 I e Exi-3 II. O DNA dos clones BAC positivos foram digeridos com *Hind*III e hibridizados com a sonda SCAR Exi-3.

A investigação de seqüências RGA do tipo NBS foi feita em clones BAC da região *Mex*-1. Estes clones contendo seqüências RGA foram detectados nas 3 regiões cromossômicas, Exi-2, Exi-3 e Exi-4. Pelo menos 3 famílias de RGAs distintas foram identificadas entre clones constitutivos da região de resistência *Mex*-1, sugerindo que esta região contenha grupos análogos de genes de resistência a doenças, e que o gene *Mex*-1 pode ser um gene R do tipo NBS. No genoma vegetal, agrupamentos complexos de resistência apresentando seqüências RGA distintos têm sido apresentados (Richly et al., 2002).

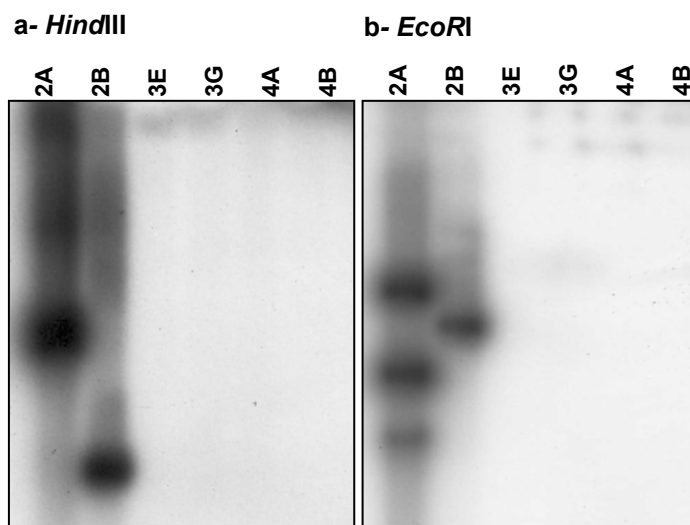
Agrupamentos de genes de resistência têm sido postulados por terem surgido a partir de eventos de recombinação-duplicação e rearranjo, para produzir nova especificidade para diferentes patógenos (Hulbert et al., 2001). Neste contexto, a presença de genes de resistência a doenças na região *Mex*-1 poderia prover adicional conhecimento na organização e evolução dos genes de resistência no genoma do café.

Três combinações de primers permitiram a amplificação de produtos com um tamanho esperado, este produto foi clonado e sequenciado. Além disso, o DNA digerido dos clones positivos foi hibridizado com uma das nove famílias de RGAs de café que já haviam sido previamente identificadas (Noir et al., 2001). Das sete sondas RGA utilizadas, nenhuma hibridizou com os clones BAC identificados com os marcadores Exi. Ao contrário, a sonda RGA F, hibridizou com os clones BAC 2A(39C8) e 2B(135L12) (Fig. 6), e a sonda RGA da família B, com o clone BAC 4B (66P9) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados de hibridização e amplificação de clones BAC contendo os marcadores Exi 2, 3 e 4 e seqüências RGA, utilizando primers degenerados e sondas de duas família RGA de café.

<b>Identificação por Amplificação (PCR) com primers degenerados</b>	<b>Clones BAC associados a <i>Mex-1</i> apresentando seqüências RGA</b>
<b>Ploop-4 / GLPL-3</b> GGNGGNRTNGGNAARACTAC / CAANGCCAANGGCAANCC	2C(49B24)
<b>Ploop-4 / GLPL-4</b> GGNGGNRTNGGNAARACTAC / CAGNGCNAGNGGNAGNCC	3B(137O10); 3D(127J15); 3F(49P15); 3J(36L24)
<b>Ploop-5 / GLPL-1</b> GGNGGNRTNGGNAARACCAC / IARIGCIARIGGIARNCC	2B(135L12); 3A(65K19); 3B(137O10)
<b>Identificação por Hibridização com sondas das famílias RGA</b>	<b>Clones BAC associados a <i>Mex-1</i> apresentando seqüências RGA</b>
<b>RGA B</b>	4B(66P9)
<b>RGA F</b>	2A(39C8); 2B(135L12)

Por estas aproximações, as seqüências RGA foram detectadas dentro das 3 regiões cromossômicas relacionadas aos marcadores Exi-2, Exi-3 e Exi-4, respectivamente. Os RGAs presentes na região de resistência *Mex-1* pertencem a pelo menos duas famílias RGA distintas.



**Figura 6.** Clones BAC que constituem a região *Mex-1*. O DNA das BACs foi digerido com *Hind*III (a) e *Eco*RI (b) e hibridizados com uma sonda RGA, de café, da família F. Em cima da figura os códigos dos clones utilizados, dois para cada marcador Exi-2, Exi-3 e Exi-4 utilizado.

Considerando que genes de resistência tendem a se agrupar, um contig BAC que contenha um gene R poderia também conter outros genes (Martin et al., 1994). A utilização de domínios conservados para a procura por prováveis genes de resistência (Leister et al., 1996; Deng et al., 2001; Yu et al., 2000) associado a bibliotecas BAC, provém uma importante ferramenta para o isolamento de genes candidatos de resistência a doenças em plantas (Danesh et al., 1998).

A identificação de genes que confirmam resistência a doenças bem como a introdução destes genes em outras plantas será um importante recurso para criar novas formas de resistência em plantas (Urwin et al., 2002; Williamson e Gleason, 2003). O sucesso da clonagem posicional de genes em diversas plantas demonstra que esta estratégia pode ser eficiente com genes de resistência. Progresso tem sido alcançado em espécies de plantas com genomas pequenos (Bent et al., 1994; Grant et al., 1995; Song et al., 1995). Como o genoma de *C. arabica* é em torno de 1300MB, poderemos em breve

obter sucesso e conseguir isolar o gene de interesse. Este estudo é o primeiro exemplo de grupos análogos de genes de resistência no genoma do cafeeiro.

A biblioteca BAC de *C. arabica* utilizada representa a primeira biblioteca de grandes insertos de DNA para o gênero *Coffea*. Ela contém grandes insertos (130kb em média), tem cobertura do genoma suficiente (8X) e contém apenas uma pequena fração de clones com DNA mitocondrial e de cloroplasto. Estes dados indicam que a biblioteca BAC é satisfatória para muitas aplicações na pesquisa genômica, incluindo mapeamento, clonagem baseada em mapa e genômica funcional e comparativa.

## CONCLUSÕES

As seqüências tipo NBS clonadas serão úteis na busca dos genes completos de *C. canephora* que possam ser testados para a conferência de resistência aos nematóides em plantas modelo, com a finalidade futura de desenvolver genótipo elite de *C. arabica* resistentes a *M. exigua*. Associado a uma aproximação do uso de domínios conservados para procurar prováveis genes de resistência, as bibliotecas BAC conferem uma valiosa ferramenta para o isolamento do gene candidato de resistência em plantas.

Um mapa físico detalhado do *locus Mex-1* foi obtido. Este mapa físico obtido poderá auxiliar na clonagem do gene *Mex-1*. A integração entre os mapas físico e genético permitirá uma maior e melhor compreensão do genoma do cafeeiro, abrindo portas para um melhor uso destas informações obtidas para o melhoramento desta cultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anthony, F., Combes, M-C., Astorga, C., Bertrand, B., Graziosi, G. e Lashermes, P. 2002. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 894-900.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R.L., Giraudat, J., Leung, J.L. e Staskawicz, B.J. 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, 265: 1856-1859.



- Bertrand, B., Aguilar, G., Santacreo, R. e Anzueto, F. 1999. El mejoramiento genético en América Central. In: Bertrand, B. e Rapidel, B. (eds). Desafios de la caficultura centroamericana., IICA-CIRAD, San José, Costa Rica, p.405-456.
- Bettencourt, A. 1973. Considerações gerais sobre o Híbrido de Timor, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, Brasil, p. 256.
- Carvalho A. 1988. Principles and practices of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: Coffee vol. 4: Agronomy, (Clarke R. J. e Macrae R., eds), London, p.129-165.
- Cramer, P.J.S. 1957. A review of literature of coffee research in Indonesia from about 1602 to 1945. Turrialba, Costa Rica: Interamerican Institute of Agriculture Sciences, p.262.
- Danesh, D., Peñuela, S., Mudge, J., Denny, R.L., Nordstrom, H., Martinez, J.P. e Young, N.D. 1996. A bacterial artificial chromosome library for soybean and identification of clones near a major cyst nematode resistance gene. Theor. Appl. Genet., 96: 196-202.
- Deng, Z., Tao, Q., Chang, Y.L., Huang, S., Ling, P., Yu, C., Chen, C., Gmitter Jr., F.G. e 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.
- Etienne, H., Anthony, F., Dussert, S., Fernandez, D., Lashermes, P. e Bertrand, B. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica*). *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 38: 129-138.
- Fernandez, D. e Lashermes, P. 2002. Molecular tools for improving coffee (*Coffea arabica* L.) resistance to parasites. In: Mohan Jain, S., Brar, D.S. e Ahloowalia, B.S. (eds.). Molecular techniques in crop improvement. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p. 327-346.
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W. e Dangl, J.L. 1995. Structure of the Arabidopsis *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. Science, 269: 843-846.
- Hammond-Kosack, K.E. e Jones, J.D.G. 1997. Plant disease resistance genes. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48: 575-607.
- Hulbert, S., Webb, C.A., Smith, S.M. e Sun, Q. 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. Ann. Rev. Phytopathol., 39: 285-312.

- Kanazin, V., Marek, L.F. e Shoemaker, R.C. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11746-11750.
- Lashermes, P., Paczek, V., Trouslot, P., Combes, M-C., Couturon, E. e Charrier, A. 2000. Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C arabica x C. canephora*. *J. Heredity*, 91: 81-85.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F. e Gebhardt, C. 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with a potential for wide application in plants. *Nature Genet.*, 14: 421-428.
- Liu, H., Sachidanandam, R. e Stein, L. 2001. Comparative genomics between rice and *Arabidopsis* shows scant collinearity in gene order. *Genome Res.*, 11: 2020-2026.
- Maluf, M.P., Guerreiro Filho, O. e Fazuoli, L.C. 2001. Biotecnologia: aporte tecnológico ao Melhoramento do cafeeiro no IAC. *O Agrônomo*, 53(2): 5-7.
- Martin, G.B., Frary, A., Wu, T., Brommonschenkel, S., Chunwongse, J., Earle, E.D. e Tanksley, S.D. 1994. A member of the tomato *Pto* gene family confers sensitivity to fenthion resulting in rapid cell death. *Plant Cell*, 6: 1543-52.
- Matiello, J.B., Almeida, S.R. e Carneiro Filho, F. 1998. Novo cultivar resistente ao nematóide *Meloidogyne incognita*, à ferrugem do cafeeiro e com boa produtividade. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 24, Poços de Caldas, MG. Resumos... Rio de Janeiro, IBC/GERCA, p.2-3.
- Megaprime™ DNA labeling systems. RPN 1604/5/6/7. Amersham Biosciences, 47 p., 1997.
- Meyers, B.C., Chin, D.B., Shen, K.A., Sivaramakrishnan, S., Lavelle, D.O., Zhang, Z. e Michelmore, R.W. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell*, 10: 1817-1832.
- Noir, S., Anthony, F., Bertrand, B., Combes, M-C. e Lashermes, P. 2003. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathol.*, 52: 97-103.
- Noir, S., Combes, M-C., Anthony, F. e Lashermes, P. 2001. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). *Mol. Genet. Genomics*, 265: 654-662.

- O'Sullivan, D.M., Ripoll, P.J., Rodgers, M. e Edwards, K.J. 2001. A maize bacterial artificial chromosome (BAC) library from the European flint inbred line F2. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 425-432.
- Randig, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R.M.D.G., Sarah, J.-L. e Castagnone-Sereno, P. 2002. A species-specific satellite DNA family in the genome of the coffee root-knot nematode *Meloidogyne exigua*: application to molecular diagnostics of the parasite. *Molecular Plant Pathology*, 3(6): 431-437.
- Richly, E., Kurth, J. e Leister, D. 2002. Mode of amplification and reorganisation of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 76-84.
- Richter, T.E. e Ronald, P.C. 2000. The evolution of disease resistance genes. *Plant. Mol. Biol.*, 42: 195-204.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New-York.
- Sera, T. 2001. Coffee genetic breeding at IAPAR. *Crop Breed. Appl. Biotech.*, 1: 179-199.
- Sera, T., Alteia, M.Z. e Petek, M.R. 2002. Melhoramento do Cafeeiro: Variedades Melhoradas no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). In: Zambolim, L. (ed.). *O Estado da arte de tecnologias na produção de café*. Cap. 6, p.217-251.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C. e Ronald, P.C. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 270: 1804-1806.
- Sreenivasan, M.S., Ram, A.S. e Prakash, N.S. 1993. Tetraploid interespecific hybrids in coffee breeding in India. *Proceedings of 15<sup>th</sup> Colloquium of International Coffee Science Association*, Montpellier, França. ASIC: Paris: 226-233.
- TOPO TA Cloning Kit for Sequencing. Version K (cat. n° 4506-41). Invitrogen, 35p., 2003.
- Urwin, P.E., Lilley, C.J. e Atkinson, H.J. 2002. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 15: 747-752.
- Wang, Q., Zhang, K., Qu, X., Jia, J., Shi, J., Jin, D. e Wang, B. 2001. Construction and characterisation of a bacterial artificial chromosome library of peach. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 1174-1179.

- Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System. Promega, Technical Bulletin n°225, 12p., 2002.
- Williamson, V.M. e Gleason, C.A. 2003. Plant–nematode interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 1-7.
- Yu, Y.G., Buss, G.R. e Saghai Maroof, M.A. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11751-11756.
- Yu, Y., Tomkins, J.P., Waugh, R., Frisch, D.A., Kudrna, D., Kleinhofs, A., Brueggeman, R.S., Muehlbauer, G.J., Wise, R.P. e Wing, R.A. 2000. A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 1093-1099.
- Zhu, H., Cannon, S.B., Young, N.D. e Cook, D.R. 2002. Phylogeny and Genomic Organization of the TIR and Non-TIR NBS-LRR Resistance Gene Family in *Medicago truncatula*. *MPMI*, 15(6): 526-539.

## Capítulo 2

### **Análise da presença do *locus Mex-1* que confere resistência ao nematóide *Meloidogyne exigua* em cultivares Icatu coletados em Viçosa e Patrocínio, MG, utilizando marcadores AFLP**

#### **RESUMO**

Para confirmar a introgressão do gene *Mex-1*, vinte e uma linhagens de Icatu foram comparadas a três testemunhas resistentes, “Iapar 59”, “Híbrido de Timor” e “Sarchimor” e a uma testemunha susceptível, “Catuaí”, por meio de marcadores AFLP, avaliando a presença ou não do fragmento introgridido associado ao *locus Mex-1*. Nove marcadores AFLP foram amplificados. Destes, os marcadores Exi-1, Exi-2, Exi-3, Exi-11 e Exi-13 confirmaram a presença do fragmento associado à resistência a *M. exigua*, mostrando que esta marca pode ser utilizada em programas de seleção assistida. Os marcadores Exi-4, Exi-5, Exi-7 e Exi-10 não seguiram os padrões de amplificação para a presença das marcas associadas a *Mex-1*, e foram desconsideradas.

#### **INTRODUÇÃO**

Os nematóides associados ao cafeeiro compreendem um grupo numeroso de espécies, destacando-se as do gênero *Meloidogyne*, as quais são responsáveis pelos maiores danos à cafeicultura brasileira (Gonçalves *et al.*, 1998). Das 14 espécies de *Meloidogyne* que parasitam o cafeeiro (*Coffea arábica* L.) nas diversas regiões produtoras de café do mundo, seis ocorrem no Brasil. Santos e Triantaphyllou (1992) relatam que podem ocorrer ainda em nossos cafezais pelo menos três espécies de *Meloidogyne* não descritas.

Algumas espécies do gênero *Meloidogyne* causam sintomas característicos como engrossamento em certas regiões das raízes com formação típica de galhas. Os sintomas na parte aérea das plantas atacadas por *Meloidogyne* spp. são de decadência da planta, incluindo clorose, queda prematura de folha, deficiência

nutricional, podendo levar a planta à morte em situações de estresse, como seca prolongada e frio (Campos e Lima, 1986).

Das espécies deste gênero que atacam o cafeeiro no Brasil, *M. exigua* é, indubitavelmente, a de maior disseminação nos cafezais brasileiros (Campos e Lima, 1986), atacando os cafezais dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Ceará. Os efeitos sobre o sistema radicular são facilmente avaliados, porém os prejuízos causados na produção não vêm sendo estimados adequadamente. *M. exigua* foi a primeira espécie de nematóide constatada e descrita no Brasil (Gonçalves e Silvarolla, 2001).

Estudos anteriores mostraram que a resistência a *M. exigua* é controlada por um gene de herança simples, designado *Mex-1*, presente na espécie *C. canephora*. Quatorze marcadores AFLP foram encontrados associados com a resistência a *M. exigua* e um mapa genético posicionando o *locus Mex-1* foi construído (Noir *et al.*, 2003). Linhagens de café arábica que apresentam resistência têm sido desenvolvidas em programas de melhoramento por meio da introgressão deste gene. O estudo da forma de introgressão do gene *Mex-1* de *C. canephora* em *C. arabica*, pode dar a oportunidade do melhor entendimento da genética da resistência.

O uso de cultivares resistentes é uma das melhores opções, visto ser ecologicamente mais correto e mais barato para o combate aos nematóides. Ao contrário do que se verifica em *C. arabica*, fontes de resistência aos nematóides do gênero *Meloidogyne* estão presentes em outras espécies de café. Os cruzamentos entre *C. arabica* e *C. canephora* como Icatu, Sarchimor, Catimor e outras vêm sendo intensivamente estudadas em relação ao agente causador da ferrugem (*Hemileia vastatrix*), em vista de muitas plantas serem resistentes ao fungo. Têm-se verificado que essas populações apresentam também plantas resistentes a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, porém segregantes para essa característica. Algumas plantas do Híbrido de Timor e Catimor são homozigotas para resistência a *M. exigua* e apresentam boas características agronômicas (Gonçalves *et al.*, 1998). Icatu foi obtido a partir de uma hibridação interespecífica entre *C. canephora*, duplicada artificialmente, e a variedade Bourbon Vermelho de *C. arabica*. A F<sub>1</sub> foi retrocruzada três vezes com Mundo Novo e analisada para a resistência (Fazuoli *et al.*, 2002).

A partir dos marcadores AFLP descritos por Noir et al. (2003), foi feita a tentativa de encontrar o marcador ligado à resistência a *M. exigua* (*Mex-1*) para auxiliar no melhoramento, podendo este marcador ser utilizado na seleção assistida. O objetivo deste trabalho foi de avaliar através de marcadores AFLP e primers específicos a presença do fragmento introgrado que leva o *locus Mex-1*, o qual confere resistência a *M. exigua*, em diferentes linhagens de *Coffea arabica* L. variedade Icatu a fim de utilização desta variedade em programas de melhoramento de plantas e permitir o uso destes marcadores como marcas específicas para a presença deste *locus* durante a seleção assistida.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Vinte e uma linhagens de Icatu foram selecionadas e coletadas em Viçosa e Patrocínio, MG, no intuito de verificar a presença do marcador associado à resistência. Quatro testemunhas, três resistentes, Iapar 59, Sarchimor e Híbrido de Timor, todas conhecidas por sua resistência completa a *M. exigua* e uma variedade susceptível, Catuaí, foram selecionadas. A extração do DNA e a amplificação utilizando os marcadores AFLP (9 combinações de primers) e PCR, com 1 par de primers ‘específicos’ do marcador Exi-2 foram utilizados para este trabalho.

**Tabela 1.** Lista dos materiais utilizados para a avaliação de resistência.

<b>Número</b>	<b>Cultivar</b>
Testemunha 1	Iapar 59
Testemunha 2	Catuaí CH 2077-2-5-44
Testemunha 3	Híbrido de Timor 832/2
Testemunha 4	Sarchimor
1	Icatu 2901 VEP 273
2	Icatu M 4782-13-79-9 EP 209
3	Icatu H 4782-13-167-5 EP 209
4	Icatu H 4782-7-785-11 EP 182
5	Icatu 294 AEP 273
6	Icatu 2899 AEP 273
7	Icatu H 4782-10-198 EP 268
8	Icatu H 4782-7-585 EP 209
9	Icatu H 4782-10-397-8 EP 268
10	Icatu H 4782-10-299 EP 182
11	Icatu vermelho 4040-179
12	Icatu vermelho 4040-181
13	Icatu vermelho 4040-315
14	Icatu vermelho 4042-222
15	Icatu vermelho 4042-114
16	Icatu vermelho 4045-47
17	Icatu vermelho 4288-101
18	Icatu vermelho 2942
19	Icatu amarelo 2944
20	Icatu amarelo 3282
21	Icatu vermelho 4782



## 1. EXTRAÇÃO DE DNA

A decisão de utilizar folhas liofilizadas foi tomada pela facilidade de armazenamento das mesmas para estudos futuros, mas para isso, um protocolo específico para extração de DNA a partir de folhas liofilizadas foi desenvolvido, mostrando-se muito eficiente.

### Preparo dos tampões de extração

Duas soluções tampões foram preparadas. Para a primeira, chamada A, foram utilizados 0,35M de Sorbitol, 0,20M de Tris-HCl, 40mM de EDTA e 2% de PVP. Para o tampão B foram empregados 1,5M de NaCl, 2% de MATAB, 3% de Sarcosil, 1% de Bissulfito de Sódio, 0,2M de Tris-HCl e 40mM de EDTA. Como o tampão B é viscoso, ele deve ser mantido sob agitação constante e leve aquecimento durante o preparo. O tampão foi preparado na véspera e deixado em repouso na geladeira. Antes do início da extração, o tampão foi retirado com 30 minutos de antecedência e colocado a 65°C até o momento do uso. Os dois tampões foram misturados no momento do uso e em seguida acrescentar o PVP (2%).

### Extração do DNA

Cerca de 50mg de folhas liofilizadas foram maceradas dentro de um tubo eppendorf de 1,5mL. Após esta maceração foi acrescentado 400µL de cada tampão, agitando os tubos em seguida por 1 minuto. Estes tubos foram deixados por 30 minutos em banho-maria a 62°C, sendo adicionado após este tempo, 1mL de CIA (Clorofórmio:Isoamil 24:1). Todos os tubos foram agitados e deixados à temperatura ambiente por 40 minutos e centrifugados a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e a ele adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado, permanecendo a -20°C por 1 hora.

Após este tempo, os tubos foram centrifugados a velocidade máxima por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70%. Esta etapa foi repetida duas vezes e após secos foram submetidos a tratamento com RNase. Após esta última etapa, o DNA das amostras foi purificado. Ao DNA precipitado foi adicionado 100µL de TE, 100µL de água, 100µL de NaCl 5M e 100µL de EDTA 0,5M. Após homogeneizado e 30 minutos de repouso, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a velocidade máxima. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e a este acrescentado isopropanol gelado. As etapas posteriores foram

as mesmas previamente descritas, sendo que após seco, o pellet foi diluído em 40 $\mu$ L de TE. A qualidade e quantidade do DNA foram testadas em gel de agarose 1%.

## 2. AFLP

O mapa proposto por Noir et al. (2003) foi tomado como base para a seleção dos marcadores utilizados neste trabalho. Os marcadores Exi-1, Exi-2, Exi-3, Exi-4, Exi-5, Exi-7, Exi-10, Exi-11 e Exi-13 foram selecionados. A combinação de cada primer, bem como o tamanho dos fragmentos estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Relação dos primers utilizados com a respectiva combinação de cada um dos primers Eco e Mse utilizados na etapa de amplificação.

<b>Nome da combinação</b>	<b>Combinação de Primers Eco/Mse</b>	<b>Tamanho do fragmento esperado (pb)</b>
Exi-1	E-AGC/ M-CAA	201
Exi-2	E-AGG/ M-CTT	141
Exi-3	E-CAT/ M-CTT	109
Exi-4	E-CAT/ M-AAC	124
Exi-5	E-ACG/ M-ACC	247
Exi-7	E-AGC/ M-ACA	77
Exi-10	E-ACT/ M-AAC	110
Exi-11	E-CAC/ M-CTA	194
Exi-13	E-CAC/ M-CAT	114

O Kit para AFLP da Gibco foi utilizado conforme as instruções do fabricante com algumas modificações devido à combinação de primers utilizados não presentes no kit. Após a amplificação, foi adicionado a cada tubo de reação, 8 $\mu$ l de azul de formamida (98% de formamida, 10mM EDTA, azul de bromofenol e xileno cianol). Estas amostras foram desnaturadas por 3 minutos a 95°C e colocadas em gelo, para evitar a renaturação do DNA amplificado. Foi aplicada 6 $\mu$ l de cada reação no gel de

poliacrilamida 6% e 4µl de marcador (10pb ou 100pb). Antes de aplicar as amostras, uma pré-eletroforese foi feita por 30 minutos à 120W. Após a aplicação das amostras, as mesmas foram submetidas à eletroforese por cerca de 2 horas a 70W. Ao término da eletroforese, um kit de coloração com Nitrato de prata da Gibco foi utilizado para corar o gel de poliacrilamida, segundo as instruções do fabricante.

### 3. Reação de PCR específica para o marcador SCAR Exi-2

Um dos marcadores utilizados para amplificar, via AFLP, os marcadores para a presença do *locus Mex-1*, foi isolado, purificado, sequenciado e transformado em marcador SCAR. Este marcador SCAR, de 20 bases, está associado ao *locus Mex-1*. As seqüência dos primers SCAR foram cedidas pelo Dr. Philippe Lashermes (IRD, França). O ciclo utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 38 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C e 30 segundos a 72°C, terminando com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Depois de amplificado, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X e corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo utilizado para extração de DNA a partir de folhas liofilizadas foi especificamente desenvolvido para este trabalho, tendo sido testado também em outras culturas além de folhas de café, mostrando-se como um protocolo útil, confiável e de ótimo rendimento.

As condições utilizadas para amplificação dos primers neste trabalho foram as mesmas propostas por Noir et al (2003) com algumas modificações. A forma de coloração empregada foi diferente, visto que foi utilizado nitrato de prata neste trabalho ao invés de marcação radioativa com P<sup>33</sup>.

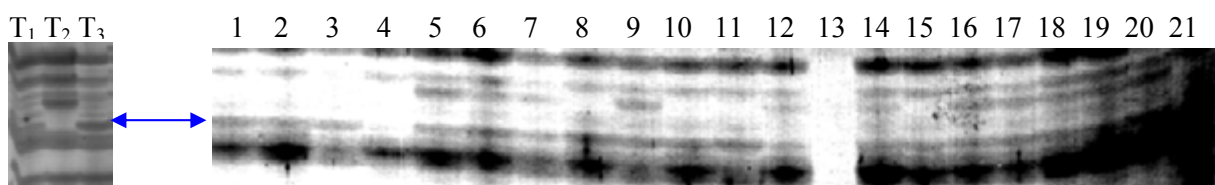
Das nove combinações de *primers* utilizadas, quatro (Exi-4, Exi-5, Exi-7 e Exi-10) não seguiram o padrão de amplificação para a presença do *locus Mex-1*. As demais combinações, Exi-1, Exi-2, Exi-3, Exi-11 e Exi-13, detectaram a presença do fragmento introgrado o qual está associado à resistência a *M. exigua*.

Os cinco marcadores (Exi) utilizados através da técnica de AFLP detectaram a banda associada à resistência (testemunhas resistentes) e para os 'Icatus' analisados. A

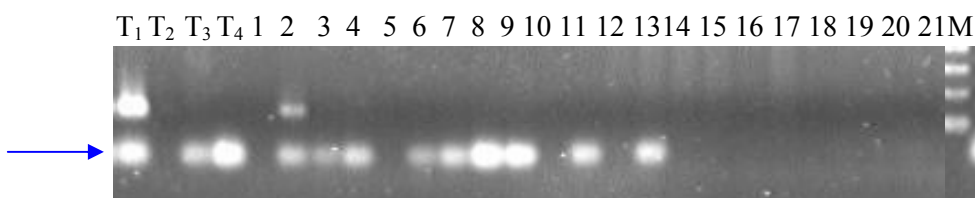
ausência para a cultivar Catuaí pode ser explicado pelo fato desses marcadores amplificarem regiões do fragmento introgridido de *C. canephora*, não levando obrigatoriamente o alelo dominante do *locus Mex-1*. O que não quer dizer que obrigatoriamente, os ‘Icatu’ analisados sejam resistentes em testes de campo.

Segundo Noir et al. (2003), os marcadores AFLP associados à *Mex-1*, exceto Exi-10, foram detectados também em acessos de *C. canephora* mas não em outros cultivares de *C. arabica*, confirmando a origem da introgressão do gene de resistência a *M. exigua* oriundo de *C. canephora* em *C. arabica*. Assim, nem todas as plantas que apresentarem esta introgressão, serão resistentes a *M. exigua*, mostrando que o fragmento introgridido pode não ser completo. Dessa forma, se este fragmento for menor do que o necessário, ele pode não “trazer” o alelo associado à resistência.

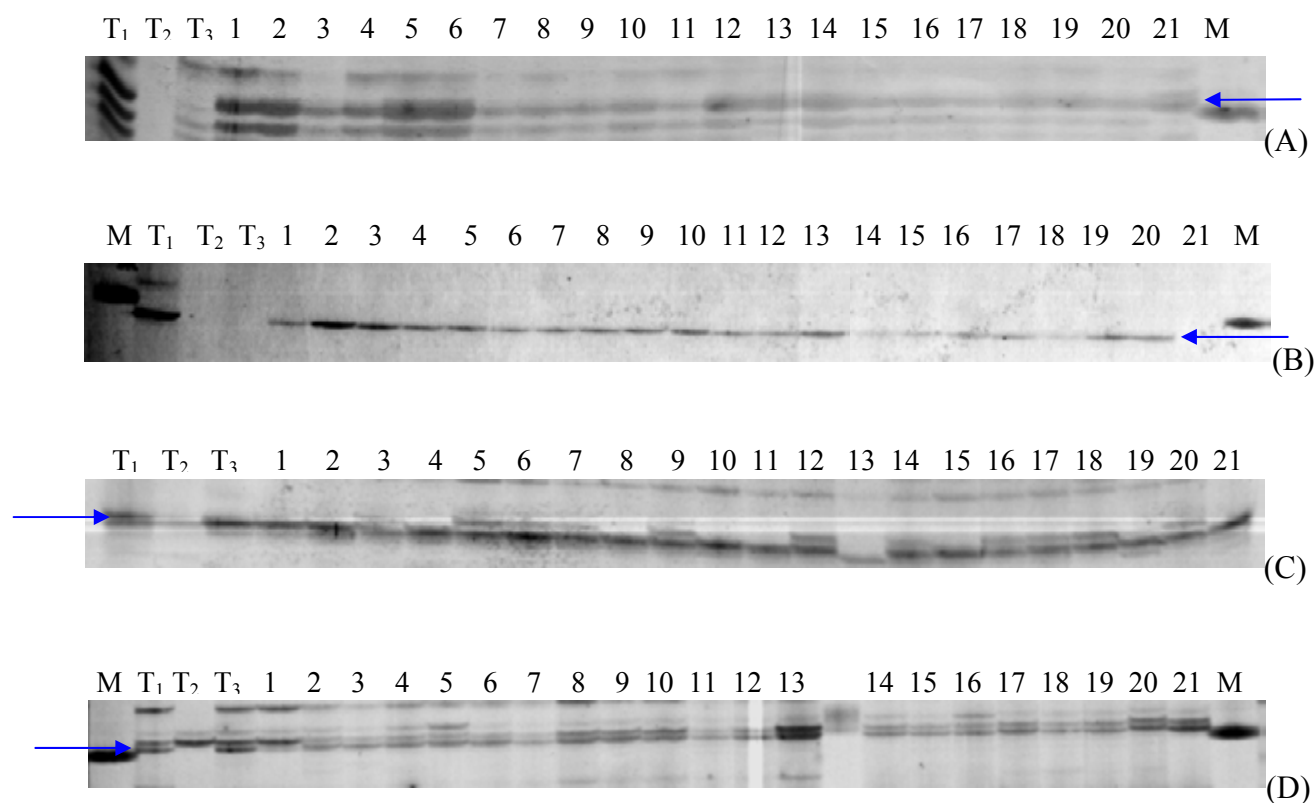
Conforme Noir et al. (2003), o marcador Exi-2 está distante cerca de 4,6cM do *locus Mex-1*. Utilizando-se o marcador AFLP Exi-2 (Figura 1), a presença do fragmento introgridido foi confirmada.



**Figura 1.** Gel de agarose com o marcador AFLP Exi-2 (banda de 141pb). A seta indica a presença do fragmento introgridido que leva o *locus Mex-1*. T<sub>1</sub>: Iapar 59, T<sub>2</sub>: Catuaí e T<sub>3</sub>: Híbrido de Timor. 1 a 21: linhagens de Icatu.



**Figura 2.** Gel de agarose com o marcador SCAR Exi-2 (banda de 141pb). A seta indica a presença do fragmento associado ao *locus Mex-1*. T<sub>1</sub>: Iapar 59, T<sub>2</sub>: Catuaí, T<sub>3</sub>: Híbrido de Timor e T<sub>4</sub>: Sarchimor. 1 a 21: linhagens de Icatu, M: marcador de peso molecular.



**Figura 3.** Gel de agarose com os marcadores AFLP (A) Exi-3 (banda de 109pb), (B) Exi-11 (banda de 194pb), (C) Exi-13 (banda de 114pb) e (D) Exi-1 (banda de 201pb). A seta indica a presença do fragmento introgrado associado ao *locus Mex-1*. M: Marcador de peso molecular. T<sub>1</sub>: Iapar 59, T<sub>2</sub>: Catuaí e T<sub>3</sub>: Híbrido de Timor. 1 a 21: linhagens de Icatu.

O marcador AFLP Exi-2 foi isolado do gel e convertido em marcador SCAR Exi-2. Este marcador SCAR amplifica o fragmento associado à resistência. No entanto, neste trabalho não foi possível obter o mesmo perfil de amplificação (Fig. 2) do marcador AFLP Exi-2, visto que este fragmento não foi encontrado em todos os materiais analisados. Este fragmento pode ser visto em 9 dos 21 acessos analisados. Apesar de não encontrado em todos os ‘Icatu’ analisados, este fragmento está presente em todas as testemunhas resistentes analisadas. Desta forma, não foi possível afirmar se o material analisado apresenta a introgressão que leva o *locus Mex-1*, visto que por meio de AFLP verificou-se a presença desta banda em todos os materiais.

O marcador AFLP Exi-3 amplifica um fragmento de 109pb e está distante 2,3cM do *locus* analisado. Através de AFLP foi detectada a associação deste marcador ao *locus Mex-1* (Fig. 3a). Quando este marcador AFLP foi utilizado como sonda para analisar os filtros de alta densidade de uma biblioteca BAC de café (dados não mostrados), este marcador também se mostrou associado a *Mex-1*. Ele não se comportou como um marcador repetitivo, o que torna possível sua utilização. Entretanto, não foi possível converter este marcador AFLP em marcador SCAR, tal como foi feito para o marcador AFLP Exi-2.

O marcador AFLP Exi-11 marca sobre o *locus Mex-1* (Noir et al., 2003) e amplifica um fragmento de 194pb (Fig. 3b). A presença deste *locus* foi detectada em todos os acessos de Icatu analisados, exceto na amostra 21 cuja amplificação falhou. Este marcador, tal como o marcador AFLP Exi-2, não amplificou a testemunha 3 (Híbrido de Timor). Este material pode não apresentar o sítio de amplificação para estes dois primers AFLP, visto que esta testemunha é um material resistente a nematóide.

O Híbrido de Timor, quando amplificado com os demais primers AFLP, apresenta a banda associada ao *locus Mex-1*. No entanto, quando utilizado como sonda para hibridização de filtros BAC de alta densidade (dados não mostrados), porta-se como um marcador repetitivo, o que o torna um marcador de difícil utilização, visto não ser possível a repetição dos resultados obtidos.

Os marcadores Exi-13 (Fig. 3c) e Exi-1 (Fig. 3d), distantes 1,2cM e 2,4cM respectivamente, amplificam fragmentos de 114pb (Exi-13) e 201pb (Exi-1). O marcador Exi-13 está mais próximo do *locus Mex-1* do que o marcador Exi-2. Ambos os marcadores apresentam a banda associada a *Mex-1*, no entanto, por serem marcas muito próximas a outras marcas, como é possível ver na figura 3 (c, d), a utilização destas bandas como marcadores SCAR seria muito difícil. Os marcadores Exi-11 e Exi-13 portam-se como sondas altamente repetitivas quando utilizadas em filtros BAC, o que torna o mapeamento físico da região *Mex-1* mais difícil e complicada, visto não ser possível iniciar a clonagem do gene *Mex-1* a partir dos marcadores Exi-11 e Exi-13, os quais estão mais próximos de *Mex-1*. Assim, a partir dos marcadores disponíveis para o mapeamento do *locus Mex-1*, observou-se que marcadores como Exi-1, Exi-3, Exi-11 e Exi-13, conseguiam detectar polimorfismo associado à resistência a *M. exigua*, podendo ser úteis para os programas de melhoramento.

## CONCLUSÕES

*Mex-1* é o primeiro gene de resistência a *Meloidogyne exigua* identificado em café. Os marcadores AFLP empregados se mostraram úteis para identificar a introgressão do fragmento associado a *Mex-1*.

As nove combinações de primers utilizadas estão associadas à presença do *locus Mex-1* que confere resistência a *M. exigua*. A introgressão deste *locus* pode levar ou não o alelo dominante, dessa forma, a planta pode expressar ou não resistência ao nematóide.

A identificação de marcadores moleculares ligados ao *locus* de resistência para *M. exigua* representa um importante ponto de início para auxiliar os retrocruzamentos nos programas de melhoramento e para detectar mais rapidamente a resistência durante a fase de semente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Anthony, F., Combes, M-C., Astorga, C., Bertrand, B., Graziosi, G. e Lashermes, P. 2002. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 104: 894-900.
- Bertrand, B., Aguilar, G., Santacreo, R. e Anzueto, F. 1999. El mejoramiento genético en América Central. In: Bertrand, B. e Rapidel, B. (eds). *Desafios de la caficultura centroamericana.*, IICA-CIRAD, San José, Costa Rica, pp. 405-456.
- Bertrand, B., Anthony, F. e Lashermes, P. 2001. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* of *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. *Plant Pathol.*, 50: 637-643.
- Campos, V.P. e Lima, R.D. de. 1986. Nematóides parasitas do cafeeiro. In: Rena, A.B., Malavolta, E., Rocha, M. e Yamada, T. (eds.). *Cultura do cafeeiro, fatores que afetam a produtividade.* Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 379-389.
- Fazuoli, L.C. 1986. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena, A.B., Malavolta, E., Rocha, M. e Yamada, T. (eds.). *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade.* Piracicaba, POTAFOS, p.87-113.

- Fazuoli, L.C., Medina Filho, H.P., Gonçalves, W., Guerreiro Filho, O. e Silvarolla, M.B. 2002. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônomo de Campinas. In: Zambolim, L. (ed.). O Estado da arte de tecnologias na produção de café. p.163-215.
- Gibco, Manual de AFLP. Catálogos nº 10717-015 e 10544-013.
- Gibco, Manual do Kit de Coloração com Nitrato de Prata.
- Gonçalves, W., Silvarolla, M.B. e Lima, M.M.A. 1998. Estratégias visando a implementação do manejo integrado dos nematóides parasitas do cafeeiro. Informe Agropecuário, 19 (193): 36-47.
- Gonçalves, W. e Silvarolla, M.B. 2001. Nematóides parasitos do cafeeiro. In: Zambolim, L. ed. Tecnologias de produção de café com qualidade. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, UFV, p.199-268.
- Matiello, J.B., Almeida, S.R. e Carneiro Filho, F. 1998. Novo cultivar resistente ao nematóide *Meloidogyne incognita*, à ferrugem do cafeeiro e com boa produtividade. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 24, Poços de Caldas, MG. Resumos... Rio de Janeiro, IBC/GERCA, p.2-3.
- Michelmore, R.W., Paran, I. e Kesseli, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9828-9832.
- Noir, S., Anthony, F., Bertrand, B., Combes, M.-C. e Lashermes, P. 2003. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. Plant. Pathol., 52: 97-103.
- Santos, J.M. e Triantaphyllou, H.H. 1992. Determinação dos fenótipos iso-enzimáticos e estudos dos comparativos da morfologia de 88 populações de *Meloidogyne* spp., parasitas do cafeeiro. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 16, 1992, Lavras. Resumos... Piracicaba: SBN/ESAL, 1992. p.42.



## Capítulo 3

### Isolamento de um cDNA de catalase de café

#### RESUMO

Uma biblioteca de cDNA de “Caturra” foi utilizada na tentativa de obter fragmentos de genes associados à resistência, através da hibridização com sondas RGA. Estes genes costumam se agrupar com outros genes de resistência, formando agrupamentos complexos de genes. Após a utilização das nove famílias RGA de café disponíveis, 32 colônias foram isoladas e seqüenciadas. Destas, 25 seqüências não apresentaram similaridade com outras seqüências disponíveis na base de dados do NCBI ou não puderam ser seqüenciadas. Seis amostras continham seqüências muito pequenas e não confiáveis, e apenas uma amostra resultou em uma seqüência de 428 nucleotídeos ou 142 aminoácidos. Esta seqüência apresentou alta homologia a catalases de outras plantas como *Nicotiana plumbaginifolia*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, entre outras. A esta catalase descoberta em café foi dado o nome de Cat-C. Na região C-terminal desta catalase foi detectada a presença de uma seqüência peroxissomal. No entanto, ao invés de uma seqüência SRL (Serina-Arginina-Leucina), foi encontrada uma seqüência TRL (Treonina-Arginina-Leucina). Esta diferença é devido à troca de uma timina por uma adenina. Esta troca pode ter ocorrido problemas no final do sequenciamento desta extremidade. Além desta seqüência, foi possível encontrar com identidade de 82%, uma catalase de ligação ao ácido salicílico (SR1) e com 77% uma seqüência parcial de aminoácidos da proteína de ligação ao ácido salicílico (SABP), ambas em *N. tabacum*. Sugerindo uma possível associação desta catalase (Cat-C) com as vias de ativação da resistência nas plantas.

#### INTRODUÇÃO

O ácido salicílico (SA – Salicylic Acid) é um componente fundamental nas vias de transdução de sinal, levando à ativação de respostas de defesa em plantas após o ataque do patógeno. Algumas evidências sugerem que ele tem um papel chave na ativação de certas respostas de defesa em várias espécies de dicotiledôneas, como por exemplo, na correlação do aumento do nível endógeno de SA com a indução de

genes PR (proteína relacionada à patogênese) e ao desenvolvimento de resistência em tabaco (*Nicotiana tabacum*) e pepino (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990; Rasmussen et al., 1991; Malamy et al., 1992). Diversos estudos identificaram várias proteínas, incluindo ascorbato peroxidase (APX) e catalase, através da qual o ácido salicílico poderia agir (Du e Klessig, 1997).

Para elucidar os mecanismos através do qual o SA induz as respostas de defesa, diversas proteínas foram identificadas em tabaco. A primeira, chamada proteína de ligação ao ácido salicílico (SABP – Salicylic Acid Binding Protein) mostrou ser uma catalase (Du e Klessig, 1997) que se liga de maneira reversível ao ácido salicílico (Conrath et al., 1995). SA e alguns de seus análogos inibem a atividade da catalase na degradação de  $H_2O_2$  enquanto análogos biologicamente inativos não inibem (Durner e Klessig, 1996). Deste modo, pode-se verificar que a inibição mediada pelo ácido salicílico poderia estar associada a um aumento nos níveis de  $H_2O_2$  observada durante a HR (Chen et al., 1993). Também foi visto que aumento da quantidade de SA após a infecção pelo patógeno poderia inibir a atividade da catalase, produzindo níveis elevados de  $H_2O_2$ , podendo ativar certas respostas de defesa, incluindo a expressão do gene PR (Slaymaker et al., 2002).

A catalase (CAT) é um dos principais sistemas enzimáticos para a remoção de  $H_2O_2$  das células das plantas (Willekens et al., 1995). Um modelo foi proposto no qual o SA liga-se e inativa as enzimas CAT, resultando em um aumento de  $H_2O_2$  intracelular que em troca age como um indutor dos genes de defesa do tipo PR-1 (Chen et al. 1993; Conrath et al. 1995; Durner e Klessig, 1996). O modelo foi inicialmente desenvolvido para explicar a indução da SAR mediada por SA (Dorey et al., 1998). Alguns trabalhos, porém, mostram que em tecidos que apresentam resistência sistêmica adquirida (SAR), o  $H_2O_2$  pode agir estimulando a resposta ao SA (Bi et al. 1995; Neuenschwander et al., 1995). Além disso, análises de plantas de tabaco geneticamente modificadas com atividade de CAT severamente reduzida revelou que a redução da CAT por si, não foi um sinal suficiente para a indução de PR-1, e que uma expressão rápida e forte de PR-1 necessitava de ácido salicílico e ocorria somente quando folhas desenvolviam os sintomas da necrose (Chamnongpol et al., 1996; Takahashi et al., 1997; Chamnongpol et al., 1998).

A catalase ( $H_2O_2$ :  $H_2O_2$  oxidoreductase, EC 1.11.1.6) é uma proteína heme que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio formado pela superóxido dismutase em oxigênio e água, processo este muito importante para respostas ao estresse, mas

também ocorre também devido a senescência (Natvig et al., 1996; John et al., 1997). Em plantas, a catalase está envolvida na eliminação de  $H_2O_2$ , a qual é gerada durante a foto-respiração e a P-oxidação de ácidos graxos (Morita et al., 1994). Ela também tem um papel importante na detoxificação de ‘espécies’ de oxigênio ativas que são gerados por stress ambiental (Scandalios, 1990). Muitas plantas superiores têm isoformas múltiplas da catalase. A catalase de milho, por exemplo, é codificada por três genes distintos cuja expressão é regulada diferencialmente em resposta a mudanças na fase do desenvolvimento ou nas condições ambientais (Redinbaugh et al., 1988; Scandalios, 1990). Duas isozimas da catalase de algodão também exibem diferentes padrões de expressão (Ni e Trelease, 1991).

Um fator importante da capacidade do patógeno em infectar ou não uma planta está na habilidade para tolerar ou eliminar moléculas tóxicas produzidas pela célula vegetal (Hammond-Kosack e Jones, 1996; Osbourn, 1996; Garre et al., 1998). Um fator adicional crítico é a evasão do sistema de detecção do patógeno pela remoção de moléculas que poderiam ser detectadas por este sistema, como fatores de avirulência (Joosten et al., 1994). Uma das primeiras respostas da célula da planta na detecção do patógeno é a geração de oxigênio reativo, chamado queima oxidativa (Doke, 1983; Mehdy, 1994; Low e Mérida, 1996). O  $H_2O_2$  produzido durante esta queima oxidativa está envolvido em várias respostas que poderiam contribuir à restrição do crescimento do patógeno, tal como o ‘cross-link’ das proteínas estruturais com as substâncias fenólicas das paredes celulares (Bradley et al., 1992; Brisson et al., 1994; Otte e Barz, 1996), ativando uma necrose rápida nos locais de infecção, um fenômeno conhecido como resposta de hipersensibilidade (HR) (Hammond-Kosack e Jones, 1996), e poderia, além disso, agir diretamente como um agente antimicrobiano (Peng e Kuc, 1992).

O aumento da atividade de enzimas oxidativas, como a lipoxigenase e a peroxidase, de enzimas da via dos fenilpropanóides, como por exemplo a fenilalanina amônia-liase, e proteínas relacionadas com a patogenicidade ( $\beta$ -glucanases e quitinases) têm sido também associados à expressão da resistência do cafeeiro a doenças como a ferrugem, por exemplo (Maxemiuc-Naccache e Dietrich, 1985; Rojas et al., 1993; Silva et al., 1998; Silva et al., 2000; Guerra-Guimarães et al., 2001; Silva et al., 2001a, b; Silva et al., 2002).

Utilizando métodos de hibridização por supressão substrativa (Diatchenko et al., 1996) foram obtidas bibliotecas de cDNA de café enriquecidas com seqüências especificamente expressadas durante a HR (Fernandez et al., 2001a, b; Fernandez et

al., 2003). Alguns clones foram selecionados por hibridização diferencial com sondas complexas de cDNA geradas de grupos de mRNA resistentes e susceptíveis. Sessenta por cento dos clones seqüenciados mostraram alta similaridade com seqüências de planta em bancos de dados, e a metade deles com proteínas cujo papel em reações de defesa de plantas foi sugerido ou demonstrado como quitinases, proteínas de choque térmico, citocromo P<sub>450</sub>, metalotioneínas e canais iônicos (Choi et al., 1996; Guy e Li, 1998; Van Loon e Van Strien, 1999; Clough et al., 2000; Whitbred e Schuler, 2000).

A utilização de sondas RGA (análogos de genes de resistência) para avaliar uma biblioteca de cDNA foi feita. Esta biblioteca de cDNA de café utilizada foi obtida a partir de folhas infectadas pelo fungo *H. vastatrix* e enriquecidas com seqüências expressas durante a reação de hipersensibilidade. A possibilidade de encontrar seqüências de cDNA diretamente associadas à resistência, além do fato dos RGAs se agruparem a genes de resistência, fez com que se buscasse genes ou fragmentos de genes de resistência nesta biblioteca.

O objetivo deste trabalho foi o de isolar fragmentos de genes associados à resistência em bibliotecas de cDNA por meio de hibridização com sondas do tipo RGA.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consistiu de três hibridizações consecutivas a partir da biblioteca de cDNA utilizando sondas do tipo RGA, para seleção das colônias. Depois da terceira seleção, as colônias separadas foram crescidas em meio líquido, para aumentar a quantidade de DNA presente, a qual foi purificada, a fim de se obter o DNA puro. Este material foi enviado para sequenciamento e sua sequencia foi comparada a outras sequencias presentes nos bancos de dados da internet (NCBI) através no programa Blast.

### **Biblioteca de cDNA de ‘Caturra’**

A biblioteca de cDNA de café foi obtida a partir de folhas da variedade Caturra (*Coffea arabica* L.) infectadas pelo fungo *Hemileia vastatrix*. As folhas de ‘Caturra’ foram coletadas após 18 horas de inoculação (Fernandez et al., 2003) durante a reação de hipersensibilidade. Este trabalho foi integralmente desenvolvido no Laboratório Genetrop do ‘Institute de Recherche pour le Développement’ (IRD), Montpellier, França, sob coordenação do Dr. Philippe Lashermes.

### Sondas utilizadas

Foram utilizadas para a avaliação do banco de cDNA, sondas das nove famílias (A a I) de RGA. O número dos acessos e a família a qual pertencem estes RGAs de café utilizados estão depositados na EMBL foram: AJ298883 (CrgaA1), AJ298885 (ArgaB1), AJ298886 (ArgaC1), AJ298887 (CrgaD1), AJ298888 (CrgaE1), AJ298889 (CrgaF2), AJ298891 (ArgaG1), AJ298893 (CrgaH1) e AJ298895 (ArgaI1). Estas famílias de RGAs são as mesmas descritas por Noir et al. (2001).

### Avaliação da Biblioteca de cDNA

Para se avaliar a biblioteca de cDNA de 'Caturra' foi utilizada uma solução fágica inicial (com cDNA) diluída à  $1 \times 10^6$  pfu/ $\mu$ L.

### Avaliação primária

Inicialmente, uma cultura de bactérias *E. coli* 'XL1 Blue' foi colocada para crescer a 37°C sob agitação constante por 8 horas ou até que o coeficiente óptico (DO) atingisse 2 ou, no mínimo, 1,5 à 600nm. As bactérias foram inoculadas a partir de uma colônia ou a partir de 150 $\mu$ L de uma pré-cultura de bactérias (15mL de meio LB líquido, 10mM de MgSO<sub>4</sub> e 0,2% de Maltose).

Antes do término do crescimento, algumas placas de Petri de 12x12cm contendo meio de cultura NZY MgSO<sub>4</sub> foram preparadas. Estas placas foram colocadas a 37°C até o momento do uso. Após as 8 horas de cultivo (crescimento), a cultura de bactérias foi centrifugada por 5 minutos a 1.500g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 7,5mL de MgSO<sub>4</sub> 10mM.

A cada placa foi adicionado 500 $\mu$ L da cultura bacteriana acrescida de 2 $\mu$ L da solução fágica contendo cDNA previamente diluída. Para esta diluição (100 vezes), 10 $\mu$ L de solução fágica inicial foi acrescentada a 1000 $\mu$ L de solução Lambda 1X. Para cada cinco placas utilizadas com esta diluição, cerca de 100 mil fagos foram testados. Antes de verter nas placas esta solução fágica diluída em cultura bacteriana, foi feita uma incubação por 15 minutos a 37°C (estufa seca), sem agitação, para que houvesse uma maior ligação entre a solução bacteriana e a solução fágica. Em seguida, esta mistura foi adicionada a 5mL de meio LB Top-Agarose, o qual foi homogeneizado e vertido nas placas de Petri, sob o meio de cultura inicial, onde permaneceram por 10 minutos para secar, sendo incubadas por uma noite a 37°C.

Após esta incubação durante a noite, as placas foram colocadas a 4°C, onde permaneceram por 1 hora. Durante este período, as membranas de nitrocelulose (Amersham Hybond N+) de 10x11cm foram recortadas e numeradas. Em seguida, foram preparadas as 3 soluções para a impressão da cultura na membrana:

- Denaturação: NaOH (0,5M) e NaCl (1,5M).
- Neutralização: NaCl (1,5M) e Tris-HCl (0,5M, pH 8,0).
- Lavagem: SSC 2X (NaCl 0,3M e Citrato de Sódio Bi-Hidratado 0,03M).

Para a impressão da cultura em cada membrana, as placas foram retiradas da geladeira no momento do uso. A primeira membrana (membrana A1) foi colocada sobre o meio da placa por 2 minutos. Após a impressão da membrana, procedeu-se a desnaturação por 5 minutos, seguida de neutralização por mais 5 minutos e lavagem em solução SSC 2X por cerca de 10 segundos. Após estas etapas, a membrana foi colocada para secagem sobre papel filtro (Whatman 3MM), onde permaneceu até o momento de ser fixada.

Foram feitas duas impressões para cada placa. Na segunda impressão, o tempo de contato da membrana (membrana B1) com a placa foi de 3 minutos. Após esta segunda impressão, os mesmos procedimentos de lavagem e fixação das membranas foram efetuados. As membranas foram fixadas no Crosslinker (forno de UV) a  $1,2 \times 10^5 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ .

### **Hibridização das Membranas**

As membranas foram colocadas em tubos especiais para hibridização e os procedimentos de pré-hibridização e hibridização foram iniciados. A solução de pré-hibridização (Tabela 1) foi aquecida (sem o esperma de salmão) por 10 minutos à 65°C. Paralelamente, o esperma de salmão foi desnaturado por 10 minutos à 95°C e em seguida, acrescentado à solução que estava a 65°C. A pré-hibridização foi feita, por no mínimo, 3 horas à 65°C. Após a pré-hibridização, um pequeno volume da solução foi retirado e, a este foi adicionado 15µL de sonda marcada, previamente desnaturada. A hibridização foi realizada a 65°C, sob rotação constante em um forno de hibridização, durante toda à noite.

### Preparação da Sonda

A sonda foi preparada segundo o procedimento descrito no manual do KIT Megaprime DNA Labelling Systems (RPN 1604) da Amersham para marcação de sondas radioativas utilizando  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ .

**Tabela 1.** Solução de pré-hibridização e hibridização.

Solução final dos componentes	Concentração inicial das soluções	Volume de cada solução para 1 membrana (20mL)
<b>Denhardt 5X</b>	50X	2mL
<b>SSC 6X</b>	20X	6mL
<b>SDS 0,5%</b>	10%	1mL
<b>Esperma de Salmão 1mg/mL</b>	10mg/mL	0,2mL (após denaturação)
<b>Água qsp. 20mL</b>	-	10,8mL

### Lavagem e Exposição das Membranas

Para cada etapa da lavagem, 50mL de cada solução foi utilizado. A primeira e segunda lavagem foram realizadas a temperatura ambiente por 10 minutos, utilizando soluções de SSC 2X com SDS 0,1% e SSC 1X com SDS 0,1%, respectivamente. A última etapa de lavagem foi realizada com SSC 0,5X e SDS 0,1% a 65°C por 10 minutos em forno de hibridização.

As membranas foram envoltas em filme plástico (face hibridizada para cima) e colocadas em cassete apropriado com filme para radiação  $\alpha\text{-P}^{32}$ . O cassete com as membranas foi colocado a -80°C até o momento da revelação. O tempo de exposição variou conforme a intensidade da radiação, variando de poucas horas a dias. Para a revelação do filme, o cassete foi retirado do freezer 30 minutos antes e deixando a temperatura ambiente.

### **Revelação dos Filmes**

A revelação dos filmes foi feita manualmente. Para isso, foram utilizados os reagentes apropriados da Kodak®, segundo as instruções do fabricante. Após a análise do filme e da confirmação das colônias marcadas, procedeu-se a recuperação dos fagos inicialmente marcados nas placas.

### **Avaliação secundária**

Após a comparação das colônias marcadas no filme com as colônias das placas, recuperou-se do meio de cultura, os fagos marcados e selecionados. No entanto, cerca de 3 a 4 fagos ao redor do ponto principal também foram recuperados. Cada fago recuperado foi diluído em 1mL de solução Lambda 1X e, quando necessário, diferentes diluições foram efetuadas. As placas de Petri, contendo o meio NZY–MgSO<sub>4</sub>, foram colocadas a 37°C até o momento do uso. Uma suspensão com as bactérias ‘XL1 Blue’ foi novamente feita e, ao atingir o coeficiente óptico entre 1,5 e 2, à 600nm, foi centrifugada por 5 minutos a 1.500g a 4°C. O precipitado foi diluído em 7,5mL de MgSO<sub>4</sub> 10mM.

Em tubo estéril, 500µL da suspensão bacteriana de XL1 Blue foi misturada a 2µL da solução fágica (fagos recuperados e diluídos anteriormente). Esta mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e acrescentada a 5mL de meio LB Top Agarose. Depois de homogeneizadas por inversão, esta mistura foi vertida sobre as placas de Petri previamente deixadas a 37°C. Depois de secas foram incubadas por uma noite à 37°C, sem agitação. Após esta etapa, os procedimentos foram os mesmos da avaliação primária até a recuperação das colônias nas placas para que fosse feita uma terceira e última avaliação.

### **Avaliação terciária**

O início desta última etapa foi a mesma efetuada para as etapas anteriores. Exceto pelo fato de que nesta fase, 500µL da solução bacteriana XL1 Blue (sem os fagos) foram acrescentados a 5mL de NZY TOP-Agar. Esta mistura foi vertida sobre o meio NZY-MgSO<sub>4</sub> e permaneceu por 10 minutos para secagem. Em seguida, foi aplicado 1µL das diferentes diluições de cada placa de lise isolada (recuperadas em 350µL e diluídas 1 ou 2 vezes) sobre o TOP Ágar seco. Esta placa foi colocada em estufa a 37°C por uma noite. Entretanto, para que houvesse uma separação entre os fagos



aplicados, a placa foi dividida em 18 partes (1 fago por parte). Depois de aplicadas as colônias selecionadas, o procedimento adotado foi o mesmo das etapas anteriores.

### **Mini-Prep**

Utilizou-se o kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” da Promega, a fim de isolar e purificar o DNA plasmidial, segundo as recomendações do fabricante.

### **Sequenciamento**

O DNA plasmidial purificado foi enviado para sequenciamento em Evry, França, após ser analisado e quantificado em gel.

### **Análise das seqüências e comparação com a base de dados (BLAST)**

Com o intuito de se obter maior diversidade nos dados, três análises, utilizando-se o programa Blast e o banco de dados do NCBI foram realizadas. A primeira para comparar a seqüência de nucleotídeos, utilizando-se o programa blastn, a segunda para comparar proteínas, por meio do programa blastp e a terceira utilizando o programa tblastx, que compara a seqüência a ser analisada com seqüências já traduzidas e depositadas no banco de dados do NCBI.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Durante a hibridização com as sondas RGA utilizando a biblioteca de cDNA de café para isolar parte de um gene associado à resistência a doenças em plantas, 32 clones desta biblioteca foram isolados e seqüenciados. Vinte e cinco seqüências não apresentaram nenhuma similaridade com a base de dados do NCBI ou não foi obtido sucesso em seu sequenciamento, tendo sido descartados. Seis amostras continham seqüências muito pequenas, e por isso, não confiáveis e uma única amostra resultou em uma seqüência de 428 nucleotídeos ou 142 aminoácidos (Figura 1). Esta seqüência apresentou alta homologia a catalases de outras plantas, como *Nicotiana plumbaginifolia*, *Prunus persica*, *Solanum melongena*, *Capsicum annuum*, *Glycine max*, *Manihot esculenta*, *Phaseolus vulgaris*, *Lycopersicon esculentum*, *Gossypium hirsutum*, entre outras.

Foi dado a catalase de *Coffea arabica* L. o nome de Cat-C, para que fosse possível diferenciá-la das demais catalases comparadas. Na Figura 1, temos a seqüência de nucleotídeos de Cat-C e, logo abaixo de cada linha, sua seqüência deduzida de aminoácidos. Foi verificada a presença, na região carboxi-terminal da catalase, de uma seqüência peroxissomal marcada com uma caixa em azul (TRL) (Fig. 1). Há diferença de uma base, indicada em vermelho. A presença de uma adenina no lugar de uma timina. Assim, ao invés de ser encontrada a seqüência SRL (Serina-Arginina-Leucina), proteína original associada à seqüência C-terminal, encontrou-se a seqüência TRL (Treonina-Arginina-Leucina). Uma das possibilidades para explicar esta mudança seria uma mutação pontual, levando a troca desta timina pela adenina, ou ainda um problema no final do sequenciamento desta extremidade, a qual poderia estar pouco legível. A presença destes aminoácidos conservados nos indica que estariam faltando para o término da região C-terminal cerca de 6-7 resíduos de aminoácidos (Niebel et al., 1995; Kwon e An, 2001). Também falta isolar e sequenciar a extremidade N-terminal da catalase (cat-C) de café.

A presença desta seqüência peroxissomal na região C-terminal, formada pelos aminoácidos SRL, encontrada em quase todas as catalases de plantas (Gonzáles, 1991; Niebel et al., 1995) foi um indício da associação entre a catalase encontrada e a resistência em plantas. Como a seqüência obtida da catalase de café é parcial, não foi possível verificar a presença dos aminoácidos conservados envolvidos na atividade catalítica (His, Ser e Asn), bem como da associação direta com o grupo heme (Val, Arg, Tyr, Phe e Pro).



Após o alinhamento da seqüência parcial de nucleotídeos da catalase de café (Cat-C) (senso direto) com outras seqüências parciais e totais de nucleotídeos de outras catalases, obtidas em bancos de dados de seqüências disponíveis na internet, foram verificadas dentre as maiores identidades, as que estavam associadas à resistência. Foi possível encontrar, com identidade de 82%, uma catalase (Cat-1) de ligação ao ácido salicílico (SR1) de *Nicotiana tabacum* (Fig. 2). Na mesma porcentagem de identidade, foi encontrada também outra seqüência parcial de nucleotídeos da catalase (Cat-1) de *Prunus persica* (Fig. 3). O que mostra a utilidade destas seqüências para a utilização, como sondas, na busca de genes heterólogos desta catalase.

Outra catalase utilizada para comparação dentre as inúmeras encontradas, foi a seqüência parcial de aminoácidos da proteína de ligação ao ácido salicílico (SABP), uma catalase conhecida como Cat-1 de *Nicotiana tabacum* (Fig. 4). Neste caso, a porcentagem de identidade foi um pouco menor, 77%, no entanto, ainda bem alto.

Como foi visto, a catalase Cat-C obtida a partir da biblioteca de cDNA de café, ao ser comparada com o banco de dados de seqüências, tanto de nucleotídeos, quanto de proteínas, apresentou forte homologia com as seqüências comparadas, variando de 75 a 85%. Além das seqüências acima mostradas, outras catalases foram encontradas mostrando alta homologia a Cat-C, como por exemplo: Cat-1 de *N. plumbaginifolia* (79%), Cat-2 de *Prunus persica* (82%), CatSM de *Solanum melongena* (78%), Cat-3 (82%) e CaCat-1 (79%) de *Capsicum annuum*, Cat-1, Cat-2, Cat-3 e Cat-4 de *Glycine max* (todas com 77% de identidade), além das catalases de mandioca (76% a Cat-1 de *Manihot esculenta*), feijão (77% a Cat-1 de *Phaseolus vulgaris*), tomate (77% a Cat-2 de *Lycopersicon esculentum*), algodão (81% a Cat-2 de *Gossypium hirsutum*), entre outras.

```

Cat-C      atattcgcataatggtgatacccaagcgacaccgtcttggcccaactatatgcagcttcc 60
          ||||| ||| ||||| || | ||||| ||| ||||| ||||| |||||
SR1-1025   atattcgcgtatgctgataactca-gagacaccgtattggaccaaactatatgcagcttcc 1083

Cat-C:61   tgtaaatgctcccaagtgtgctcatcacaacaatcactatgatggtttcatgaacttcat 120
          ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
SR1:1084   tgtaaatgctcccaagtgtgctcatcacaataatcaccgcgatggtgccatgaacttcat 1143

Cat-C:121   gcaccgggatgaagaggtcgattatctccctcaaggttcgatcctgttcgcatgctgc 180
          ||| || ||||| ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| |||||
SR1: 1144   gcatcgcgatgaagaggtggattatctgccctcaaggttcgatcctgttcgcatgctga 1203

Cat-C:181   gaggcatacccatcccctctactgtcctgagaggaaagcgtgacaggtgtgttactccgaa 240
          | | || || || ||| ||| ||| ||||| ||||| | ||||| | | |||
SR1: 1204   acagtaccaatccttctcgtgtccttgacaggaaggcgtgaaatgtgtgtcattgagaa 1263

Cat-C:241   ggagaacaacttcaagcaagcgggagagagataccgatcctgggcacctgacaggcaaga 300
          ||||| ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
SR1: 1264   agagaacaacttcaagcaggcaggagaaagatacagatcctgggaacctgacaggcaaga 1323

Cat-C:301   gagatctatctgccgatgggttgatattttatctgatgcacgagtcacccatgagatccg 360
          |||| | | || ||||| ||||| ||| ||||| ||||| ||||| |||
SR1: 1324   cagatatgtagcaaatgggttgagcatttatccgatccacgagtcacttatgagatacg 1383

Cat-C:361   cagtatctggatttcatactggtctcaggctgacaaatctcttggtcagaaaatggctactcgtctca 428
          ||||| ||||| | | | ||||| ||||| ||| ||||| ||||| ||| |||||
SR1: 1384   cagtatatggatatgctccctgtctcaggctgacaagtcttgggtcagaaggctcgcttctcgtctca 1451

```

**Figura 2.** Alinhamento da seqüência parcial de nucleotídeos da catalase de café (Cat-C) (senso direto) com a seqüência parcial de nucleotídeos da catalase de ligação ao ácido salicílico (SR1) de *Nicotiana tabacum* (U03473).



```

Cat-C 8 KRHRLGPNYMQLPVNAPKCAHHNNHYDGFNMFMHRDEEVDYFPSRFDVVRHAARHPIPST 67
      +RHR+GPNYMQLPVNAPKCAHHNNH DG MNFMHRDEEVDY PSRFDV RHA ++PIPS
Cat-1 352 QRHRIGPNYMQLPVNAPKCAHHNNHRDGAMNFMHRDEEVDYLPSRFDVPCRHAEQYPIPSR411

Cat-C 68 VLRGKRDRCVTPKENNFKQAGERYRSWAPDRQERFICRWVDILSDARVTHEIRSIWISYW 127
      VL G+R+ CV KENNFKQAGERYRSW PDRQ+R++ +WV+ LSD RVT+EIRSIWISY
Cat-1 412 VLTGRREMCVIEKENNFKQAGERYRSWEPDRQDRYVSKWVEHLS DPRVTYEIRSIWISYL 471

Cat-C 128 SQADKSLGQKMATRL 142
      SQADKS GQK+A+RL
Cat-1 472 SQADKSCGQKVASRL 486

```

**Figura 4.** Alinhamento da seqüência parcial de aminoácido da catalase de café (Cat-C) (senso direto) com a seqüência parcial de aminoácidos da proteína de ligação ao ácido salicílico (SABP), a catalase (Cat-1) de *Nicotiana tabacum*, com destaque para as seqüências TRL e SRL, de *C. arabica* e *N. tabacum*, respectivamente, na posição C-terminal.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a proteína SABP de *N. tabacum*, *A. thaliana* e de tomateiro é uma catalase que inibe o ácido salicílico (Sánchez-Casas e Klessig, 1994). As propriedades apresentadas por esta proteína sugerem seu envolvimento na indução, mediada pelo ácido salicílico, da resistência sistêmica adquirida em plantas. A inibição da catalase pode levar a um aumento na concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou espécies ativas de oxigênio dele derivados que surgiram durante a respiração, fotossíntese, fotorespiração ou durante a resposta hipersensível contra patógenos. O  $H_2O_2$  pode ter uma atividade antibiótica contra a invasão dos patógenos. Este peróxido e seus derivados podem também atuar como intermediários na cascata de sinalização para a expressão de genes relacionados à defesa (Chen *et al.*, 1993; Durner *et al.*, 1997).

Levando em consideração o papel proposto por diversos autores de que  $H_2O_2$  age como um mensageiro secundário na indução do mecanismo de defesa (Apostol *et al.*, 1989), outra interpretação para o mecanismo pode ser formulada. Se o  $H_2O_2$  gerado durante a interação planta-patógeno pode induzir os mecanismos de defesa, ele seria crítico também para a busca do patógeno para estabelecer uma interação compatível para interferir com os níveis endógenos e conseqüentemente a difusão do mensageiro secundário. Durante a evolução, os patógenos poderiam então ter desenvolvido mecanismos para controlar os níveis de  $H_2O_2$  dentro dos tecidos da planta. Tal mecanismo pode controlar direta ou indiretamente, a expressão da catalase (Niebel *et al.*, 1995).

## CONCLUSÕES

Cat-C foi à primeira catalase parcial isolada e seqüenciada de *C. arabica* L. Esta catalase encontrada apresenta alta homologia a outras catalases e está envolvida na resposta a estresses bióticos e abióticos nas plantas, como por exemplo, a resistência a doenças. Há muitos mecanismos que ainda precisam ser esclarecidos, no entanto, o sequenciamento completo da catalase (Cat-C) do cafeeiro, poderia ser útil para o isolamento de outros genes envolvidos, direta ou indiretamente, na resistência. Entender mais sobre a bioquímica da catalase bem como o processo de sua ativação é extremamente importante para trabalhos com resistência induzida e adquirida em plantas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apostol, I., Heinstein, P.F. e Low, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.*, 90: 109-116.
- Bi, Y.M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R. e Draper, J. 1995. Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J.*, 8: 235-245.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. e Lamb, C.J. 1992. Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell*, 70: 21-30.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R. e Lamb, C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, 6: 1703-1712.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Camp, W. 1996. Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis related expression under high light. *Plant J.*, 10: 491-503.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D. e Van Camp, W. 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5818-5823.
- Chen, Z.X., Silva, H. e Klessig, D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262: 1883-1886.
- Choi, D., Kim, H.M., Yun, H.K., Park, J.A., Kim, W.T. e Bok, S.H. 1996. Molecular cloning of a metallothioneine-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.*, 112: 353-359.
- Clough, S.J, Fengler, K.A., Yu, I.C., Lippok, B., Smith, R.K. e Bent, A.F. 2000. The *Arabidopsis* dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 16: 9323-9328.
- Competent and Supercompetent Cells. Instruction Manual. Stratagene, 12p., 2002.
- Conrath, U., Chen, Z.X., Ricigliano, J.R. e Klessig, D.F. 1995. Two inducers of plant defense responses, 2,6 dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7143-7147.

- Diatchenko, L., Lau, Y-F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. e Siebert, P.D. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6025-6030.
- Doke, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with the incompatible race of *Phytophthora infestans* and to hyphal cell wall components. *Physiol. Plant Pathol.*, 23: 345-357.
- Dorey, S., Baillieul, F., Saindrenan, P., Fritig, B. e Kauffmann, S. 1998. Tobacco Class I and II Catalases Are Differentially Expressed During Elicitor-Induced Hypersensitive Cell Death and Localized Acquired Resistance. *MPMI*, 11(11): 1102-1109.
- Du, H. e Klessig, D.F. 1997. Identification of a Soluble, High-Affinity Salicylic Acid-Binding Protein in Tobacco. *Plant Physiol.*, 113: 1319-1327.
- Durner, J. e Klessig, D.F. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 11312-11316.
- Durner, J., Shah, J. e Klessig, D.F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 2: 266-274.
- Fernandez, D., Noir, S., Agostini, C., Bon, M-C., Combes, M-C., Silva, M.C., Guerra-Guimaraes, L., Anthony, F., Bertrand, B. e Lashermes, P. 2001a. Molecular physiology and genetics of coffee resistance to parasites. *Proceedings of the XIX Scientific Colloquium on Coffee, ASIC, Trieste, Italy, Asic (eds.), Paris, CD-Rom, 7p.*
- Fernandez, D., Santos, P., Bom, M-C., Combes, M-C., Agostini, C., Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L. e Ribeiro, A. 2001b. Construction of libraries of coffee cDNA sequences early expressed during hypersensitive response to the rust pathogen *Hemileia vastatrix*, using subtractive suppressive hybridization. In: *Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 11., e Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, 3., 17-20 de setembro de 2001. Proceedings... Evora, Portugal, p.196-198.*
- Fernandez, D., Santos, P., Agostini, C., Bom, M-C., Petitot, A-S., Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L., Ribeiro, A. e Nicole, M. 2003. Early expressed coffee

- genes in the hypersensitive reaction to the rust fungus *Hemileia vastatrix*. Poster apresentado no 11º Congresso MPMI, 18-26 Julho, São Petersburgo, Rússia.
- Garre, V., Müller, U. e Tudzynski, P. 1998. Cloning, Characterization, and Targeted Disruption of *cpcat1*, coding for an in Plant Secreted Catalase of *claviceps purpurea*. *Mol. Plant Microb. Interac.*, 11(8): 772-783.
- Gonzales, E. 1991. The C-terminal domain of plant catalases. *Eur. J. Biochem.*, 199: 211-215.
- Goodman, R.N. e Novacky, A.J. 1994. *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens: A Resistance Phenomenon*. American Phyto-pathological Society, St. Paul, MN.
- Guerra-Guimarães, L., Silva, M.C., Nicole, M., Azinheira, H.G., Rodrigues JR., C.J. e Pinto Ricardo, C. 2001. Chitinase activity associated with coffee-rust interaction. 2001. In: Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 11., e Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, 3., 17-20 de setembro de 2001. *Proceedings...* Evora, Portugal, p.356-358.
- Guy, C.L. e Li, Q.B. 1998. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell*, 10: 539-556.
- Hammond-Kosack, K.E. e Jones, J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773-1791.
- John, I., Hackterr, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A. e Grierson, D. 1997. Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Mol. Biol.*, 33: 641-651.
- Joosten, M.H.A.J., Cozijensen, A.J. e De Wit, P.J.G.M. 1994. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in avirulence gene. *Nature* 367: 384-387.
- Kwon, S.I e An, C.S. 2001. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a catalase cDNA from hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 160: 961-969.
- Low, P. S. e Mérida, J. R. 1996. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol. Plant.*, 96: 533-542.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. e Raskin, I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250: 1002-1004.

- Malamy, J., Hennig, J. e Klessig, D.F. 1992. Temperature dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell*, 4: 359-365.
- Maxemiuc-Naccache, V. e Dietrich, S.M.C. 1985. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). *Revista Brasileira de Botânica*, v.8, p.185-190.
- Megaprime™ DNA labeling systems. RPN 1604/5/6/7. Amersham Biosciences, 47 p., 1997.
- Mehdy, M. C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.*, 105: 467-472.
- Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. e Inverardi, B. 1990a. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250: 1004-1006.
- Métraux, J-P., Signer, H., Ryals, J.A., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. e Raskin, I. 1990b. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250: 1002-1004.
- Morita, S., Tasaka, M., Fujisawa, H., Ushimaru, T. e Tsuji, H. 1994. A cDNA Clone Encoding a Rice Catalase Isozyme. *Plant Physiology*, 105: 1015-1016
- Natvig, D.O., Sylvester, K., Dvorachek, W.H., Jr., e Baldwin, J.L. 1996. Superoxide dismutases and catalases. Pages 191-209 in: *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*. R. Brambl and G. A. Marzluf, eds. Springer-Verlag, Berlin.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H. e Ryals, J. 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.*, 8: 227-233.
- Ni, W. e Trelease, R.N. 1991. Post-transcriptional regulation of catalase isozyme expression in cotton seeds. *Plant Cell*, 3: 737-744.
- Niebel, A., Heungens, K., Barthels, N., Inzé, D., Van Montagu, M. e Godelieve, G. 1995. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *MPMI*, 8(3): 371-378.
- Osborn, A. E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, 8: 1821-1831.

- Otte, O. e Barz, J. 1996. The elicitor-induced oxidative burst in cul-tured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta*, 200: 238-246.
- Peng, M. e Kuc, J. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, 82: 696-699.
- Rasmussen, J.B., Hammerschmidt, R. e Zook, M.N. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol*, 97: 1342-1347.
- Redinbaugh, M.G., Wadsworth, G.J. e Scandalios, J.G. 1988. Characterization of catalase transcript and their differential expression in maize. *Biochim Biophys Acta*, 951: 104-116.
- Rojas, M.L., Montes de Gómez, V. e Ocampo, C.A. 1993. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43: 209-219.
- Sánchez-Casas, P. e Klessig, D.F. 1994. A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol.*, 106: 1675-1679.
- Scandalios, J.G. 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv. Genet.*, 28: 1-41.
- Silva, M.C., Nicole, M., Guerra-Guimarães, L., Bresson, E., Rijo, L., Geiger, J.P. e Rodrigues Jr, C.J. 1998. Cytological and biochemical aspects associated with the hypersensitive reaction in coffee plants infected with orange rust – *Hemileia vastatrix*. In: International Congress of Plant Pathology, 7., 9-16 agosto, Edimburgo, Escócia. Proceedings... vol. 2, Abstract 1.2.35.
- Silva, M.C., Várzea, V.M.P., Marques, D.V., Guerra-Guimarães, L., Nicole, M., Coelho, D., Geiger, J.P. e Rodrigues Jr, C.J. 2000. The role of peroxidase activity in the hypersensitive reaction of *Coffea arábica* plants with complete resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). In: International Symposium on “Durable Resistance: Key to sustainable Agriculture”. 28 de novembro a 1º de dezembro, Ede-Wageningen, Holanda. P.59.
- Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L., Nicole, M. e Rodrigues Jr, C.J. 2001a. Aspectos citológicos e bioquímicos da interação cafeeiro-ferrugem alaranjada. *Anais do*

- Congresso Brasileiro de Fitopatologia e 34º Congresso Latino Americano de Fitopatologia, 11, Agosto de 2001, São Pedro, SP, Brasil.
- Silva, M.C., Loureiro, A., Guerra-Guimarães, L., Nicole, M., Valente, P. e Rodrigues Jr, C.J. 2001b. Active oxygen metabolism in the hypersensitive response of coffee-rust interaction. 2001. In: Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 11., e Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, 3., 17-20 de setembro de 2001. Proceedings... Evora, Portugal, p.346-348.
- Silva, M.C., Nicole, M., Guerra-Guimarães, L. e Rodrigues Jr, C.J. 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense response arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 160 (4): 169-183.
- Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G.B. e Klessig, D.F. 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *PNAS*, 99(18): 11640–11645.
- Takahashi, H., Chen, Z., Du, H., Liu, Y., and Klessig, D. F. 1997. Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J.*, 11: 993-1005.
- TOPO TA Cloning Kit for Sequencing. Version K. Invitrogen, 35p., 2003.
- Van Loon, L.C. e Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiol. Mol Plant Pathol.*, 55: 85-97.
- Whitbred, J.M. e Schuler, M.A. 2000. Molecular Characterization of Cyp73a9 and Cyp82a1 P450 Genes Involved in Plant Defense in Pea, *Plant Physiology*, 124: 47-58.
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M. e Van Camp, W. 1995. Catalases in plants. *Mol. Breeding*, 1: 207-228.
- Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System. Promega, Technical Bulletin n°225, 12p., 2002.

# **ANEXOS**

**Anexo 1 – Capítulo 1****Tabela 1.** Soluções utilizadas no Material e Métodos do Capítulo 1.

<b>GET (para 50mL)</b>	<b>Volume</b>
Glicose 2M estéril	1,25mL
EDTA 0,5M pH 8,0 estéril	1mL
Tris 1M pH 8,0 estéril	1,25mL
Água	46,5mL

<b>NaOH/SDS (para 50mL)</b>	<b>Volume</b>
NaOH 1M	10mL
SDS 10% estéril	5mL
Água	35mL

<b>AcK/AcA (para 50mL)</b>	<b>Volume</b>
Acetato de Potássio 5M estéril	30mL
Ácido Acético	5,75mL
Água	14,25mL

**Clonagem dos fragmentos selecionados**

Para a clonagem dos fragmentos selecionados foi utilizado o kit “TOPO TA Cloning® (versão K, 4506-41)” da Invitrogen. A transformação foi feita de acordo com as instruções do fabricante, sendo que para a transformação em *E. coli* quimicamente competentes do kit TOPO TA Cloning, foi adicionado Cloreto de sódio (NaCl) e Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), em uma concentração final de 200mM e 10mM, respectivamente, para que houvesse um aumento na eficiência da transformação e um maior número de colônias fosse obtido.





### **Miniprep para as BACs**

Para a obtenção de DNA puro, sem os plasmídeos, foi utilizada a técnica do mini-prep. Para isso, os seguintes passos foram realizados: centrifugação inicial da solução contendo o DNA com plasmídeo por 30 minutos a 4.000rpm e temperatura ambiente. Após a centrifugação, os tubos contendo esta solução foram imediatamente colocados em gelo. Em seguida foi acrescentado 150µl de GET (Glicose-EDTA-Tris). Após diluir o precipitado com auxílio de um vórtex, os tubos foram novamente colocados em gelo. Foram acrescentados 300µL de NaOH/SLS, sendo agitados, a mão, de tempos em tempos. Após 15 minutos no gelo, foram adicionados 225µl de acetato de potássio com ácido acético, sendo agitados, a mão, algumas vezes, permanecendo em gelo por 10 minutos.

As amostras foram centrifugadas por 1 hora a 4°C a 4.000rpm, sendo colocadas em seguida no gelo. O sobrenadante foi recuperado em tubos eppendorf de 1,5mL e o mesmo volume de isopropanol gelado foi adicionado. Os tubos foram invertidos 2-3 vezes e deixados a -20°C por pelo menos 30 minutos. Após isso, foram centrifugados por 1 hora a 6.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 600µl de etanol 70% gelado (estocado previamente a -20°C). Os tubos foram centrifugados rapidamente e repetiu-se esta etapa por mais 2 vezes. O etanol foi novamente descartado e os tubos foram deixados a temperatura ambiente, sobre uma toalha de papel, para secar. Após secos, cerca de 20 minutos, foram colocados a 37°C por 15 minutos.

Cerca de 20µl de TE foi adicionado em cada amostra (tubo), e deixado por pelo menos 1 hora na geladeira (ou overnight), para que houvesse uma melhor diluição do precipitado. Depois de diluídos, os 'minipreps' foram testados para verificar a qualidade e a quantidade de DNA puro.

## Anexo 2 – Capítulo 2

Etapas da extração do DNA e do AFLP do Capítulo 2.

### 1. Extração de DNA

#### Tampão A

0,35M	Sorbitol	6,38 g.
0,20M	Tris-HCl (estoque a 1M)	20 mL.
40mM	EDTA	1,49 g.
2%	PVP	2 g.
-	Água MiliQ q.s.p.	Completar para 100mL

Acrescentar o PVP no momento do uso.

#### Tampão B

1,5M	NaCl	8,77g.
2%	MATAB	2g.
3%	Sarcosil (estoque a 5%)	9,5mL.
1%	Bissulfito de Sódio	1g.
0,2M	Tris-HCl (estoque a 1M)	20mL.
40mM	EDTA	1,49g.
-	Água MiliQ	Completar para 100mL

O tampão B é viscoso e durante o preparo deve ser mantido sob agitação e aquecimento (cerca de 40°C). Preparar o tampão antes e deixá-lo repousar na geladeira. Retirar 30 minutos antes de começar a extração e colocá-lo a 65°C até o momento do uso. Os dois tampões podem ser misturados no momento do uso e em seguida acrescentar o PVP.

#### Extração

Após a extração, conforme descrito na tese, procedeu-se as etapas de tratamento com RNase, a purificação e por fim a quantificação do DNA em gel.

#### Tratamento com RNase

Ressuspender o DNA em cerca de 100µL de TE e acrescentar 10µL de RNase (10mg/µL). Depois de dissolvido o pellet, colocar a 37°C por 30 minutos e em seguida a 65°C por 5 minutos, ao terminar, colocar na geladeira até o próximo passo.

## Purificação e Quantificação

Após a etapa da RNase, efetuaram-se os processos de purificação, seja por meio de colunas, seja por meio de métodos tradicionais de purificação. Para este último método, foi acrescentado a cada tubo mais 100µL de TE, 100µL de água, 100µL de NaCl 5M e 100µL de EDTA 0,5M. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em gelo por 30 minutos. Centrifugou-se por 5 minutos a velocidade máxima. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e acrescentou-se 1,5 vez o volume de isopropanol gelado. Deixou-se a -20°C por 30 minutos, centrifugando-se a 14.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com álcool 70%. Depois de seco, o pellet foi diluído em 60µL de TE. A qualidade do DNA foi testada em gel de agarose 1%. Fez-se a diluição para a concentração de uso e o concentrado foi armazenado a -20°C.

## 2. AFLP

### 2.1. Digestão do DNA

Preparou-se e distribuiu-se a mistura de digestão em tubos de 0,5mL e a ele foi acrescentado 250ng (5µL se possível) de DNA.

<b>Solução</b>	<b>Concentração Inicial</b>	<b>Concentração Final</b>	<b>1 tubo</b>
5X reaction buffer	50mM Tris-HCl (pH7,5) 50mM Mg-acetato 250mM K-acetato	10mM Tris-HCl (pH7,5) 10mM Mg-acetato 50mM K-acetato	2,5µl
<i>EcoRI</i> (25U/µl)	50ng	250ng	0,06µl
<i>MseI</i> (5U/µl)	1,25 U/µl de cada (diluídos em tampão)	2,5 U cada	0,32µl
DNA	50ng	250ng	5µl
Água			4,62µl
<b>Volume total</b>			<b>12,50 µl</b>

Os reagentes foram misturados delicadamente e centrifugados em seguida. O tubo foi incubado a 37°C por 3 horas. Agitou-se de uma em uma hora. Inativou-se as enzimas a 70°C por 15 minutos e colocou-se o tubo em gelo imediatamente, sendo centrifugados em seguida. Verificou-se a digestão do DNA e 2,5µl do DNA digerido foi aplicado em gel de agarose 1%. Foi utilizado uma solução com 2µL de corante, 2,5µL de água e 2,5µL do produto de digestão.

## 2.2. Ligação dos Adaptadores

Preparou-se uma mistura com os reagentes abaixo citados e adicionou-se os 10 $\mu$ l restantes do DNA digerido:

Solução	Concentração inicial	Concentração final	1 reação
Solução de Adaptação/Ligação	Adaptadores Eco/Mse 0,4 mM ATP 10mM Tris-HCl (pH7,5) 10mM Mg-acetato, 50mM K-acetato	Adaptadores Eco/Mse 0,2 mM ATP 5,3mM Tris-HCl (pH7,5) 5,3mM Mg-acetato, 26,7mM K-acetato	12,0 $\mu$ l
T4 DNA ligase (3U/ $\mu$ l)	3U/ $\mu$ l	1U	0,33 $\mu$ l
DNA digerido			10,0 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>			<b>22,3<math>\mu</math>l</b>

Os 12,3 $\mu$ l da mistura foram colocados em cada tubo e centrifugados brevemente. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 3 horas sendo agitados de uma em uma hora. **OBS:** O material pode ser armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Preparação dos adaptadores:

<b>Adaptator Eco RI :</b>	
Oligo 1 Eco RI 100ng/ $\mu$ L	17 $\mu$ L
Oligo 2 Eco RI 100ng/ $\mu$ l	15 $\mu$ L
Tampão ligase 5X Gibco	12 $\mu$ L
Água para AFLP	<u>16<math>\mu</math>L</u>
	<b>60<math>\mu</math>L</b>

<b>Adaptator Mse I:</b>	
Oligo 1 Mse I 1 $\mu$ g/ $\mu$ L	16 $\mu$ L
Oligo 2 Mse I 1 $\mu$ g/ $\mu$ L	14 $\mu$ L
Tampão ligase 5X Gibco	12 $\mu$ L
Água para AFLP	<u>18<math>\mu</math>L</u>
	<b>60<math>\mu</math>L</b>

Os adaptadores foram aquecidos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e deixados esfriar a temperatura ambiente.

## 2.3. Reação de Pré-Amplificação

Após a ligação, as amostras foram diluídas 10 vezes em água. Em um tubo de PCR de 0,2 ml adicionou-se os seguintes reagentes:

<b>Reagentes</b>	<b>1 tubo</b>
Pré-ampli EcoRI 75ng/μl	0,55μl
Pré-ampli MseI 75ng/μl	0,55μl
Tampão 10X + Mg	2,50μl
dNTP 2,5mM	2,20μl
Taq DNA polimerase 5U/μL (Promega)	0,30μl
Água para AFLP	16,40μl
DNA da ligação (1/10)	2,50μl
<b>Volume total</b>	<b>25μl</b>

Em cada tubo de pré-amplificação colocou-se 2,5μl do DNA da ligação e em seguida os 22,5μl da mistura. As amostras foram amplificadas em termociclador utilizando para isso 23 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após a pré-amplificação, os tubos foram armazenados a 4°C até o momento do uso. Diluiu-se 20 vezes o material pré-amplificado para ser usado na próxima etapa.

**OBS:** O material não utilizado na próxima etapa deve ser armazenado a -20°C.

#### 2.4. Reação de Amplificação

Como o material a ser utilizado nesta fase já foi diluído, diluir o primer Eco escolhido: 18,0μl de primer Eco em 32,0μl de água destilada. Após o primer diluído, em um tubo de 0,2 ml adicionou-se os seguintes reagentes:

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração inicial</b>	<b>1 reação</b>
10 X PCR buffer + Mg	200mM Tris-HCl (pH 8,4) 15mM MgCl <sub>2</sub> 500mM KCl	2μl
Primer Eco diluído	25ng/μl	0,30μl
Primer Mse diluído	50ng/μl	0,90μl
dNTPs	10mM	2,20μl
Taq	5U/μl	0,10μl
Água		9,5μl
DNA pré-amplificado		5μl
<b>TOTAL</b>		<b>20μl</b>

Os DNAs foram amplificados utilizando o seguinte ciclo: 1 ciclo de 94°C por 30 segundos, seguido de 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Abaixar 0,7°C da temperatura de anelamento a cada ciclo, durante 12 ciclos. Efetuou-se mais 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos.

Depois de amplificado, este material ficou na geladeira até o momento da desnaturação com formamida. **OBS:** O material pode ser armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.1. Denaturação da Amplificação

Após a etapa da amplificação, adicionou-se  $8\mu\text{l}$  de azul de formamida em cada reação, sendo esta desnaturada por 3 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$  e colocadas em seguida em gelo. Aplicou-se  $6\mu\text{l}$  de cada reação em gel de poliacrilamida e  $4\mu\text{l}$  de marcador.

##### Azul de Formamida

Formamida 98%	49mL
EDTA 10mM	186mg
Azul de bromofenol 0,3%	150mg
Xileno cianol	1 pitada
<b>Total</b>	<b>50mL</b>

##### Gel de Poliacrilamida

A limpeza prévia das placas é muito importante. Ambas foram lavadas com detergente neutro e enxaguadas com água destilada (excesso de detergente provoca “background”). O gel foi preparado pelo menos 2 horas antes da migração (máximo de tempo que ele pode ser preparado é 24 horas antes do uso). Para um gel de acrilamida a 6%, utilizou-se:

<b>Soluções</b>	<b>Volume</b>
Solução de Acrilamida 6%	70ml
Persulfato 10%	$350\mu\text{L}$
Temed	$70\mu\text{L}$
<b>Volume total</b>	<b>70mL</b>

##### Solução de acrilamida 6%

Uréia 7,5M	225g
Bis-acrilamida 40%	75mL
TBE 10X	100mL
Água	completar para 500mL.

Em um béquer foi colocado a uréia, o TBE e cerca de 15ml de água (o suficiente para cobrir a uréia). Esta solução foi agitada até dissolver. A solução foi acondicionada no escuro e em geladeira. Armazenar por no máximo 6 meses.

### **Persulfato 10%**

Persulfato	0,1g
Água estéril	1mL

## **PREPARO DAS PLACAS**

### **Placa maior**

Passou-se etanol três vezes na face interna da placa maior, deixando secar por alguns minutos. Em um eppendorf de 1,5 ml colocou-se: 1,1 ml de solução de etanol 95% com 0,5% de ácido acético mais 2,2 µl de *bind silane*. A solução de *bind silane* foi aplicada na placa maior, usando lenço de papel. Deixou-se secar por 10 minutos e a limpeza desta placa com etanol foi feita uma vez.

### **Placa menor**

Passou-se etanol na face interna da placa menor, certificando-se de que a placa ficou limpa. Depois de seca, embebeu-se um lenço de papel com *sigmacote*, a qual foi passada em toda a superfície da placa. Deixou-se secar por cerca de 10 minutos, limpando 3 vezes a placa com etanol.

### **Montagem das placas**

Juntou-se as placas e os espaçadores (4mm) utilizando para isso a borracha de montagem e as pinças. Colocou-se a placa maior com o lado tratado com *bind silane* voltado para cima, alinhou-se os espaçadores ao lado e colocou-se a placa menor com o sigmacote voltado para baixo sobre a placa maior. A borracha de montagem foi colocada ao redor e presa com as pinças.

O gel foi vertido entre as placas, evitar a formação de bolhas de ar entre as placas. Assim que o gel for vertido, colocou-se o pente no topo do gel, com a extremidade reta encostando no gel a uma profundidade de 2 a 3mm. Deixou-se polimerizar o gel por no mínimo 2 horas (o ideal é preparar o gel no dia anterior), deixando as placas levemente inclinadas.



## **2.5. Pré-Eletroforese**

Antes de aplicar as amostras, fez-se uma pré-eletroforese por 30 minutos à 120W (2300V, 55mA).

## **2.6. Eletroforese**

Depois de aplicadas as amostras, a fonte foi regulada a 70 Watts e as amostras permaneceram migrando por cerca de 2 horas.

## **2.7. Coloração com Prata**

As soluções de fixação, coloração e revelação foram preparadas 2 horas antes do uso e armazenadas no freezer (fazer isso durante a pré-eletroforese). As placas foram separadas de forma que o gel permanecesse aderido a placa maior. O gel foi colocado em uma bandeja com a solução de fixação e deixado sob agitação por 30 minutos. Retirou-se o gel e esta solução foi novamente armazenada no freezer para ser reutilizada na última etapa.

O gel foi lavado 3 vezes por 3 minutos em água destilada, usando o agitador orbital. Retirou-se o gel para escorrer por 10 a 20 segundos. Colocou-se o gel na bandeja e a solução de coloração foi acrescentada. Agitou-se por 30 minutos. Lavou-se rapidamente o gel em água destilada, submergindo-o por 5 a 10 segundos (não lavar mais que isto). O gel foi retirado da bandeja e colocado verticalmente. Colocou-se 1 litro da solução de revelação, colocando-se o gel em seguida e agitando-o manualmente até que as bandas começassem a aparecer. Acrescentou-se o restante da solução e manteve-se o gel sob agitação até que as bandas estivessem bem visíveis. Após esta etapa, acrescentou-se 1 litro da solução de fixação (armazenada inicialmente) para parar a revelação e agitou-se por 2-3 minutos. O gel foi então lavado duas vezes por 2 minutos cada em água destilada sob agitação. Deixou-se secar o gel.

- **Solução de Fixação**

Colocar em béquer de 2 litros, 200 ml de ácido acético glacial e 1800 ml de água destilada. Agitar e armazenar no freezer por aproximadamente 90 min. Antes do uso, agitar para quebrar o gelo.

- **Solução de Revelação**

Colocar em béquer: 2000 ml de água e 60g (1 pacote) de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Agitar e armazenar no freezer por aproximadamente 90 min. Antes do uso, agitar para quebrar o gelo. Imediatamente antes do uso, adicionar 3 ml (1 via) de formaldeído 37% e 400 $\mu\text{l}$  de tiosulfato de sódio.

- **Solução de Coloração**

Colocar em béquer: 2000 ml de água, 2g (1 pacote) de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e 3 ml (1 via) de formaldeído 37%. Agitar e armazenar no freezer por aproximadamente 90 min. Após o uso, descartar a solução em frasco contendo cloreto de sódio (10g NaCl/2L de solução de prata), para precipitar o nitrato de prata.

### **Lavagem das Placas**

Depois de ter analisado e registrado o gel, lavar as placas utilizando 2 litros de NaOH 3%. Retirar o gel com a ajuda de uma espátula de plástico e lavar a placa com detergente neutro 2%. Enxaguar com água corrente e em seguida em água destilada. Deixar secar e limpar com etanol 70%.

### Anexo 3 – Capítulo 3

#### Metodologia empregada no Capítulo 3.

O material utilizado consistiu de uma biblioteca de cDNA de café extraído de folhas de Caturra (*Coffea arabica* L.) infectadas pelo fungo *Hemileia vastatrix*. As folhas foram coletadas após 18 horas de inoculação.

#### Sondas utilizadas

Para a triagem do banco de cDNA, utilizou-se nove sondas do tipo RGA para cada família de A à I. O número dos acessos dos 9 RGAs de café utilizados como sondas e depositados na EMBL, bem como a família de RGA a qual cada um pertence são: AJ298883 (CrgaA1), AJ298885 (ArgaB1), AJ298886 (ArgaC1), AJ298887 (CrgaD1), AJ298888 (CrgaE1), AJ298889 (CrgaF2), AJ298891 (ArgaG1), AJ298893 (CrgaH1) e AJ298895 (ArgaI1). Estas famílias de RGAs estão de acordo com o trabalho de Noir et al. (2001).

#### Triagem da biblioteca de cDNA

Foi utilizada uma solução fágica (com cDNA) inicial, diluído à  $1 \times 10^9$  pfu/ml, ou seja,  $1 \times 10^6$  pfu/ $\mu$ L.

#### Avaliação primária

Uma cultura de bactérias 'XL1 Blue' foi colocada para crescer a 37°C em agitação constante por cerca de 8 horas ou até que a DO (coeficiente óptico) atingisse 2, ou no mínimo 1,5 a 600 nm. Essas bactérias foram inoculadas a partir de uma colônia ou a partir de 150 $\mu$ L de uma pré-cultura de bactérias (15mL LB + 10mM de MgSO<sub>4</sub> + 0.2% de Maltose), a qual continha, além do meio LB líquido, 150 $\mu$ L de uma solução estoque de MgSO<sub>4</sub> a 1M e 150 $\mu$ L de uma solução estoque de Maltose 20%.

Algumas placas de Pétri (quadradas) de 12x12cm contendo meio de cultura NZY MgSO<sub>4</sub> foram preparadas. Estas placas foram colocadas em uma estufa a 37°C, onde permaneceram até o momento do uso. Após 8 horas de cultivo (crescimento), centrifugou-se a cultura de bactérias por 5 minutos a 1.500g a uma temperatura de 4°C, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado cerca de 7,5mL de MgSO<sub>4</sub> 10mM. Em alguns casos o volume acrescentado foi de acordo com o número de placas a serem feitas.

Adicionou-se para cada placa de 12x12cm 500 $\mu$ L desta cultura bacteriana acrescida de 2 $\mu$ L da solução fágica contendo o cDNA. Fez-se uma diluição (100 vezes) desta solução fágica inicial em uma solução Lambda 1X, antes de acrescentá-la à cultura. Para isso, diluiu-se 10 $\mu$ L da solução fágica inicial em 1mL de Lambda 1X. Deste total, pipetou-se 2 $\mu$ L por placa. Para esta diluição e no caso de 5 placas feitas, testou-se cerca de 100 mil fagos. No entanto, antes de verter esta solução em cada placa, seguiu-se uma outra etapa. Em um tubo eppendorf, adicionou-se aos 500 $\mu$ L de cultura previamente feita, os 2 $\mu$ L da solução fágica diluída, por placa, e incubou-se por 15 minutos a 37°C (estufa seca), sem agitação para que houvesse uma maior integração (ligação) entre a solução bacteriana e a solução fágica.

Adicionou-se esta solução bacteriana e fágica (500 $\mu$ l + 2 $\mu$ l = 502 $\mu$ l, respectivamente) à 5mL de meio LB Top-Agarose, homogeneizada por inversão e em seguida verteu-se nas placas, sob o meio de cultura inicial. Este meio LB Top-Agarose é líquido e deve estar a uma temperatura de cerca de 45°C, pois caso esteja muito quente, a mistura de bactérias e fagos será danificada, e se estiver muito frio, ao ser vertido sobre as placas endurecerá muito rápido e formará grumos de agarose. Deixou-se secar por 10 minutos e incubou-se por uma noite a 37°C.

Deixou-se as placas a 4°C, por pelo menos 1h. Durante este período, recortou-se as membranas de nitrocelulose (Amersham Hybond N+) de 10x11cm e estas foram enumeradas de acordo com o número de placas feitas. Preparou-se as soluções a serem utilizadas para a impressão da cultura na membrana (com água milliQ):

- Denaturação: NaOH (0,5M) e NaCl (1,5M).
- Neutralização: NaCl (1,5M) e Tris-HCl (0,5M pH 8,0).
- Lavagem: SSC 2X (a partir de solução estoque SSC 20X (NaCl 3M, Citrato de Sódio Bi-Hidratado 0,3M)).

Para fazer a impressão da cultura em cada membrana, procedeu-se da seguinte forma:

Retirou-se a placa da geladeira no momento do uso e colocou-se a primeira membrana por 2 minutos sobre o meio de cultura da placa (membrana A1). Repetiu-se esta impressão com uma nova membrana, por 3 minutos (membrana B1). Esta etapa foi repetida conforme o número de placas a serem fixadas. Após cada impressão, efetuou-se os procedimentos de lavagem e fixação das membranas.

- **Denaturação:** Colocou-se a membrana sobre a solução de denaturação por 30 segundos, sendo em seguida imersa por 5 minutos.
- **Neutralização:** Deixou-se por 5 minutos nesta solução.
- **Lavagem:** Lavou-se rapidamente a membrana nesta solução de SSC 2X, cerca de 5-10 segundos.

Após cada etapa de lavagem, a membrana foi colocada para secar sobre um papel filtro (Whatman 3MM), onde ficou até o momento de ser fixada. Nesta etapa deve-se ter a certeza que as membranas estão completamente secas. As membranas foram fixadas no Crosslinker (forno de UV) a  $1,2 \times 10^5 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ . Este processo é fundamental, pois é nesta etapa que fixamos o DNA a ser analisado à membrana. Depois de fixadas, pode-se deixar as membranas guardadas até o momento necessário para efetuar os procedimentos de pré-hibridização e hibridização. Após estas etapas, procedeu-se com a lavagem dos tubos utilizados na Hibridização.

#### Procedimento de Lavagem dos Tubos

Lavou-se os tubos que foram utilizados para a hibridização com uma solução de HCl (0,5M) por 5 a 10 minutos. Estes tubos ficaram sob agitação no forno que utilizado para a hibridização, à temperatura ambiente. Este passo foi necessário devido ao excesso de cálcio na água da França. Após a lavagem com HCl, lavou-se novamente os tubos, com água destilada (livre de calcário) e ficaram em estufa para secar até o momento do uso.

#### Southern

Após secas e fixadas no forno de UV, colocou-se as membranas nos tubos e efetuou-se os procedimentos de pré-hibridização e hibridização.

Solução de pré-hibridização e hibridização		
Solução final dos componentes	Concentração das soluções iniciais	Preparação para 1 membrana (20mL)
Denhardt 5X	50X	2mL
SSC 6X	20X	6mL
SDS 0,5%	10%	1mL
Esperma de Salmão 1mg/mL	10mg/mL	0,2mL (após denaturação)
Água qsp. 20mL	-	10,8mL

Aqueceu-se a solução de pré-hibridização (sem o esperma de salmão) por 10 minutos à 65°C. Durante este tempo, o esperma de salmão a ser utilizado foi denaturado por 10 minutos à 95°C e em seguida, acrescentado à solução.

Deixou-se pré-hibridizar, por no mínimo, 3 horas à 65°C, para que houvesse uma maior interação e contato da solução de pré-hibridização com a membrana. Após a pré-hibridização, retirou-se uma pequena alíquota (alguns mL) da solução e adicionou-se a esta a sonda marcada, previamente denaturada. Deixou-se hibridizar por toda a noite à 65°C sob rotação constante em um forno de hibridização.

### Preparação da Sonda

A sonda foi preparada conforme descrito no manual do KIT Megaprime DNA labelling systems (RPN 1604) da Amersham. Para isso, fez-se as seguintes etapas:

1. Diluiu-se o DNA (da sonda) concentrado em água ou TE a 5ng/μL.
2. Com exceção da enzima e do dCTP marcado, todos os outros reagentes foram colocados a temperatura ambiente.
3. Retirou-se 25ng ou 5μL do DNA diluído e a ele foi acrescido, em um tubo pequeno estéril, 5μL dos primers. Esta mistura foi denaturada por aquecimento a cerca de 95-100°C por 5 minutos em banho-maria. Nesta etapa, utilizou-se como sonda em algumas vezes, um fragmento extraído de gel de agarose. Neste caso, colocou-se o tubo contendo este fragmento de gel em banho-maria por 30-60 segundos para que a agarose fundi-se, e desta agarose retirou-se 15μL, o qual foi submetido ao mesmo procedimento do DNA diluído. Nesta etapa, não pode ser ultrapassado os 25μL.
4. Centrifugou-se rapidamente este tubo, para que não houvesse sonda na tampa e nas paredes do tubo.
5. Deixou-se o tubo a temperatura ambiente e a acrescentou-se os nucleotídeos (exceto o nucleotídeo marcado radioativamente), o tampão de reação 10X, água para completar o volume e a enzima, conforme a tabela abaixo:

Componente	Volume (μL)
DNA + primers	5* + 5
DATP	4
DTTP	4
DGTP	4
Tampão de reação 10X	5
Enzima	2
Água	16*

Volume Total (sem dCTP <sup>32</sup> )	45
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP	5
<b>Volume Final</b>	<b>50</b>

\* DNA+primers : o volume pode variar se o material utilizado foi a partir do DNA concentrado diluído ou de um fragmento de gel de agarose. Nesta caso, como o volume utilizado com o gel foi de 15 $\mu$ L, diminuiu-se o volume na água (6 $\mu$ L).

6. Centrifugou-se o tubo contendo todos os reagentes e acrescentou-se o dCTP marcado. Centrifugou-se novamente o tubo.

7. Para a marcação da sonda, esta solução foi incubada a 37°C por 10 minutos. No caso do DNA extraído do gel de agarose, incubou-se por cerca de 25 minutos a 37°C. Este procedimento foi necessário pois no caso da agarose, incubações mais prolongadas são muito mais eficientes e melhoram a marcação da sonda.

8. Após a incubação a 37°C e no caso de utilização da sonda para hibridização, denaturou-se ainda o DNA marcado por 5 minutos a 95-100°C, em seguida acrescentou-se 5 $\mu$ L de EDTA (0,2M) para parar a reação e colocou-se em gelo, para que não houvesse renaturação do DNA denaturado.

9. Após a última etapa da marcação da sonda, acrescentou-se 15-20 $\mu$ L da sonda marcada ao tubo contendo as membranas a serem hibridizadas.

OBS : Esta sonda marcada, pode ser armazenada a -20°C por alguns dias.

### **Lavagem das membranas após a hibridização**

Após a hibridização, retirou-se os tubos contendo as membranas marcadas, descartou-se a solução contendo a sonda marcada radioativamente em um recipiente próprio para descarte de material radioativo marcado com  $\alpha$ -P<sup>32</sup> para posterior descarte, e procedeu-se com as etapas de lavagem das membranas. Esta etapa é fundamental, pois se lavarmos muito as membranas, não haverá sinal suficiente para marcação do filme, tornando assim difícil a análise dos spots (colônias) marcados e, no caso de lavagem insuficiente, o sinal será muito forte, deixando um background grande, dificultando a interpretação das colônias marcadas.

Para cada etapa de lavagem, utilizou-se 50mL de cada solução :

1. Primeira lavagem : SSC 2X + SDS 0,1% – feita à temperatura ambiente por 10 minutos.

2. Segunda lavagem : SSC 1X + SDS 0,1% – feita também à temperatura ambiente por 10 minutos. Verificou-se com o contador Geiger o número de CPM e se necessário, efetuar a 3ª lavagem.

3. Terceira lavagem : SSC 0,5X + SDS 0,1% – esta lavagem é feita no forno de hibridização à 65°C por até 10 minutos.

### **Exposição das membranas**

Depois de lavadas, as membranas foram envoltas em filme PVC. As membranas foram presas com fita adesiva ao cassete de revelação (face hibridizada para cima). Mediu-se novamente a radioatividade com o contador Geiger para calcular o tempo de exposição do filme à membrana. Em uma sala apropriada, colocou-se o filme sobre a membrana no cassete, tendo atenção especial para a orientação da membrana e do filme. Uma das pontas do filme foi marcada para recuperarmos posteriormente a orientação de cada placa (membrana) exposta no filme dentro do cassete. Deixou-se no freezer -80°C até o momento da revelação. O tempo da exposição dependeu do sinal e variou de algumas horas a alguns dias. Quando utilizou-se sondas que estavam armazenadas há alguns dias, a exposição foi de até 1 semana. Após o tempo de exposição, retirou-se o cassete do freezer -80°C cerca de 30 minutos antes da revelação, deixando-o à temperatura ambiente.

### **Revelação dos Filmes**

As revelações dos filmes foram feitas manualmente.

### **Avaliação secundária – Recuperação e Diluição dos Fagos**

Após a comparação dos ‘spots’ dos filmes com as colônias das placas, recuperou-se do meio de cultura os fagos marcados e selecionados. Além do mesmo, recuperou-se também cerca de 3 a 4 fagos ao redor do fago principal. Esta precaução foi tomada pois, caso houvesse incerteza quanto a localização exata do fago ou ainda, caso estivessem muito próximos uns dos outros, não haveria risco de perda do fago marcado.

Diluiu-se cada fago recuperado em 1mL de solução lambda 1X (tubos estéreis de 1,5mL) e, quando necessário, efetuou-se diferentes diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ), a fim de separar ainda mais os fagos. Colocou-se novamente as placas de Petri preparadas com meio NZY–MgSO<sub>4</sub> à 37°C até o momento do uso. O número de placas dependeu sobretudo do número de fagos recuperados. Fez-se novamente uma



cultura com as bactérias 'XL1 Blue' (DO igual a 2, ou no mínimo 1,5 à 600 nm) e centrifugou-se esta cultura por 5 minutos a 1.500g a 4°C. Diluiu-se o precipitado em 7,5mL de MgSO<sub>4</sub> (10mM).

Misturou-se em um tubo estéril, 500µL desta solução bacteriana de XL1 Blue com 2µL da solução fágica (fagos recuperados e diluídos anteriormente). Incubou-se esta mistura à 37°C por 15 minutos. Colocou-se esta mistura de bactérias e fagos em cada placa, tentando colocar o mínimo de fagos possível por placa, para que os fagos restassem mais separados e fosse mais facilmente recuperados e diferenciados.

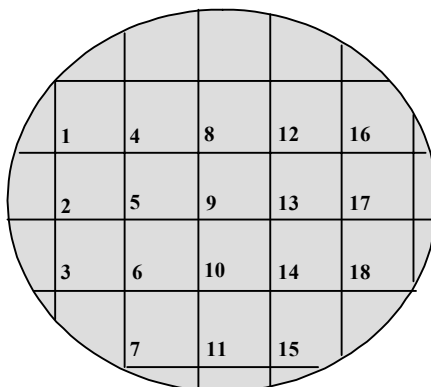
Acrescentou-se estes 502µL de solução (bactéria-fago) a 5mL de meio LB Top Agarose, homogeneizou-se por inversão e verteu-se sobre as placas de Petri previamente deixadas à 37°C. Deixou-se secar por cerca de 10 minutos e incubou-se por uma noite à 37°C, sem agitação.

Efetuuou-se os mesmos procedimentos (etapas) da avaliação primária. Após a revelação do filme, recuperou-se novamente das placas as colônias marcadas e efetuou-se uma última avaliação.

### Avaliação terciária

Colocou-se em cultura as bactérias XL1 Blue e centrifugou-se por 5 minutos a 1500g à 4°C. Diluiu-se o precipitado em 7,5mL de MgSO<sub>4</sub> (10mM). Colocou-se as placas de Petri preparadas com meio NZY MgSO<sub>4</sub> a 37°C até o momento do uso. Acrescentou-se 500µL da solução bacteriana XL1 Blue (sem os fagos) a 5mL de NZY TOP-Ágar. Verteu-se sobre o meio NZY-MgSO<sub>4</sub> e deixou-se secar por 10 minutos. Em seguida, aplicou-se 1µL das diferentes diluições de cada placa de lise\* sobre o TOP Ágar seco e deixou-se em estufa a 37°C por 1 noite, conforme o esquema abaixo.

\*A partir das placas de lise isoladas (recuperadas em 350µL), efetuou-se 1 ou 2 diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ).



Após as colônias selecionadas serem plotadas, procedeu-se da mesma forma que as etapas anteriores. Fez-se duas membranas de cada placa e marcou-se radioativamente com a sonda. Após a revelação do filme, comparou-se o filme com a placa para verificar quais fagos estavam marcados. A partir desta seleção, fez-se um miniprep para cada fago marcado e selecionado.

### **Mini-Prep**

A partir do kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” da Promega, foi feito o isolamento e a purificação do DNA plasmidial. Pode-se dividir este procedimento em 3 etapas:

#### **1. Culturas de células de *E. Coli*.**

Inoculou-se em 5mL de meio LB líquido contendo antibiótico (cloranfenicol a 12,5µg/mL e kanamicina a 25µg/mL) uma colônia recuperada de um meio LB Top-Ágar (contendo os mesmos antibióticos). Incubou-se por uma noite (15-16 horas) a 37°C sob agitação. O tempo de incubação foi otimizado para aumentar a produção de DNA plasmidial em um dado volume de cultura.

#### **2. Produção do lisado claro**

Centrifugou-se os 5mL de cultura bacteriana por 5 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi descartado e o excesso de meio líquido foi removido. A este precipitado foi adicionado 250µL de solução de ressuspensão celular, ressuspensando o pellet por pipetagem e/ou agitação em vórtex. Após ressuspensão, transferiu-se a solução para um tubo eppendorf de 1,5mL estéril. Adicionou-se mais 250µL de solução de lise celular e misturou-se por inversão o tubo (cerca de 4 vezes, não utilizar vórtex nesta e nas próximas etapas). Incubou-se por cerca de 3 minutos, ou até que a suspensão celular estivesse clara, não mais do que 5 minutos.

Adicionou-se em seguida 10µL de solução de protease alcalina e misturou-se o tubo por inversão cerca de 4 vezes. Incubou-se por 5 minutos (a protease alcalina inativa as endonucleases e outras proteínas surgidas durante o processo de lise das células bacterianas e que possam afetar a qualidade do DNA isolado). Adicionou-se 350µL de solução de neutralização Wizard Plus® SV e misturou-se o

tubo por inversão. Centrifugou-se o lisado bacteriano a velocidade máxima por 10 minutos a temperatura ambiente. Não descartar o sobrenadante.

### **3. Isolamento e purificação do DNA plasmidial.**

As primeiras colunas foram colocadas em tubos coletores de 2mL (um para cada coluna). Transferiu-se o sobrenadante (cerca de 850 $\mu$ L) para a primeira coluna. Centrifugou-se o sobrenadante a velocidade máxima por 1 minuto a temperatura ambiente. Retirou-se a coluna do tubo coletor (2mL) e descartou-se a solução deste tubo, voltando em seguida com a coluna para o tubo coletor. Adicionou-se à coluna 750 $\mu$ L de solução de lavagem (previamente diluída em etanol 95%). Centrifugou-se novamente a coluna por 1 minuto a temperatura ambiente em velocidade máxima. Repetiu-se novamente a última etapa, mas desta vez colocou-se apenas 250 $\mu$ L de solução de lavagem na coluna. Centrifugou-se por 2 minutos a temperatura ambiente e velocidade máxima. Descartou-se o tubo coletor com a solução.

Transferiu-se a coluna para um tubo de 1,5mL novo e estéril. Para a eluição do DNA plasmidial da coluna, adicionou-se 50 $\mu$ L de água livre de nuclease à coluna e centrifugou-se por 1 minuto a velocidade máxima e temperatura ambiente. Descartou-se a coluna e armazenou-se a -20°C o tubo contendo o DNA plasmidial até o momento do uso.

### **Sequenciamento**

Depois de obtido o DNA plasmidial puro, quantificou-se em gel para verificar se havia quantidade de DNA mínima para o sequenciamento. Depois de verificada e confirmada a quantidade necessária, o DNA plasmidial foi enviado para sequenciamento em Evry, França.