



TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Arachis*

Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo¹, Jonatas Chagas de Oliveira², Adna Cristina Barbosa de Sousa³, Giselle Mariano Lessa de Assis⁴, Tatiana de Campos⁴

¹Discente Rede Bionorte do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos genéticos. Bolsista CAPES. e-mail: hellenfreires@gmail.com; ²Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia-UFAC. Bolsista CAPES. e-mail: jonatasufac@gmail.com; ³Docente da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. e-mail: adnacsousa@gmail.com; ⁴Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Acre. e-mail: giselle.assis@embrapa.br; tatiana.campos@embrapa.br

1 **RESUMO:** O objetivo do estudo foi verificar a transferibilidade de marcadores
2 microssatélites em diferentes espécies do gênero *Arachis*. A avaliação e a caracterização
3 genética do germoplasma são atividades primordiais na conservação e na utilização dos
4 recursos genéticos. Foram avaliados 145 acessos do Banco ativo de germoplasma da Embrapa
5 Acre. Foram testados quatro locos desenvolvidos com base em sequências específicas para *A.*
6 *hypogaea* (Ah), dez locos para *A. pintoi* (Ap) e três para *A. glabrata* (Ag). Dentre os 17 locos
7 testados, 10 (58,8%) foram polimórficos. Os locos Ah282, Ah6-125, Ah7 e Ag39
8 apresentaram 100% de transferibilidade para os acessos de *A. repens*. No presente estudo,
9 verificou-se que independentemente da espécie (*A. hypogaea*, *A. glabrata* ou *A. pintoi*) a
10 partir da qual o loco foi desenvolvido, todos os locos utilizados foram amplificados nas
11 diferentes espécies estudadas. Os marcadores microssatélites foram eficientes e existe
12 potencial de transferibilidade dentro do gênero *Arachis*.

13 **Palavras-chave:** amendoim forrageiro, conservação, marcadores SSR

15 TRANSFERABILITY OF MICROSATELLITE MARKERS IN SPECIES 16 OF *ARACHIS* GENUS

17 **ABSTRACT:** The aim of the study was to investigate the transferability of microsatellite markers in
18 different species of *Arachis* genus. The evaluation and genetic characterization of germplasm are
19 essential activities to conservation and utilization of genetic resources. We evaluated 145 accesses the
20 active germplasm bank of Embrapa Acre. Four loci tested were developed based on specific sequences
21 for *A. hypogaea* (Ah) ten loci for *A. pintoi* (Ap) and three for *A. glabrata* (Ag). Among the 17 loci
22 tested, 10 (58.8%) were polymorphic. Loci Ah282, Ah6-125, AH7 and AG39 showed 100%
23 portability for access *A. repens*. In the present study, it was found that regardless of the species (*A.*
24 *hypogaea*, *A. glabrata* or *A. pintoi*) from which the primer to access the locus was developed, all used
25 loci were amplified in different species. The microsatellite markers were efficient and there is
26 potential for transferability within the genus.

27 **KEYWORDS:** forage peanut, conservation, SSR markers



28

29 INTRODUÇÃO

30 As leguminosas forrageiras são relevantes na produtividade das pastagens, incorporando
31 nitrogênio atmosférico ao sistema solo-planta e melhorando a alimentação do rebanho. Entre
32 diversas leguminosas forrageiras, espécies silvestres do gênero *Arachis* (*Arachis pintoi*
33 Krapov. & W.C. Greg., *Arachis repens* Handro e *Arachis glabrata* Benth.) conhecidas como
34 amendoim forrageiro destacam-se pela utilização em pastagens consorciadas e pela alta
35 rentabilidade nos sistemas de produção (ANDRADE et al., 2015).

36 Os marcadores moleculares são ferramentas utilizadas para detectar variações no
37 genoma, possibilitando estimar diversos parâmetros genéticos. Os microssatélites são
38 marcadores codominantes com alto número de alelos e grande heterozigosidade. Apesar da
39 ampla aplicabilidade dos marcadores microssatélites em plantas, seu desenvolvimento
40 permanece como um gargalo para a maioria das espécies, especialmente para aquela com
41 menor valor econômico. A grande limitação deste marcador é a necessidade de serem isolados
42 e desenvolvidos para cada espécie, não sendo possível utilizar a estratégia de desenho de
43 “primers universais” (CAIXETA et al., 2009). No entanto, essa desvantagem é compensada
44 pela facilidade, eficiência e ampla potencialidade de pesquisas desenvolvidas após a sua
45 obtenção.

46 Angelici et al. (2008) utilizaram quinze locos microssatélites, sendo de três diferentes
47 espécies (*A. hypogaea*, *A. pintoi* e *A. glabrata*) no estudo de diversidade genética em acessos
48 da secção *Rhizomatosae*. Verificaram que além da reprodutibilidade dos marcadores
49 microssatélites, outra vantagem que eles apresentam é a possibilidade de transferência entre as
50 espécies pertencentes às diferentes secções (*Arachis*, *Caulorrhizae* e *Rhizomatosae*). Segundo
51 os autores, os marcadores microssatélites utilizados permitiram distinguir as espécies da
52 secção *Rhizomatosae* e a existência de alta variabilidade genética entre os acessos estudados.

53 Existem disponíveis aproximadamente 3.000 marcadores microssatélites desenvolvidos
54 para espécies do gênero *Arachis*. No entanto, a maioria dos marcadores desenvolvidos foram
55 para o amendoim comum (*Arachis hypogaea*). A partir de estudos recentes, 25 locos foram
56 desenvolvidos para *A. pintoi* (PALMIERI et al., 2002; 2005; 2010). Estes locos apresentaram
57 elevados índices de polimorfismo e transferibilidade o que permite sua utilização para estudos
58 genéticos inter e intraespecíficos. O objetivo do estudo foi verificar a transferibilidade de
59 marcadores microssatélites em diferentes espécies do gênero *Arachis*.

60

61 MATERIAL E MÉTODOS

62 O estudo foi realizado com 145 acessos de amendoim forrageiro pertencentes ao Banco
63 Ativo de Germoplasma localizado na Embrapa Acre. Os acessos deste banco são conservados
64 em vasos, em estufa agrícola, e no campo, em parcelas de 4 m². O BAG tem atualmente 84
65 acessos de *A. pintoi* (incluindo as cultivares Amarillo - MG100, Alqueire-1, Belmonte e BRS
66 Mandobi), 23 acessos de *A. repens*, 16 acessos de *A. glabrata* (incluindo as cultivares
67 Florigraze e Arbrook), 1 acesso da espécie *A. helodes*, 17 híbridos interespecíficos e
68 intraespecíficos e 4 acessos ainda sem identificação da espécie.

69

70 Para a extração de DNA, foram coletadas folhas jovens em microtubos de 2 mL. O
71 material foi armazenado em gelo até o momento da extração no Laboratório de Morfogenese
72 e Biologia Molecular (LabMol) da Embrapa Acre. O DNA genômico total foi extraído usando
73 o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994) modificado. O DNA foi quantificado em
74 agarose (1%).

75 Dezessete marcadores microssatélites descritos na literatura por Palmieri et al. (2002),
76 (2005), (2010), Hoshino et al. (2006), Gimenes et al. (2007) foram testados e otimizados
77 quanto à temperatura de anelamento. Desse conjunto, quatro locos foram desenvolvidos com
78 base em sequências específicas para *A. hypogaea* (Ah), dez locos para *A. pintoii* (Ap) e três
79 para *A. glabrata* (Ag).

80 As reações de amplificação dos fragmentos de DNA foram feitas contento 7,5 ng de
81 DNA genômico; tampão 1x; 0,25 mM de dNTP's cada; 0,25 mg/mL de BSA (Albumina
82 Sérica Bovina); 2,0 mM MgCl₂; 0,8 μM de cada iniciador e 1 U de *Taq Polymerase*
83 (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador (Analitikjena). As etapas
84 de amplificação consistiram em: 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1
85 minuto, temperatura de anelamento definida para cada iniciador por 1 minuto a 72 °C, e uma
86 fase final de extensão de 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados
87 em gel de agarose (3%).

88 A eletroforese para genotipagem dos locos foi realizada em gel de poliacrilamida
89 desnaturante (5%). A coloração do gel foi realizada utilizando-se nitrato de prata, segundo o
90 protocolo proposto por Creste et al. (2001). A interpretação dos fragmentos amplificados foi
91 realizada visualmente por meio de comparação com marcador de peso molecular padrão (Life
92 Technologies).

93

94 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

95 Dentre os 17 locos testados 10 (58,8%) foram polimórficos (Tabela 1). Os demais
96 foram monomórficos ou inespecíficos (41,2%) com o mesmo perfil apresentado em estudos
97 anteriores (HOSHINO et al., 2006; ANGELICI et al., 2008; PALMIERI et al., 2010). Na
98 análise com todos os acessos do BAG, observou-se um total de 164 alelos, com fragmentos
99 que variaram de 97 pb (Ah7) a 322 pb (Ap152). O número de alelos variou de 11 (Ag140) a
100 25 (Ap175 e Ag39), com uma média de 16,4 alelos por loco. Na análise por espécie, foram
101 observados 129 alelos nos acessos de *A. pintoii*, 81 em *A. repens* e 77 em *A. glabrata*. O
102 menor número de alelos encontrado para *A. glabrata* pode ser decorrente da genotipagem de
103 apenas 16 acessos da espécie.

104 Palmieri et al. (2010) utilizaram 20 locos microssatélites e encontraram 196 alelos em 33
105 acessos de *A. pintoii* e 10 de *A. repens*, com média de 9,8 alelos por loco. Angelici et al.
106 (2008) encontraram um total de 249 alelos, utilizando 15 locos e 77 acessos da secção
107 *Rhizomatosae*. O maior número de alelos encontrados por esses autores pode estar
108 relacionado ao maior número de locos utilizados.

109 O loco que apresentou a menor transferibilidade foi desenvolvido para *A. hypogaea*
110 (Ah21) e apresentou 81,81% de amplificação nos acessos de *A. repens*.

111

112 **Tabela 1.** Caracterização dos dez locos microssatélites em temperatura de anelamento (Ta);
 113 produto de amplificação em pares de base (pb) e número de alelos por loco para os 145
 114 acessos e para as espécies *Arachis pintoi*, *Arachis repens* e *Arachis glabrata* separadamente.
 115 Embrapa Acre, 2013.

Loco	Ta (°C)	Amplitude Alélica (pb)	Todos os acessos (145)*	Número de alelos		
				<i>A. pintoi</i> (84)	<i>A. repens</i> (22)	<i>A. glabrata</i> (16)
Ah6-125	48,2	170-194	13	12	3	4
Ah7	52,1	97-122	16	14	7	10
Ah 21	57,3	100-135	14	12	8	8
Ah282	55,4	173-202	12	11	6	10
Ap152	58,5	259-322	16	11	8	9
Ap175	55,4	174-230	25	23	12	6
Ap176	50,0	194-246	18	16	12	3
Ag39	52,1	150-190	25	22	17	11
Ag140	57,3	164-191	11	3	4	9
Ag171	48,2	164-196	14	5	4	7
Total			164	129	81	77
Média			16,4	12,9	8,1	7,7

116 *número de acessos utilizados para cada análise; Sequências específicas para *Arachis hypogaea* (Ah), *Arachis*
 117 *pintoi* (Ap) e *Arachis glabrata* (Ag).

118
 119 Os locos Ah282, Ah6-125, Ah7 e Ag39 apresentaram 100% de transferibilidade para os
 120 acessos de *A. repens*. Para a espécie *A. glabrata*, a menor taxa de amplificação (93,75%) foi
 121 verificada nos locos Ah21 e Ap175, e ainda, 100% de transferibilidade para os locos Ah282,
 122 Ah7, Ap152, Ah6-125 e Ap176. Nos acessos de *A. pintoi*, a menor taxa de amplificação
 123 heteróloga (82,14%) foi verificada no loco Ag39, e a maior (98,81%) foi verificada nos locos
 124 Ah6-125 e Ah7. Esses resultados comprovam a eficiência da transferibilidade de marcadores
 125 microssatélites em espécies do mesmo gênero.

126 O estudo realizado por Koppolu et al. (2010), com 101 marcadores microssatélites,
 127 desenvolvidos a partir de sequências de *A. hypogaea*, detectaram uma taxa de
 128 transferibilidade para a secção *Arachis* de 81% e cinco marcadores mostraram 100% de taxa
 129 de amplificação.



130 As sequências microssatélites estão presentes tanto em regiões codificantes como não
131 codificantes e podem ser encontradas no genoma nuclear ou de organelas. O loco Ap176 foi
132 altamente informativo e apresentou 92% de identidade e 90% de similaridade com uma
133 sequência (GW937987.1) de mRNA isolada de uma biblioteca de cDNA de raiz de *A.*
134 *duranensis*. Anteriormente, Palmieri et al. (2010) verificaram que o loco Ap176 apresentou
135 similaridade para a enzima lipoxigenase (41% de identidade, 47% de similaridade). Assim, o
136 loco está intimamente relacionado com a expressão de genes e pode ser classificado como um
137 marcador funcional informativo.

138 A conservação de sítios microssatélites entre espécies ou mesmo entre gêneros torna
139 possível a utilização de marcadores entre espécies relacionadas. Essa característica de
140 transferibilidade é condicionada por homologia de sequências de DNA entre espécies
141 relacionadas. No presente estudo, verificou-se que independentemente da espécie (*A.*
142 *hypogaea*, *A. glabrata* ou *A. pintoii*) a partir da qual o loco foi desenvolvido, todos os locos
143 utilizados foram amplificados nas diferentes espécies estudadas.

144

145 **CONCLUSÕES**

146 Os marcadores microssatélites foram eficientes e existe potencial de transferibilidade
147 dentro do gênero *Arachis*.

148

149 **AGRADECIMENTOS**

150 À Unipasto e FUNTAC pelo apoio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de
151 Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

152

153 **REFERÊNCIAS**

154 ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G. M. L.; FERREIRA, A. S. Eficiência de longo prazo da
155 consorciação entre gramíneas e Leguminosas em pastagens tropicais. *In*: CONGRESSO
156 BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 25, 2015, Fortaleza. **Anais ...** Fortaleza: Dimensões
157 tecnológicas e sociais da Zootecnia: ABZ, 2015.

158

159

160 ANGELICI, C. M. L. C. D.; HOSHINO, A. A.; NÓBILE, P. M.; PALMIERI, D. A.; VALLS,
161 J. F. M.; GIMENES, M. A.; LOPES, C. R. Genetic diversity in section *Rhizomatosae* of the
162 genus *Arachis* (Fabaceae) based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**,
163 v. 31, n. 1, p. 79-88, 2008.

164

165

166 BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2009. v. 2, 585 p.

167

168

169 CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V. Leguminosas tropicais em associação com pastagens.
170 **Archivos de Zootecnia**, v. 57, p. 103-113, 2008.

171



- 172
173 CRESTE, S.; TUMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat
174 polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant**
175 **Molecular Biology**, v.19, p. 299-306, 2001.
176
177
178 GIMENES, M. A. et al. Characterization and transferability of microsatellite markers of the
179 cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biology**, v. 7, 2007.
180
181
182 HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. **Laboratory**
183 **protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**, 2 ed. CIMMYT, México, DF.
184 1994.
185
186
187 HOSHINO, A. A. et al. Heterologous microsatellite primer pairs informative for the whole
188 genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 665-675, march. 2006.
189
190
191 KOPPOLU, R. et al. Genetic relationships among seven sections of genus *Arachis* studied by
192 using SSR markers. **BMC Plant Biology**, p. 10-15. 2010.
193
194
195 MIRANDA, E. M. de; **Fungos micorrízicos arbusculares em amendoim forrageiro**
196 **(*Arachis pinto* Krap. e Greg.)**. 2008. 95 f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciências do
197 Solo) - Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
198 2008.
199
200
201 PALMIERI, D. A. et al. Genetic diversity analysis in the section *Caulorrhizae* (genus
202 *Arachis*) using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Brazil, v. 33, n. 1,
203 p. 109-118, 2010.
204
205
206 PALMIERI, D. A. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from the forage
207 species *Arachis pinto* (Genus *Arachis*). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 551-553, 2002.
208
209
210 PALMIERI, D. A. et al. Novel polymorphic microsatellite markers in section *Caulorrhizae*
211 (*Arachis*, Fabaceae), **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 77-79, 2005.
212