

Transferibilidade de Marcadores Microssatélites Desenvolvidos a partir de RNA-Seq de Amendoim Forrageiro

Jônatas Chagas de Oliveira¹, André Lucas Domingos da Silva², Carla Cristina da Silva³, Anete Pereira de Souza⁴, Eduardo Fernandes Formighieri⁵, Luciéllo Manoel da Silva⁶ e Tatiana de Campos⁷

¹Biólogo, estudante do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Genéticos da Rede Bionorte, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

²Biólogo, estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

³Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

⁴Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Biologia Celular e Molecular, professora da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

⁵Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Funcional e Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁶Engenheiro-agrônomo, doutor em Biotecnologia e Biodiversidade, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

⁷Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Resumo – O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) apresenta destaque expressivo que traduz a sua importância econômica e ambiental em pastagens. Porém, ainda são poucas as variedades disponíveis para cultivo. O uso de marcadores moleculares baseados em RNA-Seq é vantajoso, pois são derivados de genes que podem estar relacionados com características fenotípicas de interesse agrônomo. Assim, o objetivo deste trabalho foi testar a transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos a partir de RNA-Seq de *Arachis pintoi* para *Arachis repens* e o amendoim comum (*Arachis hypogaea* L.). Trinta e três locos microssatélites foram analisados, dos quais 28 apresentaram amplificação em todas as espécies. Tal resultado indica que esses locos são altamente conservados. A maior taxa de transferibilidade foi observada em *A. repens* (100%), espécie pertencente à mesma seção taxonômica que *A. pintoi*. Cinco locos amplificaram apenas em *A. repens*. Isso sugere alterações nas regiões flangeadoras dos locos em *A. hypogaea*, impedindo o anelamento correto dos *primers*. Em *A. hypogaea* a taxa foi de 84,85%. A anotação funcional dos locos identificou similaridade com proteínas relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e diferenciação de células e tecidos, e resistência a patógenos. Esses dados indicam o potencial informativo dos novos locos e podem ser usados em programas de melhoramento.

Termos para indexação: *Arachis pintoi*, taxa de transferibilidade, genoma funcional.

Introdução

Diante da crescente tendência da pecuária sustentável, o uso do amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg., Fabaceae) em pastagens consorciadas com gramíneas tem sido uma alternativa relevante. Além de contribuir na fixação biológica de nitrogênio no solo, possui alto valor nutricional, reduzindo o período de engorda do gado em até 8 meses (Oliveira; Campos, 2019). Em 2019, o amendoim forrageiro teve um impacto econômico positivo de R\$ 91 milhões para os produtores no estado do Acre (Embrapa, 2020). Apesar desses fatores, o número de cultivares disponíveis ao produtor é pequeno e o custo de implantação da cultura elevado quando comparado com outras forrageiras.

Para aumentar a velocidade e eficiência da seleção de genótipos superiores e desenvolvimento de novas cultivares, os programas de melhoramento têm adotado genotipagem por marcadores

moleculares. Dentre esses, os microssatélites (SSR) possuem características ideais: elevado polimorfismo, natureza multialélica e codominante, além de elevada transferibilidade entre espécies (Hodel et al., 2016). Entretanto, o seu desenvolvimento é laborioso e de alto custo. Por esse motivo, o uso de RNA-Seq (RNA Sequencing) é interessante, pois permite o desenvolvimento de milhares de marcadores moleculares com menor custo e trabalho laboratorial quando comparado às técnicas tradicionais (Taheri et al., 2018). Além disso, marcadores baseados em RNA são derivados de regiões expressas do genoma que podem estar relacionadas com características fenotípicas de interesse agrônomo, o que é extremamente importante para os programas de melhoramento (Poczai et al., 2013).

Os marcadores microssatélites heterólogos têm sido ferramentas importantes, especialmente em espécies com poucos marcadores disponíveis. Em *A. pintoi*, microssatélites heterólogos gênicos foram utilizados em estudos de avaliação de germoplasma, identificação de híbridos e determinação da taxa de cruzamento (Azêvedo et al., 2016; Campos et al., 2016; Oliveira et al., 2019). Assim, este trabalho teve como objetivo testar a transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos a partir de RNA-Seq de *A. pintoi* para *A. repens* e para o amendoim comum (*A. hypogaea* L.).

Material e métodos

Foram utilizadas duas espécies do gênero *Arachis*: *A. hypogaea* (BRS 421) e *A. repens* (Nc1579). O DNA genômico foi extraído de folhas frescas utilizando o método de CTAB modificado (Campos et al., 2016).

Trinta e três microssatélites desenvolvidos a partir do transcriptoma de folhas de *A. pintoi* foram utilizados (dados não publicados). A taxa de transferibilidade foi realizada avaliando a presença ou ausência de produtos em eletroforese em gel de agarose 3% de acordo com a fórmula:

$$\text{Transferibilidade (\%)} = \frac{\text{número de locos transferíveis}}{\text{número de locos testados}} \times 100$$

A anotação funcional dos locos foi realizada por meio da busca por homologia no banco de dados não redundante (nr) do NCBI, utilizando a função BLASTX do programa Blast2GO⁸ e aplicando os parâmetros padrões.

Resultados e discussão

Os locos apresentaram taxa de transferibilidade variável. A maior porcentagem foi observada na espécie *A. repens* (100%). *Arachis hypogaea* apresentou taxa pouco inferior (84,85%, 28 locos). O sucesso absoluto da taxa de transferibilidade observada em *A. repens* demonstra a natureza monofilética com *A. pintoi*. Ambas as espécies pertencem à mesma seção taxonômica (*Caulorrhizae*) e ocorrem na mesma região geográfica. Estudos genéticos detectaram que possuem genomas similares derivados de um ancestral comum (Friend et al., 2010; Azêvedo et al., 2016). Espera-se que marcadores baseados em RNA sejam transferíveis entre espécies e gêneros relacionados, pois os *primers* são projetados a partir de regiões codificantes conservadas do genoma. No entanto, o sucesso da transferência também pode estar relacionado à complexidade genômica, distância

⁸ Disponível em: <https://www.blast2go.com/>.

taxonômica e a função/evolução do gene a partir do qual os *primers* de sequências expressas (EST) são derivados (Poczai et al., 2013). O menor percentual de transferibilidade observado em *A. hypogaea*, pertencente à seção *Arachis*, é resultado das diferenças genômicas estruturais entre as duas espécies mais distantes filogeneticamente. Huang et al. (2016) testaram a transferibilidade de locos desenvolvidos a partir de RNA-Seq em diferentes espécies do gênero *Arachis* e encontraram taxa de transferibilidade similar (36,4% a 100%) à observada no presente estudo, demonstrando a qualidade dos locos desenvolvidos e o potencial de seu uso no programa de melhoramento do amendoim.

A partir da anotação funcional identificou-se homologia para 22 locos. O loco Ap(TCT)118 mostrou similaridade com *replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit B-like isoform X4* (RPA1B), a qual pode atuar principalmente no reparo do DNA (Ishibashi et al., 2005). Esse foi um dos locos que apresentou problemas de amplificação em *A. hypogaea*. O fato de tratar-se de uma proteína que está presente em várias espécies indica que alterações nos desenhos dos *primers* desse e dos demais locos que não amplificaram em *A. hypogaea* podem solucionar esse problema.

Os genes *probable flavin-containing monooxygenase 1* (FMO1) e *IQ-DOMAIN 1* (IQD1) (Ap(AT)40 e Ap(TC)99, respectivamente) têm papel importante nos mecanismos de resistência a patógenos e defesa nas plantas (Levy et al., 2005; Bartsch et al., 2006). A análise de expressão diferencial poderá auxiliar na identificação de genótipos com resistência a patógenos.

Os genes *conserved oligomeric Golgi complex subunit* (COG), *APETALA* (AP) e *CAULIFLOWER A* (CAL-A) estão relacionados com a correta formação de flores, pólen e sementes. Alterações no gene COG (Ap(GA)39) resultam em modificações no complexo de Golgi, crescimento irregular de meristemas apicais, folhas, tubos polínicos, falha na germinação de sementes e coloração anormal de embriões (Ishikawa et al., 2008; Tan et al., 2016; Rui et al., 2020). Os genes AP e CAL-A (Ap(GA)29 e Ap(GA)111, respectivamente) estão envolvidos nas vias metabólicas responsáveis pelo desenvolvimento correto de sépalas e pétalas em flores, assim como o AP1 tem um papel chave nos genes de florescimento, alterando de crescimento vegetativo para reprodutivo (Fang et al., 2000; Liu et al., 2007).

Assim, os novos marcadores podem estar relacionados a importantes características e apresentaram polimorfismo sobre o tamanho da região genômica. Estudos de validação de expressão poderão auxiliar na identificação de genótipos promissores para o programa de melhoramento.

Conclusões

Os novos marcadores microsatélites desenvolvidos a partir de RNA-Seq apresentaram elevada taxa de transferibilidade entre as espécies analisadas e podem auxiliar na identificação de genótipos com problemas reprodutivos e resistência a patógenos, reduzindo o tempo e recursos necessários para o desenvolvimento de novas cultivares no programa de melhoramento de *Arachis*.

Referências

AZÊVEDO, H. S. F. S.; SOUSA, A. C. B.; MARTINS, K.; OLIVEIRA, J. C.; YOMURA, R. B. T.; SILVA, L. M.; VALLS, J. F. M.; ASSIS, G. M. L.; CAMPOS, T. Genetic diversity of the forage peanut in the Jequitinhonha, São Francisco, and Paraná River valleys of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-11, 2016.

- BARTSCH, M.; GOBBATO, E.; BEDNAREK, P.; DEBEY, S.; SCHULTZE, J. L.; BAUTOR, J.; PARKER, J. E. Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in *Arabidopsis* immunity and cell death is regulated by the Monooxygenase *FMO1* and the Nudix Hydrolase *NUDT7*. **Plant Cell**, v. 18, n. 4, p. 1038-1051, Apr. 2006.
- CAMPOS, T.; AZÊVEDO, H. S. F. S.; OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA FILHO, J. A.; YOMURA, R. B. T.; SILVA, L. M. **Protocolo para identificação de híbridos de amendoim forrageiro utilizando marcador molecular microsatélite**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2016. 29 p. (Embrapa Acre. Documentos, 146). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/156276/1/26263.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2020.
- EMBRAPA. **Balanco Social** 2019. Brasília, DF, 2020. Disponível em: <https://bs.sede.embrapa.br/2019/balancosocialembrapa2019print.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2020.
- FANG, L. X.; SHEN, R. J.; LIU, P. L.; TANG, Z. C.; HE, Y. K. Molecular characters and morphological genetics of CAL gene in Chinese cabbage. **Cell Research**, v. 10, n. 1, p. 29-38, Mar. 2000.
- FRIEND, S. A. D.; QUANDT, S. P.; TALLURY, H. T.; STALKER, K. W. H. Species, genomes, and section relationships in the genus *Arachis* (Fabaceae): a molecular phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 290, p. 185-199, 2010.
- HODEL, R. G. J.; SEGOVIA-SALCEDO, M. C.; LANDIS, J. B.; CROWL, A. A.; SUN, M.; LIU, X.; GITZENDANNER, M. A.; DOUGLAS, N. A.; GERMAIN-AUBREY, C. C.; CHEN, S.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. The report of my death was an exaggeration: a review for researchers using microsatellites in the 21st century. **Applications in Plant Sciences**, v. 4, n. 6, 1600025, 2016.
- HUANG, L.; WU, B.; ZHAO, J.; LI, H.; CHEN, W.; ZHENG, Y.; REN, X.; CHEN, Y.; ZHOU, X.; LEI, Y.; LIAO, B.; JIANG, H. Characterization and transferable utility of microsatellite markers in the wild and cultivated *Arachis* species. **PLoS One**, v. 11, n. 5, e0156633, 2016.
- ISHIBASHI, T.; KOGA, A.; YAMAMOTO, T.; UCHIYAMA, Y.; MORI, Y.; HASHIMOTO, J.; KIMURA, S.; SAKAGUCHI, K. Two types of replication protein A in seed plants: characterization of their functions *in vitro* and *in vivo*. **FEBS Journal**, v. 272, v. 13, p. 3270-3281, July 2005.
- ISHIKAWA, T.; MACHIDA, C.; YOSHIOKA, Y.; UEDA, T.; NAKANO, A.; MACHIDA, Y. EMBRYO YELLOW gene, encoding a subunit of the conserved oligomeric Golgi complex, is required for appropriate cell expansion and meristem organization in *Arabidopsis thaliana*. **Genes to Cells**, v. 13, p. 521-535, 2008.
- LEVY, M.; WANG, Q.; KASPI, R.; PARRELLA, M. P.; ABEL, S. *Arabidopsis* IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. **The Plant Journal**, v. 43, n. 1, p. 79-96, July 2005.
- LIU, C.; ZHOU, J.; BRACHA-DRORI, K.; YALOVSKY, S.; ITO, T.; YU, H. Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. **Development**, v. 134, p. 1901-1910, 2007.
- OLIVEIRA, J. C.; CAMPOS, T. Tecnologias em genética molecular para intensificação do uso de amendoim forrageiro em pastagens na Amazônia. In: MENEGUETTI, D. U. O.; CARVALHO, C. M.; ZAN, R. A.; SILVA, R. P. M. (Org.). **Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia**. Rio Branco, AC: Stricto Sensu, 2019. p. 105-119.
- OLIVEIRA, J. C.; RUFINO, P. B.; AZÊVEDO, H. S. F. S.; SOUSA, A. C. B.; ASSIS, G. M. L.; SILVA, L. M.; SEBBENN, A. M.; CAMPOS, T. Inferring mating system parameters in forage peanut, *Arachis pintoi*, for Brazilian Amazon conditions. **Acta Amazonica**, v. 49, n. 4, p. 277-282, 2019.
- POCZAI, P.; VARGA, I.; LAOS, M.; CSEH, A.; BELL, N.; VALKONEN, J. P. T.; HYVÖNEN, J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. **Plant Methods**, v. 9, n. 6, p. 1-31, 2013.

RUI, Q.; WANG, J.; LI, Y.; TAN, X.; BAO, Y. *Arabidopsis* COG6 is essential for pollen tube growth and Golgi structure maintenance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 528, n. 3, p. 447-452, July 2020.

TAHERI, S.; LEE ABDULLAH, T.; YUSOP, M. R.; HANAFI, M. M.; SAHEBI, M.; AZIZI, P.; SHAMSHIRI, R. R. Mining and development of novel SSR markers using next generation sequencing (NGS) data in plants. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 399-419, 2018.

TAN, X.; CAO, K.; LIU, F.; LI, Y.; LI, P.; GAO, C.; DING, Y.; LAN, Z.; SHI, Z.; RUI, Q.; FENG, Y.; LIU, Y.; ZHAO, Y.; WU, C.; ZHANG, Q.; LI, Y.; JIANG, L.; BAO, Y. *Arabidopsis* COG complex subunits COG3 and COG8 modulate golgi morphology, vesicle trafficking homeostasis and are essential for pollen tube growth. **PLoS Genet**, v. 12, n. 7, e1006140, 2016.