

Caracterização de Novos Microssatélites Desenvolvidos a partir do Transcriptoma de Amendoim Forrageiro

Jônatas Chagas de Oliveira¹, Luciélio Manoel da Silva², Eduardo Fernandes Formighieri³, Carla Cristina da Silva⁴, Anete Pereira de Souza⁵ e Tatiana de Campos⁶

¹Biólogo, doutor em Biodiversidade e Biotecnologia, técnico de laboratório da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

²Engenheiro-agrônomo, doutor em Biodiversidade e Biotecnologia, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

³Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Funcional e Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁴Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

⁵Engenheira-agrônoma, doutora em Biologia Celular e Molecular, professora da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

⁶Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Resumo – O amendoim forrageiro tem ganhado cada vez mais importância devido às vantagens associadas ao seu uso. Entretanto, a quantidade de microssatélites disponíveis para a espécie ainda é restrita, o que tem sido um gargalo no avanço do programa de melhoramento. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar novos microssatélites a partir do transcriptoma de folhas de *Arachis pintoi*. Foram testados 186 locos em 19 acessos. Os locos com os melhores perfis de amplificação (64) foram selecionados para avaliação de polimorfismo, dos quais 63 (98,4%) apresentaram perfis polimórficos, com média de 7,37 alelos por loco. Os valores médios de heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) foram 0,72 e 0,31, respectivamente. Os marcadores apresentaram elevadas médias de conteúdo de informação polimórfica (PIC = 0,70) e poder discriminatório ($D = 0,80$). Portanto, os novos marcadores derivados de genes são informativos e podem ser incorporados à rotina de análises do programa de melhoramento.

Termos para indexação: *Arachis pintoi*, RNA-Seq, SSR.

Introdução

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. e WC Greg.) tem recebido destaque por seu uso em pastagens consorciadas com gramíneas, o que contribui no expressivo aumento do ganho de peso em gado de corte e redução do tempo de abate desses animais (Maia, 2018). Além disso, seu uso como cobertura verde consorciado com culturas comerciais como café, pêssego, pepino e tomate auxilia na redução de ervas daninhas, ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, manutenção da umidade do solo e redução da erosão (Silva et al., 2012; Santos et al., 2014; Wang et al., 2015; Rose et al., 2019; Resende et al., 2020).

O número de marcadores específicos para *A. pintoi* é restrito a apenas 25 locos derivados de regiões genômicas (Palmieri et al., 2002, 2005, 2010). Quando considerados os locos com perfis adequados para análises automatizadas, esse número é reduzido para menos de dez (Azêvedo et al., 2016). Esse número limitado de marcadores é um gargalo para abordagens que necessitam de maior cobertura do genoma, como seleção assistida por marcadores, desenvolvimento de mapas genéticos e mapeamento de QTLs (Quantitative Traits Loci). Por isso, o número de marcadores disponíveis tem um papel crucial no avanço do melhoramento do amendoim forrageiro. Marcadores desenvolvidos a partir de RNA são vantajosos, pois derivam de regiões expressas do genoma e geram fragmentos que podem ser facilmente relacionados com características fenotípicas. Essa característica é extremamente importante para estudos de associação (Poczai et al., 2013).

Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar novos microssatélites desenvolvidos a partir do transcriptoma de folhas de *A. pinto*.

Material e métodos

Foram utilizados 19 acessos de *A. pinto* do banco ativo de germoplasma (BAG) de amendoim forrageiro da Embrapa Acre (Tabela 1). Os acessos foram escolhidos a partir de uma análise prévia de diversidade, que gerou uma coleção nuclear considerando a riqueza alélica conservada no BAG (Azêvedo, 2014). O DNA genômico foi extraído a partir de folhas frescas utilizando o protocolo de CTAB modificado (Campos et al., 2016) e a quantificação foi realizada por meio de fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Tabela 1. Acessos de *Arachis pinto* utilizados na caracterização dos microssatélites.

V14951	W647	V6791wf	V15062	V13294
V6741	V5895	Belomonte	W944	W34 (B)
V6784	V13196	V14966	V13288	V13372
W225	V13211-1	Amarillo	V13298	

Foram testados 186 microssatélites desenvolvidos a partir do transcriptoma de folhas de *A. pinto* por Oliveira (2020). Os critérios de seleção dos locos foram: intensidade e nitidez dos produtos de amplificação e ausência de produtos secundários. As reações de amplificação e genotipagem foram realizadas de acordo com Azêvedo et al. (2017). Os locos Simple Sequence Repeats (SSRs) foram avaliados quanto ao número de alelos por loco, intervalo de amplificação observada, conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), poder discriminatório (D).

Resultados e discussão

Dos 186 marcadores analisados, 148 (79,57%) amplificaram, dos quais 87 (58,78%) atenderam aos critérios de seleção estabelecidos. Uma subamostra de 64 locos com os melhores perfis de amplificação foi analisada para polimorfismo, sendo observado o perfil monomórfico em apenas um. Foram observados 464 alelos, com fragmentos variando de 100 a 300 pares de bases de comprimento (Tabela 2). O número de alelos por loco variou de 2 a 18, com média de 7,37. As heterozigosidades esperadas (H_E) e observadas (H_O) foram 0,72 e 0,31, respectivamente, as quais corroboram com as análises realizadas com o BAG de amendoim forrageiro utilizando microssatélites genômicos (Azêvedo et al., 2016).

Os valores de PIC variaram de 0,05 a 0,92. Considerando a classificação proposta por Botstein et al. (1980), 53 locos foram altamente informativos ($PIC > 0,5$). Os valores de poder discriminatório (D) variaram de 0,06 a 0,99, com média de 0,80. Marcadores com elevados valores de D são os mais recomendados para estudos de *fingerprinting* devido à alta capacidade de discriminar genótipos. No entanto, também devem ser considerados a qualidade da amplificação dos produtos de PCR e o número mínimo de marcadores capazes de discriminar as variedades (Rosa et al., 2010).

Tabela 2. Caracterização de 64 locos SSRs incluindo tamanho observado (pares de bases), número de alelos por loco (N), heterozigiosidade esperada (H_E) e observada (H_O), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e poder discriminatório (D).

<i>Primers</i>	Intervalo observado (pb)	Nº de alelo	H_E	H_O	PIC	D
Ap(CT)01	250–300	10	0,83	0,37	0,81	0,91
Ap(TC)05	250–300	3	0,57	0,25	0,55	0,79
Ap(TC)06	200–300	2	0,48	0,00	0,47	0,46
Ap(AT)07	100–150	8	0,79	0,26	0,77	0,88
Ap(AG)14	150–250	13	0,86	0,26	0,83	0,90
Ap(CT)15	100–150	3	0,49	0,21	0,48	0,61
Ap(TC)18	200–250	6	0,82	0,26	0,80	0,90
Ap(GA)21	250–300	9	0,83	0,19	0,81	0,90
Ap(CT)26	200–250	11	0,86	0,32	0,84	0,93
Ap(TC)28	100–200	10	0,91	0,37	0,88	0,94
Ap(GA)29	200–250	5	0,55	0,11	0,54	0,62
Ap(GA)30	250–300	7	0,71	0,35	0,69	0,85
Ap(TG)32	200–250	11	0,85	0,54	0,82	0,90
Ap(CT)33	200–250	4	0,47	0,16	0,46	0,57
Ap(CT)35	150–250	15	0,91	0,47	0,88	0,98
Ap(GA)39	150–200	3	0,54	0,21	0,52	0,68
Ap(AT)40	150–200	7	0,83	0,32	0,81	0,93
Ap(GA)42	150–200	7	0,84	0,37	0,82	0,93
Ap(GA)45	250–300	5	0,64	0,26	0,62	0,77
Ap(GA)48	100–150	2	0,49	0,11	0,48	0,62
Ap(CT)54	250–300	14	0,89	0,42	0,87	0,94
Ap(CT)55	200–300	12	0,88	0,16	0,85	0,91
Ap(TC)56	150–250	13	0,90	0,39	0,88	0,98
Ap(AG)58	100–200	4	0,60	0,25	0,56	0,62
Ap(GA)61	150–200	5	0,78	0,38	0,76	0,92
Ap(TA)65	250–300	1	-	-	-	-
Ap(AG)66	150–250	12	0,91	0,37	0,89	0,96
Ap(CT)68	150–300	18	0,93	0,47	0,91	0,98
Ap(CT)72	100–200	15	0,94	0,82	0,92	0,98
Ap(TC)73	250–300	4	0,59	0,26	0,57	0,73
Ap(CT)75	200–300	11	0,87	0,21	0,85	0,92
Ap(TG)76	250–300	4	0,44	0,11	0,43	0,51
Ap(AC)82	200–250	2	0,05	0,05	0,05	0,06
Ap(AG)86	200–250	3	0,44	0,14	0,43	0,70
Ap(AG)87	200–250	8	0,79	1,00	0,77	0,62
Ap(TC)88	200–300	15	0,93	0,37	0,90	0,99
Ap(AG)89	150–200	3	0,60	0,16	0,59	0,72
Ap(TC)90	200–250	3	0,56	0,21	0,54	0,70
Ap(CT)92	100–150	7	0,77	0,33	0,75	0,89
Ap(TC)93	200–250	7	0,71	0,26	0,69	0,83
Ap(AC)95	100–200	8	0,75	0,26	0,73	0,80
Ap(GA)98	150–250	12	0,88	0,26	0,86	0,93

Continua...

Tabela 2. Continuação.

<i>Primers</i>	Intervalo observado (pb)	Nº de alelo	H_E	H_O	PIC	D
Ap(TC)99	100–200	8	0,84	0,50	0,81	0,89
Ap(AGG)102	100–150	6	0,57	0,47	0,56	0,73
Ap(GAA)106	150–250	12	0,88	0,37	0,86	0,95
Ap(TG)107	200–250	2	0,51	0,26	0,49	0,67
Ap(TC)109	250–300	5	0,66	0,00	0,64	0,70
Ap(TC)110	100–200	10	0,88	0,32	0,86	0,93
Ap(GA)111	150–200	4	0,51	0,37	0,49	0,68
Ap(CT)112	150–200	3	0,46	0,63	0,45	0,53
Ap(CT)113	100–150	10	0,85	0,32	0,83	0,91
Ap(CT)114	200–250	12	0,91	0,16	0,89	0,94
Ap(TCT)116	100–150	8	0,86	0,47	0,84	0,91
Ap(TTC)117	150–200	6	0,78	0,33	0,76	0,87
Ap(TCT)118	200–300	8	0,76	0,00	0,74	0,77
Ap(TCT)120	250–300	5	0,73	0,32	0,71	0,80
Ap(AG)121	100–150	9	0,77	0,53	0,75	0,90
Ap(AG)124	200–250	7	0,67	0,21	0,65	0,76
Ap(CT)126	200–250	8	0,81	0,37	0,79	0,88
Ap(AG)127	100–150	3	0,61	0,42	0,59	0,77
Ap(GT)128	150–250	5	0,67	0,32	0,66	0,75
Ap(TC)132	100–150	4	0,55	0,11	0,54	0,62
Ap(CT)134	250–300	3	0,67	0,37	0,65	0,81
Ap(AG)137	150–200	5	0,74	0,42	0,72	0,88
Média geral	-	7,37	0,72	0,31	0,70	0,80
Total	-	464	-	-	-	-

Conclusão

Os novos marcadores microssatélites derivados de genes foram informativos e podem ser utilizados para estudos genéticos.

Agradecimento

Os autores agradecem o governo federal e governo do estado do Acre (Fapac TO: 024/2018) pelo apoio financeiro, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de produtividade e a Embrapa Acre pelo financiamento e infraestrutura para condução dos experimentos.

Referências

AZÊVEDO, H. S. F. S. **Caracterização da diversidade genética de amendoim forrageiro com marcadores microssatélites**. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

- AZÊVEDO, H. S. F. S.; BENVINDO, F. D.; CAVALCANTE, L. N.; HAVERROTH, M.; WADT, L. H. O.; CAMPOS, T. Transferability of heterologous microsatellite loci between species of *Euterpe* genus. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 4, p. 1-7, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039825>.
- 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, Sept. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038601>.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, May 1980.
- 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: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1064915>. Acesso em: 26 ago. 2021.
- MAIA, G. F. N. **Desempenho produtivo de dois grupos genéticos de bovinos de corte em pastos puros e consorciados na Amazônia Ocidental**. 2018. 45 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco.
- OLIVEIRA, J. C. **Análise do genoma funcional de *Arachis pintoi* e desenvolvimento de novos marcadores moleculares**. 2020. 94 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Rede Bionorte, Universidade Federal do Acre, Rio Branco.
- PALMIERI, D. A.; BECHARA, M. D.; CURI, R. A.; GIMENES, M. A.; LOPES, C. R. Novel polymorphic microsatellite markers in section *Caulorrhizae* (*Arachis*, Fabaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 77-79, Mar. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00838.x>.
- PALMIERI, D. A.; BECHARA, M. D.; CURI, R. A.; MONTEIRO, J. P.; VALENTE, S. E. S.; GIMENES, M. A.; LOPES, C. R. Genetic diversity analysis in the section *Caulorrhizae* (genus *Arachis*) using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 109-118, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000001>.
- PALMIERI, D. A.; HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Isolation and characterization of microsatellite loci from the forage species *Arachis pintoi* (Genus *Arachis*). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 551-553, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00317.x>.
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-6>.
- RESENDE, F. V.; VIDAL, M. C.; SOUZA, R. B. **Plantio direto de tomate sobre coberturas vivas em sistema orgânico de produção**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2020. 28 p. (Embrapa Hortaliças. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 201). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1121614>. Acesso em: 20 ago. 2021.
- ROSA, P. M.; CAMPOS, T.; SOUSA, A. C. B.; SFORÇA, D. A.; TORRES, G. A. M.; SOUZA, A. P. Potato cultivar identification using molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 110-113, jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000100015>.
- ROSE, T. J.; KEARNEY, L. J.; MORRIS, S.; VAN ZWIETEN, L.; ERLER, D. V. Pinto peanut cover crop nitrogen contributions and potential to mitigate nitrous oxide emissions in subtropical coffee plantations. **Science of the Total Environment**, v. 656, p. 108-117, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.291>.

SANTOS, J. C. F.; CUNHA, A. J.; MELO, B. Soil cover and weed control on coffee intercropping perennial legume. **International Journal of Applied Science and Technology**, v. 4, n. 4, p. 149-157, July 2014.

SILVA, G. P. P.; RESENDE, F. V.; PEREIRA, T. S.; SOUZA, R. B.; ALBUQUERQUE, J. O.; VIDAL, M. C.; SOUSA, J. M. M. Desempenho agronômico de cultivares de pepino em ambiente protegido cultivado em solo com cobertura viva de amendoim forrageiro em sistema orgânico de produção. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA HORTALIÇAS, 2., 2012, Brasília, DF. [Resumos...]. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2012. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/930040>. 2012. Acesso em: 26 ago. 2021.

WANG, Y. X.; WENG, B. Q.; YE, J.; ZHONG, Z. M.; HUANG, Y. B. Carbon sequestration in a nectarine orchard as affected by green manure in China. **European Journal of Horticultural Science**, v. 80, n. 5, p. 208-215, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17660/eJHS.2015/80.5.2>.