

Identificação de híbridos em amendoim forrageiro utilizando microssatélites de RNA-Seq

Giovana de Almeida Calacina⁽¹⁾, Vanessa Santos Silva⁽²⁾, Clemeson Silva de Souza⁽³⁾, Jônatas Chagas de Oliveira⁽⁴⁾, Giselle Mariano Lessa de Assis⁽⁵⁾ e Tatiana de Campos⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Bolsista, Embrapa Acre, Rio Branco, AC. ⁽²⁾ Bióloga, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC. ⁽³⁾ Professor, Instituto Federal do Acre, Sena Madureira, AC. ⁽⁴⁾ Técnico, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC. ⁽⁵⁾ Pesquisadoras, Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Resumo – *Arachis pintoi* e *Arachis repens*, popularmente conhecidos como amendoim forrageiro e grama-amendoim, respectivamente, são leguminosas herbáceas tropicais com atributos favoráveis para utilização em pastagens. O melhoramento genético utiliza a hibridação artificial para acessar a variabilidade genética. Os marcadores moleculares são fundamentais na efetiva identificação de híbridos intra e interespecíficos. Os microssatélites destacam-se por ser uma ótima ferramenta na caracterização molecular de vegetais por sua natureza codominante, elevado polimorfismo e grande distribuição ao longo do genoma. Este trabalho teve como objetivo identificar híbridos de cruzamentos de amendoim forrageiro por meio de marcadores microssatélites derivados de regiões expressas. Foram obtidas 4.802 sementes a partir de cruzamentos realizados em 2021 entre 20 genótipos do programa de melhoramento genético. Dessas, 1.915 (39,88%) sementes germinaram, e o DNA genômico foi extraído e amplificado com marcadores microssatélites derivados de sequências expressas. Até o momento, 48 híbridos foram identificados pela certificação molecular. Assim, a identificação de híbridos com marcadores microssatélites derivados de regiões expressas foi eficiente e ofereceu suporte para a rotina de análises do Programa de Melhoramento Genético do Amendoim Forrageiro realizado na Embrapa Acre.

Termos para indexação: *Arachis* spp., marcadores moleculares, SSR.

Identification of hybrids in forage peanut using RNA-Seq microsatellites

Abstract – *Arachis pintoi* and *Arachis repens*, popularly known as forage peanut and peanut grass, respectively, are tropical herbaceous legumes with favorable attributes for its use in pastures. Genetic improvement uses artificial hybridization to access genetic variability. Molecular markers are fundamental in the effective identification of intra- and interspecific hybrids. Microsatellites stand out for being a great tool in the molecular characterization of plants due to their codominant nature, high polymorphism and wide distribution throughout the genome. This study aimed to identify hybrids from forage peanut crosses using microsatellite markers derived from expressed regions. About 4,802 seeds were obtained from crosses carried out in 2021 between 20 genotypes from the breeding program. Of these, 1,915 (39.88%) seeds germinated, and genomic DNA was extracted and amplified with microsatellite markers derived from expressed sequences. To date, 48 hybrids have been identified by molecular certification. Thus, the identification of hybrids with microsatellite markers derived from expressed regions was efficient and offered support for the routine analysis of the Forage Peanut Genetic Breeding Program carried out at Embrapa Acre.

Index terms: *Arachis* spp., molecular markers, SSR.

Introdução

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg.) é uma excelente leguminosa para consórcio com gramíneas por possuir elevado valor nutritivo, tolerância à desfolhação e boa resistência ao pastejo (Tamele et al., 2018). A espécie *Arachis repens* Handro, também pertencente à seção *Caulorrhizae*, possui os mesmos atributos forrageiros, apesar de ser mais utilizada como planta ornamental. Entretanto, o desenvolvimento de novas cultivares depende da geração de variabilidade genética e da combinação de características agrônomicas de interesse no mesmo genótipo. Adicionalmente, há demanda por novas cultivares adaptadas a diferentes sistemas de produção e diferentes condições edafoclimáticas. Nesse contexto, o Programa de Melhoramento Genético do Amendoim Forrageiro, desenvolvido na Embrapa Acre (Assis; Valentim, 2013), utiliza a hibridação artificial intra e interespecífica como ferramenta de geração de variabilidade genética a partir de cruzamentos entre genótipos previamente avaliados e selecionados.

A identificação de híbridos pode ser realizada tanto por marcadores morfológicos, citogenéticos, quanto por marcadores moleculares. Os marcadores morfológicos são caracterizados por um fenótipo de fácil classificação e com baixo custo para análise, porém, é necessário que a espécie possua o marcador monogênico, dominante e contrastante entre os genitores. No amendoim forrageiro, apenas a cor da flor é relatada como marcador morfológico de fácil identificação. A maioria dos genótipos usados no programa de melhoramento possui flor amarela, o que dificulta o uso desse caráter para identificação dos híbridos. Dessa forma, o uso de marcadores moleculares é fundamental para a identificação dos cruzamentos controlados. Uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismo entre sequências de DNA é por meio de microssatélites ou Simple Sequence Repeats (SSR). Isso se deve ao fato de que esses marcadores são altamente polimórficos, apresentando uma grande variedade de alelos em uma população, o que possibilita a identificação de indivíduos e a caracterização da diversidade genética (Aiello et al., 2020).

Com o uso do sequenciamento do RNA (RNA-Seq) é possível desenvolver milhares de SSRs com menor custo e esforço do que as técnicas tradicionais (Taheri et al., 2018). Segundo Poczai et al. (2013), os marcadores desenvolvidos a partir de RNA são vantajosos, uma vez que derivam de regiões de expressão gênica e geram fragmentos com possibilidade de relação com características do

fenótipo, o que é essencial para estudos de associação. No gênero *Arachis*, essa técnica tem sido empregada, principalmente, no amendoim comum (*Arachis hypogaea* L.) e nas espécies silvestres mais próximas filogeneticamente (*Arachis ipaensis* Krapov. & W.C. Greg. e *Arachis duranensis* Krapov. & W.C. Greg.) (Chopra et al., 2014). Para *A. pintoi* foram desenvolvidos 186 marcadores SSR a partir do RNA-Seq de tecido foliar, os quais apresentaram elevado polimorfismo e são altamente informativos (Oliveira, 2020).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo identificar híbridos de cruzamentos de amendoim forrageiro por meio de marcadores microssatélites derivados de regiões expressas.

Material e métodos

Sementes oriundas dos cruzamentos realizados em 2021, entre 20 genótipos pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético do Amendoim Forrageiro da Embrapa Acre, foram utilizadas para avaliação de híbridos. Amostras de tecido foliar jovem dos parentais e das plântulas foram coletadas e transportadas em tubos de 2,00 mL ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre. Para extração e quantificação do DNA, foi utilizado o protocolo descrito por Campos et al. (2016).

O mix para realização de PCR continha: tampão 1x; 2,00 mM de MgCl₂; 0,25 mg mL⁻¹ BSA (albumina sérica bovina); 0,25 mM dNTP; 0,80 μM de iniciadores; 1,00 U de Taq polimerase e 7,50 ng μL⁻¹ DNA, totalizando 13,00 μL. Os ciclos de amplificação da PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto para desnaturação, temperatura de anelamento (específica para cada iniciador), extensão de 72 °C por 1 minuto e uma fase final de extensão de 72 °C por 5 minutos. As reações de amplificação foram realizadas com um conjunto de locos, derivado de sequências expressas do tecido foliar do amendoim forrageiro, desenvolvido por Oliveira (2020).

Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose a 3,00%. Os fragmentos de DNA foram aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida (5,00%) e corados de acordo com Creste et al. (2001). Híbridos certificados foram comparados com perfis genotípicos dos parentais para a identificação do doador de pólen.

Resultados e discussão

Foram utilizadas 4.802 sementes para plantio, sendo germinadas 1.915 (39,88%) com formação de plântulas. Os genitores utilizados para os cruzamentos são materiais de interesse, avaliados e selecionados em etapas anteriores do programa de melhoramento genético. As reações de amplificação foram realizadas com sucesso e um conjunto de nove locos (Tabela 1) foi selecionado para a rotina de análises. Os critérios de seleção dos locos foram a facilidade de amplificação e o elevado polimorfismo, capaz de discriminar os 20 genitores com alelos exclusivos. Esse conjunto de microssatélites apresentou maior polimorfismo e substituiu os locos anteriormente utilizados na rotina do programa de melhoramento (Campos et al., 2016). Antes do investimento no desenvolvimento de marcadores por

RNA-Seq, existiam apenas 25 marcadores genômicos (Palmieri et al., 2002, 2005, 2010) disponíveis para a espécie. Entretanto, apresentavam limitações nos padrões de amplificação, além da ocorrência de perfis alélicos similares entre os genótipos analisados, o que dificultava a identificação de híbridos.

A partir da amplificação de regiões microssatélites, os alelos identificados foram usados para discriminar material de fecundação externa das progênies de autofecundação. Dessa forma, foram identificados 48 híbridos, que representam 2,50% das amostras genotipadas.

A identificação de híbridos por meio de marcadores microssatélites foi eficiente, oferecendo suporte para a rotina de análises do Programa de Melhoramento Genético do Amendoim Forrageiro realizado na Embrapa Acre.

Tabela 1. Descrição dos nove locos utilizados na rotina de genotipagem.

Primer	Motivo	Sequência (5' - 3')	Ta (°C) ⁽¹⁾	Tamanho (pb) ⁽²⁾	Nº de alelos
Ap(AG)14	(AG)9	F: CCAATTTCCCACTCCGACGA R: GCTTCCGCCATTAATGCCTC	58,5	192	13
Ap(CT)35	(CT)10	F: CAGCTGCGCAACCAAAAGTA R: CCGGCCTTCTTGGTTCTCTT	60,0	169	15
Ap(CT)68	(CT)9	F: ACATTGCAGGCACCCATCTT R: AGCACCATCACCAACAACCC	55,4	192	18
Ap(CT)72	(CT)8	F: ACCGGTTGAATTGGGTCCAA R: TTCCCAGCGTGAATGGCATA	60,0	108	15
Ap(TG)76	(TG)8	F: TGTGAACGGTGGTGATCAGT R: AAGTAACGTGACCACCGCTT	58,5	235	4
Ap(GA)98	(GA)9	F: GTGGCGCTCATGACTGATGA R: GAGGCAGCAGAGTCTTCGTT	55,8	148	12
Ap(GAA)106	(GAA)13	F: CTCACCAACGACCCACTTCA R: TCATCAGCAGCACCACCAAT	59,4	206	12
Ap(CT)113	(CT)13	F: GTGTCTCATTCTCCCGCTCC R: CGGTTTTCTTGGTTTGTGTGGT	58,5	128	10
Ap(AG)121	(AG)8	F: AAGCTCTTCTCTCCTTCCCA R: ACCACCATTTGCTCGTCCA	58,5	124	9

⁽¹⁾ Temperatura de anelamento (Ta). ⁽²⁾ Pares de base (pb).

Conclusões

- 1) Os microssatélites selecionados foram eficientes na análise genética de certificação dos híbridos.
- 2) O novo conjunto de microssatélites foi integrado à atual rotina de genotipagem de identificação de híbridos do Programa de Melhoramento Genético do Amendoim Forrageiro.

Agradecimentos

À Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras (Unipasto) e Embrapa pelo suporte financeiro.

Referências

- AIELLO, D.; FERRADINI, N.; TORELLI, L.; VOLPI, C.; LAMBALK, J.; RUSSI, L.; ALBERTINI, E. Evaluation of cross-species transferability of SSR markers in *Foeniculum vulgare*. **Plants**, v. 9, n. 2, article number 175, Feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9020175>.
- ASSIS, G. M. L. de; VALENTIM, J. F. Forage peanut breeding program in Brazil. In: JANK, L.; CHIARI, L.; VALLE, C. B. do; RESENDE, R. M. S. (ed.). **Forage breeding and biotechnology**. Brasília, DF: Embrapa; Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2013. p. 77-105. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/979382>. Acesso em: 15 maio 2023.
- 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 microssatélite**. 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: 15 maio 2023.
- CHOPRA, R.; BUROW, G.; FARMER, A.; MUDGE, J.; SIMPSON, C. E.; BUROW, M. D. Comparisons of De Novo transcriptome assemblers in diploid and polyploid species using peanut (*Arachis* spp.) RNA-seq data. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. 1-16, Dec. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115055>.
- CRESTE, S.; TUMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, Dec. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02772828>.
- OLIVEIRA, J. C. **Análise do genoma funcional de *Arachis pintoi* e desenvolvimento de novos marcadores moleculares**. 2020. 94 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Conservação) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.
- 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, Jan. 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, Dec. 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, article number 6, p. 1-31, Feb. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-6>.
- 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.
- TAMELE, O. H.; SÁ, O. A. A. L. de; BERNARDES, T. F.; LARA, M. A. S.; CASAGRANDE, D. R. Optimal defoliation management of brachiaria grass-forage peanut for balanced pasture establishment. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 2, p. 522-531, Feb. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23020399>.