



ANÁLISE DE TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES SSR ENTRE ESPÉCIES DA FAMÍLIA *FABACEAE*

ELLEN GRIPPI¹; MARCO ANTÔNIO FERREIRA²; EDIENE GALDINO DE GOUVEIA³; MARCIO DE CARVALHO

MORETZSHON⁴; ZILNEIDE PEDROSA DE SOUZA AMARAL⁵; GLAUCIA SALLES CORTOPASSI BUSO⁶;

1,3.UNB, BRASILIA, DF, BRASIL; 2,4,5,6.EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, BRASILIA, DF, BRASIL;

glaucia.buso@embrapa.br

RESUMO: A família *Fabaceae* compreende duas espécies, entre outras, de significativa presença no agronegócio brasileiro e de alto valor nutricional, o feijão (*Phaseolus vulgaris*) e os amendoins (*Arachis hypogaea*). Continuamente, estão sendo desenvolvidos pares de primers específicos para regiões hipervariáveis (microsatélites) dos genomas de feijão e amendoim, que estão sendo utilizados em análise genética, no desenvolvimento de mapas de ligação e na detecção de regiões genômicas que controlam resistência a doenças nestes gêneros. O desenvolvimento de marcadores microsatélites envolve grande dedicação, tempo, custo elevado e mão de obra especializada. A potencial conservação de regiões flangeadoras destes locos hipervariáveis em gêneros da mesma família é muito importante para o rápido desenvolvimento de um arsenal tecnológico de marcadores moleculares altamente informativos para outras espécies de importância econômica, bem como para o conhecimento da conservação de regiões genômicas entre espécies e de suas relações sintênicas. O objetivo deste trabalho foi verificar a transferibilidade por meio da otimização das condições de amplificação de primers SSR desenvolvidos para feijão, em amendoim, e vice-versa, que por serem da mesma família, provavelmente possuem homologia das regiões que flanqueiam os microsatélites. Duzentos primers SSR foram testados, 100 desenvolvidos para feijão e 100 para amendoim. Uma pesquisa BLAST ((Basic Local Alignment Search Tool) foi realizada para comparar as seqüências dos clones que originaram os primers às seqüências depositadas no banco público de seqüências NCBI (National Center for Biotechnology Information) para identificação de nível significativo de similaridade a uma seqüência gênica identificada. Obteve-se 40% de transferibilidade de feijão para amendoim e 60% de amendoim para feijão. Algumas seqüências de clones tiveram similaridade significativa a genes constitutivos e funcionais.

Palavras-chave: microsatélites, *Phaseolus vulgaris*, *Arachis hypogaea*,



INTRODUÇÃO

A família *Fabaceae*, grupo vegetal encontrado em quase todas as regiões do mundo, é formada por cerca de 727 gêneros que contém em torno de 19325 espécies. Dentre as inúmeras espécies existentes, é possível destacar o feijão (*Phaseolus vulgaris*). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), o Brasil é o maior produtor mundial de feijão com produção média anual de 3,5 milhões de toneladas. Outro produto da mesma família e de importância econômica na indústria alimentar é o amendoim (*Arachis hypogaeae*). A partir deste, é possível obter diferentes receitas culinárias que vem sendo cada vez mais difundidas. Além disso, algumas variedades são ricas em lipídios, podendo ser utilizadas para a fabricação do óleo de cozinha.

Essas espécies apresentam uma alta variabilidade genética no Brasil, em virtude de sua ampla utilização e importância. Esta variabilidade consiste em importante fonte de estudos para programas de melhoramento, visando aumentar os conhecimentos a respeito de suas características e proporcionar o uso racional e sustentável dos recursos genéticos. As ferramentas moleculares têm sido utilizadas com eficiência para se obter este conhecimento e uma delas é o marcador microssatélite. Sequências Simples Repetidas (SSR), ou microssatélites, são marcadores genéticos usados para uma análise genômica detalhada por serem multialélicos, baseados em PCR e por terem herança codominante e alto conteúdo de informação. Apesar das facilidades encontradas com o uso destes marcadores, para seu desenvolvimento, são necessários grandes trabalhos e recursos financeiros, por isso, busca-se a transferibilidade de marcadores desenhados para feijão e amendoim, que por serem espécies de mesma família, provavelmente possuem homologia das regiões que flanqueiam os microssatélites. A potencial conservação de regiões flanqueadoras destes locos hipervariáveis em gêneros da mesma família é muito importante para o rápido desenvolvimento de um arsenal tecnológico de marcadores moleculares altamente informativos para outras espécies de importância econômica, bem como para o conhecimento da conservação de regiões genômicas entre espécies e de suas relações sintênicas. São inúmeros os estudos e pesquisas relacionados à transferibilidade de microssatélites. Peixoto et al. (2009) analisou a transferibilidade de primers de *Cucumis melo* para *Luffa cylindrica*, em que 60% de transferibilidade foi encontrada de melão para bucha, que são espécies da família *Cucurbitaceae*. Welzel et al. (2002) testou a transferibilidade de primers microssatélites entre espécies de *Arachis*. Dentre 53 primers analisados, 43 amplificaram nas duas espécies de *Arachis* utilizadas, totalizando



81% de transferibilidade. Ainda em relação a este tema, Souza et al. (1998) testou a transferibilidade de 28 primers desenvolvidos para copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em 24 espécies diferentes da família *Leguminosae*, observando-se amplificação em 11 espécies, o que correspondeu a 46% das espécies testadas.

Continuamente, estão sendo desenvolvidos pares de primers específicos para regiões hipervariáveis (microsatélites) dos genomas de feijão e amendoim, que estão sendo utilizados em análise genética, no desenvolvimento de mapas de ligação e na detecção de regiões genômicas que controlam resistência a doenças nestes gêneros. Os testes de transferibilidade dos microsatélites de uma espécie para outra são bastante oportunos, pois visam economizar tempo e recursos financeiros. Considerando esta finalidade esse trabalho teve como objetivo analisar a transferibilidade de primers microsatélites desenvolvidos para feijão e para amendoim.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material de feijão utilizado no trabalho é originário da Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP) e o material de amendoim do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Primeiramente foi realizada a diluição e quantificação das amostras de DNA para ajustar a concentração destas. Feito isto, foram testados 200 primers em reações de PCR com temperaturas entre 50°C e 60°C, 100 desenvolvidos para feijão e 100 para amendoim.

A reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método muito sensível de análise e que se realiza com grande cuidado, de forma a evitar contaminações que podem causar erros nos resultados. Esta reação é feita com 3µL DNA (3,0ng/µL), 3µL primer a 0,9mM e uma mistura de 7µL de substâncias chamada mix. Este é composto por 2,65µL de água Milli-Q autoclavada, 1,30µL de dNTP a 2,5mM (trifosfato desoxirribonucleotídeo – bases nitrogenadas), 1,30µL de BSA a 2,5mg/mL, 1,30µL de tampão IB 10x, 0,25µL de MgCl₂ (50mM) e 0,20µL de taq DNA polimerase, com um total de 13µL por reação. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores GeneAmp PCR system 9700 AB, variando-se a temperatura de anelamento de 50°C, 56°C e 60°C. A análise da amplificação foi feita por meio da visualização de géis de agarose a 3,5 corados com brometo de etídio. As imagens foram vistas em fotodocumentador.



Uma pesquisa BLAST ((Basic Local Alignment Search Tool) foi realizada utilizando-se a opção Blastx do NCBI (National Center for Biotechnology Information) fixando-se o valor de e-value máximo em 1.0×10^{-8} para validar a anotação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 200 primers testados, 100 desenvolvidos para feijão testados em amendoim e 100 desenvolvidos para amendoim testados em feijão, tiveram as temperaturas de anelamento ajustadas para adequar às condições de amplificação. Alguns primers amplificaram somente em uma temperatura, outros em duas e outros amplificaram nas três temperaturas testadas.

Obteve-se 40% de transferibilidade de feijão para amendoim e 60% de amendoim para feijão. O trabalho de Welzel et al. (2002) obteve maior índice de transferibilidade com 81%, pois esta foi testada entre espécies de mesmo gênero, que provavelmente possuem maior homologia das regiões que flanqueiam os microssatélites. Já os trabalhos de Souza et al. (1998) e Peixoto et al. (2009) possuem resultados mais próximos aos do presente trabalho, com 46% e 60% respectivamente, o que provavelmente acontece pelo fato dos testes terem sido feitos entre espécies de mesma família, que possuem um grau de parentesco menor comparadas às espécies de mesmo gênero.

A pesquisa BLAST mostrou que apenas 17 dos 100 primers de feijão que amplificaram em amendoim tiveram similaridade significativa a sequências gênicas identificadas e publicadas no banco de sequências NCBI. Algumas sequências foram similares a uma proteína “ATP-binding” da mitocôndria, outras a proteína de transferência fosfatidylcholine, “ADP-ribosylation factor-like”, beta-galactosidase e outras indicando similaridade significativa a genes constitutivos e funcionais. Esses primers poderão ser utilizados como marcadores úteis dependendo da característica desejada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

PEIXOTO, A. A. P.; VILLELA, J. L.; FERREIRA, M. A. J. F.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. de S.; VIEIRA, R. R. T.; LIRA, M. T. R.; BUSO, G. S. C. Transferibilidade de primers microssatélites de Cucumismelo para Luffacylindrica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE



PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. O melhoramento e os novos cenários da agricultura: anais. Vitória: SBMP: Incaper, 2009.

SOUZA, K. C. D. de; CIAMPI, A. Y.; GRATTAPAGLIA, D. Transferibilidade de marcadores microssatélites entre espécies da família leguminosae. In: TALENTO Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 1998: resumo dos trabalhos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. p. 48. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 34).

WELZEL, A.; RAMIRO, C. A.; MORETZSOHN, M. C.; BERTIOLI, D. J. Transferibilidade de marcadores microssatélites entre espécies de Arachis. In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 7., 2002, Brasília, DF. Anais: resumos dos trabalhos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 53.