



USO DE PRIMERS OBTIDOS DE REGIÕES SINTÊNICAS DE LEGUMINOSAS PARA DISTINÇÃO INTRAESPECÍFICA DE ACESSOS DE AMENDOIM

Maria Isabel Gomes Martins¹; Roseane Cavalcanti dos Santos²; Péricles de Albuquerque Melo Filho³ e
Reginaldo de Carvalho⁴

1. Bióloga, Mestranda do curso de Melhoramento Genético de Plantas, DEPA/UFRPE, Recife-PE (e-mail: belgomes@gmail.com); 2. Pesquisadora da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB; 3. Professor Associado do DEPA/UFRPE; 4. Professor do Departamento de Biologia/UFRPE, Recife-PE.

RESUMO - Dois acessos intraespecíficos de amendoim foram analisados por meio de PCR, utilizando-se *primers* sintetizados de regiões sintênicas de leguminosas, visando detectar diferenças genéticas entre os materiais. Foram utilizados 35 *primers* provenientes de bibliotecas de seqüências de expressas de *Lotus japonicus* L., *Glicine max* L. e *Medicago truncatula* L. Do total de *primers* testados, 18 geraram bandas simples, duplas e triplas. As bandas simples foram sequenciadas e alinhadas revelando diferenças pontuais em alguns nucleotídeos nos acessos interespecíficos de *Arachis*, que podem servir como candidatos para geração de mapas de restrição e posterior conversão em marcas moleculares. As seqüências de amendoim geradas com o *primer* CYB6-1, sintetizado a partir de regiões sintênicas de genes de cloroplasto em leguminosas foram alinhadas com *L. japonicus* L., *G. max* L., *M. truncatula* L. e *Pisum sativum* L., revelado, em média 97% de homologia entre elas, com E-value variando entre $6e^{-79}$ e $7e^{-73}$. Em termos de polimorfismo, apenas três *primers* geraram variantes entre os acessos investigados, cujas regiões podem ser posteriormente utilizadas em trabalhos de melhoramento para diferenciação entre acessos de *Arachis*.

Palavras-chave - *Arachis*, sintonia, divergência genética

INTRODUÇÃO

Com as atuais ferramentas disponíveis na biologia molecular, especialmente as relacionadas com marcadores genéticos, os estudos de caracterização, divergência e variabilidade genética inter e intra populações tornou-se mais acessível para auxiliar os trabalhos de seleção no melhoramento genético de plantas. Tais marcadores auxiliam em análises genômicas comparativas entre acessos, em análises genéticas de populações, em estudos envolvendo heranças a partir de cruzamentos interespecíficos, entre outros. Dependendo do tipo de marcador utilizado, é possível comparar os genomas de diferentes espécies, determinar seqüências conservadas e ainda se estas pertencerem a famílias distintas.





Em leguminosas, os estudos de sintenia, que se refere à conservação na ordem de genes entre espécies relacionadas, tem sido muito úteis na elucidação de genes ou rotas envolvidas em etapas importantes do desenvolvimento celular em genomas que apresentam homologia (MICHELMORE e MEYERS, 1998; SILVA, 2007). Nesta linha de pesquisa o gênero *Lotus* tem sido utilizado como planta modelo, já sendo descrito na literatura várias regiões sintenicas que podem ser utilizadas em estudos dessa natureza com outras leguminosas. Uma das vantagens desse estudo é que, com a descoberta dos domínios conservados entre o DNA de diversas espécies é possível a utilização de sequencias obtidas das regiões sintenicas para trabalhos de expressão em várias culturas que possuam regiões afins.

O presente trabalho objetivou testar 35 *primers* provenientes de bibliotecas de expressão das leguminosas *Lotus japonicus* L., *Glicine max* L. e *Medicago truncatula* L. com fins de analisar a divergência genética em dois acessos intraespecificos de amendoim.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 35 primers (senso e antisenso) do banco de dados de sequências expressas (ESTs) das leguminosas *Lotus japonicus* L., *Glicine max* L. e *Medicago truncatula* L. (<http://bioweb.abc.hu/cgi-mt/pisprim/pisprim.pl>) para amplificar regiões específicas do genoma de dois acessos de *Arachis hypogaea* L., a cultivar BR 1 (*A. hypogaea* sp. *fastigiata*) e linhagem LVIPE-06 1 (*A. hypogaea* sp. *hypogaea*), ambas características agrônômicas divergentes.

Para obtenção do DNA, folhas jovens foram coletadas, seguindo-se a metodologia de Doyle e Doyle (1990). As amostras foram quantificadas em gel de agarose (1,0%) e posteriormente aliqüotadas a 5 ng/µl para utilização em reações de PCR.

Para as reações de PCR, adotou-se o procedimento *touchdown* como a seguir: desnaturaçãõ inicial a 95 °C/5 min, seguida de oito ciclos de desnaturaçãõ a 94 °C/20 seg, anelamento a 60 °C/30 seg. e extensãõ a 72 °C/2 min. Em seguida, realizou-se 35 ciclos seguidos de desnaturaçãõ a 94 °C/20 seg, anelamento a 54 °C/ 30 seg. e extensãõ a 72 °C/2 min, finalizando com uma de 5 min. a 72 °C.

As reações foram compostas de 2,5 µL de DNA, 2,5 µL tampão 10x, 1,8 µL MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de dNTP mix (10 mM), 0,5 µL de *primer* (10 µM) e 0,1 U *Taq* DNA *polimerase*, em um volume final de 25 µL. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose (1,2 %), corados em BlueGreen e fotodocumentados.





Os produtos purificados foram seqüenciados no seqüenciador de capilar MegaBACE 1000 do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA, da UFRPE. Cada seqüenciamento foi realizado para as fitas senso e antisenso utilizando o Kit DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare). As seqüências foram analisadas pelo Programa Mega Bace Sequence Analyzer e dados fornecidos pelo programa Mega Bace Score Card.

A edição e alinhamento das seqüências foram obtidas pelo programa BioEdit V7.0.5.2 [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>] e ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/tools/es/cgi-bin/clustalw2>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 35 *primers* utilizados, 18 geraram produtos de PCR na forma de bandas simples, duplas ou triplas, sendo a maioria monomórficas, para ambos os acessos. Todas as bandas simples foram seqüenciadas e alinhadas, de onde foram observadas diferenças pontuais em alguns nucleotídeos, passíveis de serem identificados por meio de análise de restrição. Um detalhe do alinhamento entre as seqüências dos dois acessos de *Arachis*, obtido com *primer* Leg 450, encontra-se na Figura 1.

As seqüências de 200 pb geradas com o *primer* CYB6-1, sintetizado a partir de regiões sintênicas de genes de cloroplasto em leguminosas, foram seqüenciadas e alinhadas com *L. japonicus* L. (AP 002983.1), *G. max* L. (DQ 317523.1), *M. truncatula* L. (CU 633466.10) e *Pisum sativum* L. (HN 029370.1). Pela análise de BLAST, verificou-se elevada homologia entre os acessos, com média de 97%, e *E-value* variando entre $6e^{-79}$ e $7e^{-73}$ (Figura 2). Na Figura 3 encontra-se o alinhamento gerado entre as seqüências de *Arachis* e as demais leguminosas, obtido com o programa ClustalW2, de onde se verifica a elevada similaridade de nucleotídeos entre as citadas espécies. Em levantamento de seqüências depositadas no BLAST relativas a esta região gênica, percebe-se que ela é comum em varias leguminosas (*Lathyrus sativus*, HM 029371.1, *Cicer arietinum*, EU 835853.1), gramíneas (*Oryza sativa*, AY 522329.1) e brassicas (*Cucumis sativus*, DQ 865975.1, *Arabis hirsuta*, AP 009369.1), entre outras, todas com alto nível de homologia, denotando a conservação deste gene em varias famílias de plantas.

As reações que possibilitaram discriminação dos dois acessos foram as que contiveram os *primers* 1M-Gm, 4M-Gm e Leg036. Os produtos de PCR amplificados variaram no tamanho entre 400 a 1600 pb, sendo o *primer* 1M-Gm responsável pela produção de três regiões. Os produtos codificados por esses *primers* estão descritos na Tabela 1.





Apesar de eles serem conservados para várias leguminosas (SANDAL et al., 2003), percebe-se nessa figura que eles podem ser contributivos no uso de discriminação de acessos, o que parece ser muito interessante para os trabalhos de melhoramentos genético especialmente nos estudos com banco de germoplasma.

CONCLUSÃO

Regiões sintênicas de genes de cloroplasto são muito conservadas em leguminosas e oferecem oportunidade para posteriores estudos de rotas envolvendo genes situados em DNA de cloroplastos;

Os primers 1M-Gm, 4M-Gm e Leg036, apesar de serem obtidos de regiões sintênicas de leguminosas, podem ser utilizados em trabalhos de melhoramento para diferenciação entre acessos de *Arachis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.

MICHELMORE, R.W.; MEYERS, B.C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research*. **v.8, n.11, p. 1113-1130**, 1998.

SANDAL, N.; MADSEN, L.; RADUTOIU, S.; Krusell, L.; **Madsen**, E.; Kanamori, S.; SATO, S.; TABATA, S.; JAMES, E.; KRAUSE, K.; UDWARDI, M.; STOUGAARD, J. Mapping and Map based cloning of symbiotic genes in the model legume *Lotus japonicus*. *Annals of the 7th Congress of Plant Molecular Biology*, Barcelona, 2003.

SILVA, D.C.G. Mapeamento de genes de resistência da soja à ferrugem asiática e análise transcricional na interação patógeno-hospedeiro. 2007. 153p. Tese (Doutorado) – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.



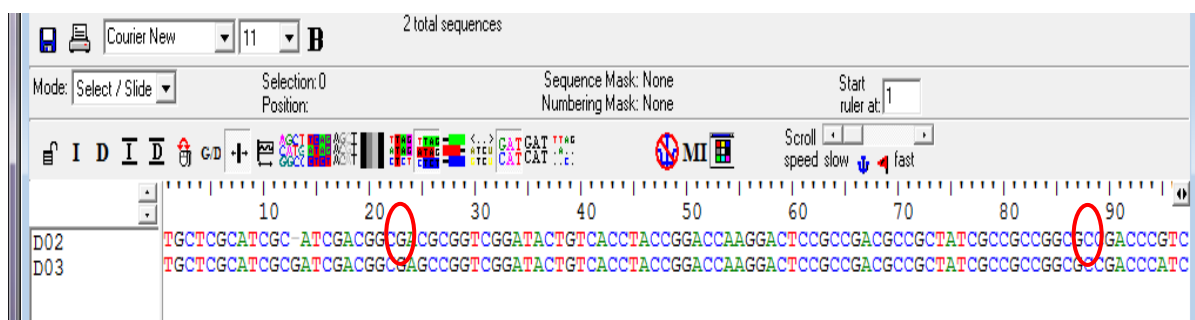


Figura 1. Detalhe do alinhamento entre os acessos de amendoim utilizando o primer Leg 450.

Tabela 1. Primers obtidos de leguminosas que geraram polimorfismo em *Arachis*

Primer	seqüência	Nº de bandas (pb)	Nº de bandas	Gene
1M-Gm	F: CTTGGGATGCAAGCCACGGTTGG R: TCCAGTGAGAAAASAAGYCCAAGGAAATG	1000; 500 e 300	3 - 2	<i>Chloroplast import apparatus</i>
4M-Gm	F: TTGCTTACTGGGCTAATTGTGG R: CAATAGAGTTYTGAATCAAACCAAC	400 - 500	1	β -ureidpropionase
Leg036	F: GCTAATATTGGACCAGAAACAATGTG R: GAAACTCAAGGCCAAAGAGGCCATG	1.500	1 - 0	<i>Sorbitol desidrogenase</i>

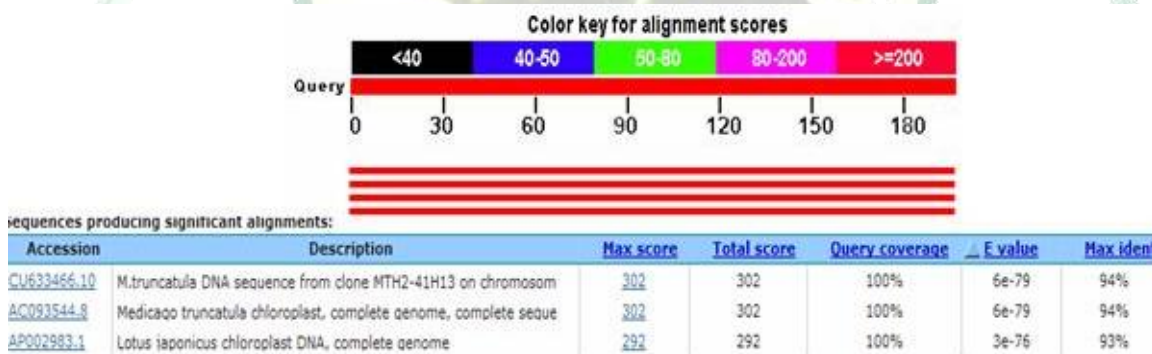


Figura 2. Análise de BLAST entre a seqüência gerada pelo primer CYB6-1 com *Arachis hypogaea* e as depositadas no Gene bank do NCBI (www.ncbi.nih.nlm.gov).



