

## EFEITO DA TETRAPLOIDIZAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE ARACHIS EM CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E ESTUDOS DE GENÔMICA FUNCIONAL

Soraya Leal-Bertioli<sup>1\*</sup>, David Bertioli<sup>2</sup>, Patricia Guimarães<sup>1</sup>, Ana Cláudia Guerra<sup>1</sup>, Carolina Morgante<sup>1</sup>, Vincent Vadez<sup>3</sup>, Joseane Padilha<sup>1</sup> & Ana Cristina Brasileiro<sup>1</sup>

O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea* L., é uma leguminosa, da subfamília Papilionidae. É um alotetraplóide de origem recente. Assim como várias outras espécies poliplóides, passou por um gargalo genético imposto por sua origem, quando duas espécies silvestres diplóides hibridizaram (*A. duranensis* and *A. ipaensis*) e a planta resultante sofreu duplicação cromossômica espontânea (HALWARD et al., 1991; SEIJO et al., 2007; SEIJO et al., 2004; YOUNG et al., 1996). Devido à diferença de ploidia, esse híbrido esteve reprodutivamente isolado dos seus parentes silvestres diplóides, o que levou à baixa diversidade genética do amendoim. Por outro lado, espécies silvestres de *Arachis* são mais diversas geneticamente e passaram por seleção evolucionária incluindo vários ambientes e estresses, acumulando então, uma grande quantidade de variações de caracteres agrônômicos de interesse. Para ampliar a diversidade alélica do amendoim, esforços têm sido feitos para introgridir genes, a partir de parentes silvestres diplóides (SIMPSON et al., 2003; STALKER et al., 2002; STALKER e LYNCH, 2002).

Espécies silvestres de *Arachis* podem ser encontradas em regiões extremamente adversas e muitas são resistentes a estresses bióticos (LEAL-BERTIOLI et al., 2010; NELSON et al., 1989; PROITE et al., 2008). São anatomicamente diversas do cultígeno, em termos de anatomia, área foliar, ciclo, tamanho e espessura de estolão, entre outras.

Resistência a doenças e pragas são uma limitação fundamental para a cultura do amendoim em várias regiões do mundo, especialmente onde recursos para controle fitossanitário são mais escassos. Nessas regiões a transferência de resistências a partir dos parentes silvestres são uma contribuição ainda mais significativa, pois contribuirão para a segurança alimentar desses povos. No entanto, essa introgressão tem sido limitada por diferença de ploidia entre os parentes silvestres e o cultígeno. Um caso de transferência de resistência no amendoim bem documentado originou duas cultivares resistentes ao nematóide das galhas, são elas COAN and NEMATAM (SIMPSON e STARR, 2001; SIMPSON et al., 2003).

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. E-mail: soraya@cenargen.embrapa.br

<sup>2</sup>Universidade de Brasília. Brasília, DF.

<sup>3</sup>ICRISAT, Pantacheru, Índia.

Uma das razões para o sucesso da introgressão da resistência ao nematóide em amendoim e para os esforços correntes de introgressão de resistências a fungos foliares é que essas características são codificadas por um ou poucos genes ou QTLs (GARCIA et al., 1996; GOWDA, 2008; LEAL-BERTIOLI et al., 2009). Entretanto, para tolerância a seca, o cenário é muito mais complexo: a capacidade de uma cultivar produzir sob estresse hídrico é devida a uma gama de características (anatômicas fisiológicas, bioquímicas), tornando a transferência dessa tolerância igualmente mais complexa.

Em programas de introgressão, o primeiro passo é eleger o parental com as características desejadas. Entretanto, aparece a questão: essa característica permanece uma vez que a ploidia é alterada? Essa questão leva a um segundo questionamento: considerando que o processo de cruzamento, tetraploidização e recuperação de anfidiplóides férteis, o que é mais eficiente: fenotipar os parentais diplóides e cruzar os mais interessantes ou cruzar acessos compatíveis e só depois avaliar as características relativas ao estresse hídrico?

Para tentar responder a essas questões, foram realizadas várias análises de características relacionadas à resposta ao estresse hídrico com dois acessos silvestres diplóides (*A. duranensis* V14167 e *A. ipaensis* KG30076), o anfidiplóide originado do cruzamento e tetraploidização desses, e as duas cultivares de amendoim mais plantadas no território brasileiro: *A. hypogaea* cv Tatu e *A. hypogaea* cv Runner. Foram analisados os seguintes parâmetros: eficiência de transpiração, curva de transpiração em função da FATS (fração de água transpirável no solo), índice SPAD, área foliar específica, variação de isótopo de carbono ( $\Delta C13$ ), e várias medidas de anatomia foliar.

Para espécies silvestres sob estresse hídrico gradual, a transpiração declina seguindo o mesmo padrão que o amendoim e outras espécies de leguminosas (SADRAS e MILROY, 1996; SINCLAIR e SERRAJ, 1995). Não houve diferenças significantes entre o ponto em que o declínio se inicia (threshold) entre silvestres e o cultivado Runner (variando entre 0,58 e 0,87. O anfidiplóide, por outro lado, teve um valor muito menor ( $0.30 \pm 0.05$ ).

A eficiência de transpiração (ET) foi avaliada em dois experimentos: as cultivares de amendoim apresentaram uma ET mais alta em relação aos demais genótipos (entre 3,22 e 4,08), sendo que o anfidiplóide apresentou a ET mais baixa (2,72 e 2,12). Os silvestres apresentaram valores intermediários. Esses dados sugerem que a biomassa dos indivíduos não determina os valores de ET, uma vez que as plantas silvestres são geralmente menores e com área foliar reduzida e a área foliar do anfidiplóide é semelhante àquela dos cultivados. Além disso pode-se observar-se que os valores de área foliar específica, SPAD, e dados de anatomia foliar seguem o mesmo padrão (ou falta de): alguns dados do anfidiplóide são mais similares ao parental *A. duranensis*, outros ao parental *A. ipaensis*, outros tornam-se totalmente semelhantes ao amendoim cultivado tetraplóide.

De todos os experimentos conduzidos ao longo de dois anos, algumas conclusões podem ser retiradas: existe um contraste definido entre espécies silvestres e cultivares de amendoim. Das vinte e uma características tessadas, dez modificam-se quando a planta é tetraploidizada, tornando-a mais próxima do amendoim cultivado (ex. área foliar, comprimento e espessura de estômatos, densidade de células epidérmicas); seis características assemelham-se às do parental *A. duranensis* (ex. índice estomático abaxial e adaxial, área foliar específica e variação de isótopo de carbono); quatro assemelham-se às do parental *A. ipaensis* (ex. densidade de tricomas na face abaxial, índice SPAD sob estresse e em plantas controle); e uma característica (razão entre a espessura da hipoderme e a espessura total da folha) apresentou-se diferente de qualquer outro genótipo testado. Considera-se que as características que permaneceram no anfidiplóide originadas dos parentais silvestres são passíveis de introgressão, enquanto que as outras são derivadas da tetraploidização ou de novas combinações alélicas.

Como esse estudo, conclui-se que a predição de como as características serão herdadas diante do processo de tetraploidização é baixa e parece depender da característica estudada. Apesar da necessidade de se validarem esses dados em um número maior de anfidiplóides, hoje já disponíveis (SANTOS et al., 2008), atualmente recomendamos que a fenotipagem de características relacionadas ao estresse hídrico seja realizada após o processo de cruzamento e tetraploidização.

A partir desses resultados, essa equipe vem engendrando esforços na área de genômica funcional para o estudo da resposta ao estresse hídrico em espécies silvestres de amendoim. Foi observado um comportamento fisiológico durante o estresse bastante diferente das cultivares de *A. hypogaea* testadas, como, por exemplo, uma rápida diminuição da taxa de transpiração em resposta à quantidade de água transpirável no solo. Três acessos silvestres foram então escolhidos como genótipos silvestres de referência do genoma tipo AA (*A. duranensis* acesso K7988) e do genoma tipo BB (*A. magna* acesso KG30097 e *A. ipaensis* acesso KG30076) para os estudos de genômica (BRASILEIRO et al., 2008; LEAL-BERTIOLI et al., 2007). O principal propósito da genômica funcional é o de alocar os genes contidos em um determinado genoma dentro de uma perspectiva funcional, visando identificar qual proteína é traduzida por cada gene, e qual o seu papel no funcionamento do organismo como um todo. Pesquisas aplicadas à prospecção de genes envolvidos com estresse hídrico estão sendo desenvolvidas para uma série de espécies vegetais (TUBEROSA; SALVI, 2006; VALLIYODAN; NGUYEN, 2006) visando identificar, isolar, caracterizar e validar a função biológica de genes associados à resposta à seca.

Nesse contexto, o transcrito de plantas de *A. magna* submetidas a estresse hídrico gradual, e seu respectivo controle não-estressado, foi analisado pela construção de duas bibliotecas subtrativas de cDNA (SSH) (BRASILEIRO et al., 2008; MORGANTE et al., 2009). A análise *in silico* revelou 759 leituras que foram agrupadas em 249 clusters (138 singlets e 111 contigs), com um índice

de novidade de 32,8%. Vários genes foram identificados como sendo regulados positiva ou negativamente nas condições de estresse ou de controle. O perfil de expressão de alguns desses genes diferencialmente regulados foi validado pela técnica de RT-PCR em tempo real, utilizando o cDNA de raízes e folhas. Genes que codificam, por exemplo, a *glycine descarboxilase*, *metallothionein-like protein*, *drought stress responsive protein* e duas proteínas desconhecidas são regulados positivamente durante o estresse hídrico enquanto que o gene que codifica para uma *disease responsive protein* é regulado negativamente durante o estresse hídrico. Assim, esses resultados revelaram que a expressão espacial e temporal desses genes estão fortemente correlacionados com os dados da análise in silico e com a resposta ao estresse. Os genes-candidatos de *A. magna* que se revelaram mais promissores serão, no futuro, isolados e introduzidos em plantas transgênicas modelo (como *Medicago truncatula*) ou alvo (amendoim) a fim de avaliar a regulação da sua expressão e o seu potencial papel nos mecanismos de resposta da planta ao estresse.

Dando continuidade às análises genômicas, mais recentemente, a equipe analisou o perfil global de expressão em dois tecidos (folha e raiz) de plantas de *A. duranensis* submetidas a estresse hídrico gradual, utilizando a tecnologia 454 de sequenciamento massal. Foram geradas 380.601 leituras com um tamanho médio de 293,24 nucleotídeos após limpeza. Depois do agrupamento e da montagem, um total de 12.840 sequências únicas foram geradas para *A. duranensis*. A interpretação funcional das sequências obtidas foi realizada por atribuições de Ontologia Gênica, mostrando uma cobertura para uma ampla gama de categorias. O índice de novidade foi de 29% e um número significativo de sequências foi identificado como sendo diferencialmente expresso entre as duas bibliotecas. Assim como realizado para *A. magna*, o perfil de expressão temporal e espacial dos genes-candidatos de *A. duranensis* serão posteriormente validados. Até o momento, esses são os únicos trabalhos de análise de transcrito de espécies silvestres de *Arachis* submetidas ao estresse hídrico.

O estudo do perfil de expressão pelo sequenciamento em larga escala de cDNA em espécies silvestres de *Arachis* submetidas a estresse hídrico gradual possibilitará a rápida e eficiente identificação de genes e de suas interações durante os processos de estresse abiótico. A análise in silico dessas sequências poderá revelar genes-candidatos, auxiliando na construção de um quadro comparativo em termos transcricionais do processo de resposta e adaptação das plantas ao estresse hídrico, podendo ser integrado ao conhecimento atual da tolerância das plantas ao estresse abiótico. Os conhecimentos gerados proporcionarão importantes alternativas com potencial aplicação na biotecnologia (seleção assistida por marcadores, introgressão/introdução de genes candidatos no amendoim cultivado), visando o desenvolvimento de cultivares de amendoim mais tolerantes à seca e mais adaptadas a condições ambientais adversas. Através de estudos de sintenia e genômica comparativa, será possível também estender esses conhecimentos para outras culturas de importância econômica para o País.

## Referências

- BRASILEIRO, A. C. M.; SANTOS, C. M. R.; MORGANTE, C. V.; MARTINS, A. C. Q.; SILVA, F. R.; ARAÚJO, A. C. G.; BERTIOLI, D. J.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M. GUIMARAES, P. M. Análise in silico da expressão diferencial de genes em *Arachis magna* sob estresse hídrico. Boletim de Pesquisa - série Embrapa. 218: 18 p. 2008.
- GARCIA, G. M.; STALKER, H. T.; SHROEDER, E. KOCHERT, G. Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. Genome, v.39, n.5, Oct, p.836-45, 1996.
- GOWDA, M. V. C. Genetic enhancement of resistance to foliar diseases - strategies and prospects. Advances in Arachis through Genomics and Biotechnology. Hyderabad, India. 4-8 November 2008, 2008. 66 p.
- HALWARD, T. M.; STALKER, H. T.; LARUE, E. A. KOCHERT, G. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and related wild species. Genome, v.34, p.1013-1020, 1991.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; FARIAS, M. P.; SILVA, PEDRO Í. T.; GUIMARÃES, P. M.; BRASILEIRO, A. C. M.; BERTIOLI, D. J. ARAUJO, A. C. G. Ultrastructure of the Initial Interaction of *Puccinia arachidis* and *Cercosporidium personatum* with Leaves of *Arachis hypogaea* and *Arachis stenosperma*. Journal of Phytopathology, v.158, n.11-12, p.792-796, 2010.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; JOSE, A. C. V. F.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; MORETZSOHN, M. C.; GUIMARAES, P. M.; NIELEN, S.; VIDIGAL, B. S.; PEREIRA, R. W.; PIKE, J.; FAVERO, A. P.; PARNISKE, M.; VARSHNEY, R. K. BERTIOLI, D. J. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. BMC Plant Biology, v.9, n.1, p.112, 2009.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; VADEZ, V.; GUIMARÃES, P. M.; SILVA, P. I. T.; MORAES, L. F. M. V.; BERTIOLI, D. J. ARAÚJO, A. C. G. Avaliação de espécies silvestres de *Arachis*, híbridos e cultivares de amendoim para características relacionadas à resposta ao estresse hídrico. Boletim de Pesquisa - série Embrapa. Brasília. 166: 16 p. 2007.
- MORGANTE, C. V.; MARTINS, A. C. Q.; ARAUJO, A. C. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; GUIMARAES, P. M. BRASILEIRO, A. C. M. Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica no gênero *Arachis*. Boletim de Pesquisa - série Embrapa. in press 2009.
- NELSON, S. C.; SIMPSON, C. E. STARR, J. L. Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* spp. germplasm. Journal of Nematology, v.21, p.654 - 660, 1989.
- PROITE, K.; CARNEIRO, R.; FALCÃO, R.; GOMES, A.; LEAL-BERTIOLI, S.; GUIMARÃES, P. BERTIOLI, D. Post-infection development and hisso pathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. Plant Pathology, v.57, n.5, p.974-980, 2008.

- SADRAS, V. O. MILROY, S. Soil-water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchange. *Field Crops Research*, v.47, p.253-266, 1996.
- SANTOS, S. P.; MORETZSOHN, M. C. BERTIOLI, D. J. Produção e caracterização de anfidiplóides sintéticos entre espécies silvestres de *Arachis*. 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador • BA 16 a 19 de setembro de 2008. p.
- SEIJO, G.; LAVIA, G. I.; FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D. A.; BERTIOLI, D. J. MOSCONE, E. A. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *American Journal of Botany*, v.94, n.12, December 1, 2007, p.1963-1971, 2007.
- SEIJO, J. G.; LAVIA, G. I.; FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D. MOSCONE, E. A. Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (leguminosae). *American Journal of Botany*, v.91, p.1294 - 1303, 2004.
- SIMPSON, C. E. STARR, J. L. Registration of 'COAN' peanut. *Crop Science*, v.41, p.918, 2001.
- SIMPSON, C. E.; STARR, J. L.; CHURCH, G. T.; BUROW, M. D. PATERSON, A. H. Registration of 'NemaTAM' Peanut. *Crop Science*, v.43, p.1561 - 1561, 2003.
- SIMPSON, C. E.; STARR, J. L.; CHURCH, G. T.; BURROW, M. D. PATERSON, A. H. Registration of NemaTAM peanut. *Crop Science*, v.43, p.1561, 2003.
- SINCLAIR, T. R. SERRAJ, R. Legume nitrogen fixation and drought. *Nature*, v.378, p.344, 1995.
- STALKER, H. T. LYNCH, R. E. Registration of Four Insect-Resistant Peanut Germplasm Lines. *Crop Science*, v.42, n.1, Jan, p.313-314, 2002.
- STALKER, H. T.; BEUTE, M. K.; SHEW, B. B. ISLEIB, T. G. Registration of Five Leaf Spot-Resistant Peanut Germplasm Lines. *Crop Science*, v.42, n.1, Jan, p.314-316, 2002.
- TUBEROSA, R. SALVI, S. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in plant science*, v.11, n.8, p.405-12, 2006.
- VALLIYODAN, B. NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v.9, n.2, p.189-95, 2006.
- YOUNG, N. D.; WEEDEN, N. F. KOCHERT, G. Genome mapping in legumes (Family Fabaceae) In: A. H. Paterson (Ed.). *Genome mapping in plants*. Austin, TX: RG Landes, 1996. Genome mapping in legumes (Family Fabaceae).