

Notas Científicas

Identificação de SNPs para conteúdo de ácidos graxos em soja pela técnica HRM

Maria Fernanda Antunes da Cruz⁽¹⁾, Rafael Delmond Bueno⁽²⁾, Franciele Barros de Souza⁽²⁾, Maurilio Alves Moreira⁽²⁾ e Everaldo Gonçalves de Barros⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Biologia Geral, Avenida P.H. Rolfs, s/nº, CEP 36570-000 Viçosa, MG, Brasil. E-mail: fertunes@bol.com.br, ebarros@ufv.br ⁽²⁾UFV, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. E-mail: rafaeldbueno@yahoo.com.br, francielesouza@gmail.com, moreira@ufv.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi identificar SNPs em genes associados ao conteúdo de ácidos graxos em soja e implementar a metodologia “high resolution melting” (HRM) para genotipagem desses SNPs. Os iniciadores HRM foram desenhados para discriminar os alelos SNPs em duas populações de mapeamento (RILs e F₂) e seguiram o padrão esperado de segregação. Os SNPs do gene *ABI* associaram-se significativamente ao conteúdo de ácido esteárico ($R^2 = 12,14$), e os do gene *FAD3B*, aos conteúdos de ácido oleico ($R^2 = 14,69$) e linolênico ($R^2 = 10,62$). A técnica de genotipagem dos SNPs por HRM é eficiente na discriminação das classes genotípicas.

Termos para a indexação: genotipagem, marcador molecular, melhoramento vegetal, polimorfismos de nucleotídeo único, seleção assistida por marcadores.

Identification of SNPs for fatty acid content in soybean by the HRM technique

Abstract – The objective of this work was to identify SNPs in genes associated with fatty acid content in soybean and to implement the high resolution melting (HRM) technique for SNP genotyping. HRM primers were designed to discriminate SNP alleles in two mapping populations (RILs and F₂) and followed the expected pattern of segregation. The *ABI* gene SNPs were significantly associated with stearic acid content ($R^2 = 12.14$), and the ones from the *FAD3B* gene, with oleic ($R^2 = 14.69$) and linolenic acid ($R^2 = 10.62$) contents. The technique of genotyping SNPs by HRM is efficient to discriminate genotype classes.

Index terms: genotyping, molecular marker, plant breeding, single nucleotide polymorphisms, marker assisted selection.

Polimorfismos de nucleotídeo único (“single nucleotide polymorphisms”, SNPs) consistem em pequenas variações de nucleotídeos (inserções ou deleções) nas sequências de bases de fragmentos homólogos de DNA. Esse tipo de variação é a mais frequente forma de polimorfismo observada no genoma (Collins et al., 1998).

Um grande esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento de tecnologias de genotipagem mais precisas, rápidas e de baixo custo para a análise de SNPs (Rafalski, 2002). A técnica de dissociação em alta resolução (“high resolution melting”, HRM) é um método homogêneo, rápido e simples de análise pós-PCR. A HRM é suficientemente sensível para permitir a detecção de mudança em apenas uma base,

entre sequências de nucleotídeos. A técnica baseia-se na variação da temperatura média de fusão (T_m) que ocorre com mudança na sequência de bases. Assim, na análise de SNPs por HRM, os alelos homocigotos e heterocigotos, por apresentarem valores de T_m diferentes, produzem curvas de dissociação com formatos distintos (Gundry et al., 2003; Wittwer et al., 2003; Graham et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi identificar SNPs em genes associados ao conteúdo de ácidos graxos em soja (*Glycine max* L.) e implementar a metodologia “high resolution melting” (HRM) para genotipagem desses SNPs.

Para a genotipagem dos SNPs, foram utilizadas duas populações segregantes: uma formada de

linhagens endogâmicas recombinantes (“recombinant inbred lines”, RILs), originadas do cruzamento entre genótipos contrastantes quanto ao teor de ácido oleico (FA22 x CD219); e outra formada por uma população F₂, contrastante quanto ao teor de ácido linolênico (A29 x Tucunaré). O genótipo A29 (1% de ácido linolênico) foi desenvolvido, por meio de mutagênese, por pesquisadores da Universidade Estadual de Iowa, EUA. O genótipo FA22 foi selecionado de uma população em melhoramento e apresenta teor normal de ácido linoleico e elevado conteúdo de ácido oleico (aproximadamente 50%). A variedade CD219RR, desenvolvida pela Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec), e a variedade Tucunaré, desenvolvida pela Fundação Matogrosso, apresentam teores normais de ácido linolênico (~8%) e ácido oleico (~19%).

Com base em informações disponíveis na literatura, foram selecionados quatro genes candidatos (*ABI3*, *LPCAT*, *ARAF* e *PDAT*) diretamente relacionados à síntese e à regulação do teor de ácidos graxos em grãos de soja (Baud & Lepiniec, 2010). Além desses, selecionaram-se, também, os genes *FAD3B* e *FAD3C*, que codificam as ω-3-dessaturases e afetam o acúmulo de ácido linolênico em grãos de soja (Bilyeu et al., 2006; Pinto et al., 2013), para os quais já foram desenvolvidos marcadores SNPs (Bilyeu et al., 2006). Portanto, no presente trabalho, testou-se a efetividade

da metodologia HRM para a genotipagem desses SNPs, nas populações: A29 x Tucunaré e FA22 x CD219RR, uma vez que seu uso é promissor para a seleção de genótipos superiores de soja (Bilyeu et al., 2005, 2006, 2011; Reinprecht et al., 2009; Pinto et al., 2013).

As sequências parciais dos quatro genes candidatos foram obtidas a partir do GenBank (National Center for Biotechnology Information, 2013). As sequências gênicas completas (regiões promotoras, regulatórias, terminadoras, íntrons e exons) dos genes *ABI3* (Glyma18g38490.1), *LPCAT* (Glyma05g03510.1), *ARAF* (Glyma03g27460.2), *PDAT* (Glyma17g05910.1), *FAD3B* (Glyma02g39230) e *FAD3C* (Glyma18g06950) foram obtidas com uso da ferramenta “basic local alignment search tool” (Blast), no banco de dados Phytozome (2013), no qual está depositado o genoma sequenciado da soja (Schmutz et al., 2010).

Folhas de plantas das populações RILs e F₂ foram coletadas 15 dias após o plantio, para a extração e a análise do DNA por meio da metodologia Doyle & Doyle (1990), com modificações. A concentração e a qualidade do DNA foram determinadas com o espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, EUA). Para discriminar os alelos SNPs dos genes descritos na Tabela 1, foram desenhados iniciadores para a genotipagem HRM com auxílio do programa Primer 3.

Tabela 1. Genes candidatos, cromossomos, regiões gênicas (CDS, 5’UTR e 3’UTR), alelos de SNP e sequências de iniciadores HRM.

Gene	Cromossomo	Regiões gênicas	SNP	Iniciador	SNP investigado	
População FA22 x CD219						
<i>ARAF3.5</i>	3	5’UTR	AC/TA	Fwd Rev	CCCCCTCCTTTAACTCCTT GACTCACGGGTATGTTTGAA	AC
<i>PDAT17.5.1</i>	17	5’UTR	C/T	Fwd Rev	CCCACGCACACTTAAACAAA CGGATTCTGTGACAGTGACG	C
População A29 x Tucunaré						
<i>LPCAT5.3.1</i>	5	3’UTR	TC/AT	Fwd Rev	ACAGCTCCTTTGGTCTCGAA CAAACCTGCCAACAAGATGT	TC
<i>LPCAT5.3.2</i>	5	3’UTR	C/T	Fwd Rev	TTCCTGAAATGTCTGGGACAG GATTTTCAGGGCATTCTAAACC	C
<i>LPCAT5.3.3</i>	5	3’UTR	_/AG	Fwd Rev	TCTTTTGCATGTATGGCCTCT ATGGAGACTTCTCGCTCTCC	AG
<i>LPCAT5.3.4</i>	5	3’UTR	TT/CC	Fwd Rev	CCAATCGAAGTACCATTCTCG AGTCCAACACCATGTTTCATTG	TT
<i>FAD3C</i>	3	CDS	C/T	Fwd Rev	TGGCACCCATGTTATCCAT GAGAATTAATACCGCTTCGATT	C
<i>FAD3B</i>	3	CDS	G/A	Fwd Rev	GCTGTTCTTGAACATGGCTCT ATGAGTCTTGTCTATGTCTA	G
<i>ABI3.18.5</i>	18	5’UTR	A/C	Fwd Rev	GCGACTCGCACTGTTTCATAA TTGCTCCTACTCCTTGTGTTG	C

Os parâmetros utilizados para desenhar os iniciadores foram: tamanhos entre 18 e 27 nucleotídeos, Tm entre 57 e 63°C, conteúdo de CG (citosina + guanina) entre 20 e 80%, e tamanhos dos produtos de amplificação entre 60 e 90 pb. Após o desenho dos iniciadores, foram preditas estruturas secundárias, tanto neles quanto nos amplicons, por meio do programa DINAMelt Server (University at Albany, Albany, NY, EUA). A especificidade dos iniciadores foi testada com o programa PCR virtual (iPCR) e com o banco de dados Phytozome (2013).

As reações de genotipagem, utilizadas para discriminar os alelos de SNPs nas duas populações, foram realizadas em volume de 10 µL, contendo 5 µL de 2x HRM PCR Master Mix (Qiagen, Mainz, Alemanha), 0,7 µL a 10 µmol L⁻¹ de cada iniciador, 3,3 µL de água livre de RNase e 1 µL de DNA a 15 ng µL⁻¹. As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador Rotor-Gene "real-time rotary analyzer" (Qiagen, Mainz, Alemanha), com etapa inicial a 95°C por 2 min, seguida de: 40 ciclos de 95°C por 5 s, 40 ciclos de 60°C por 10 s e HRM (73–83°C, incremento de 0,1°C), 2 s por passo. Realizadas as reações de amplificação, os dados foram analisados por meio do programa do próprio aparelho.

A composição de ácidos graxos na fração óleo foi determinada por cromatografia gasosa. As etapas de extração e transesterificação dos ácidos graxos em metil-ésteres derivados foram realizadas segundo a metodologia de Bubeck et al. (1989). Os metil-ésteres derivados foram fracionados em coluna Carbowax de 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno. As temperaturas da coluna e do injetor foram mantidas a 240°C, e a do detector, a 280°C.

A análise de segregação de cada marcador foi feita por meio do teste qui-quadrado, a 5% de probabilidade, tendo-se utilizando o critério de proteção Bonferroni. A associação do marcador com as características foi analisada nas duas populações (RILs e F₂) e determinada pela análise de mapeamento por marca simples, por meio de regressão linear. Todas as análises estatísticas apresentadas foram realizadas com o aplicativo QMOL (Cruz & Schuster, 2004).

Os marcadores genotipados nas duas populações estudadas seguiram o padrão esperado de segregação: 1:1, na população de RILs; e 1:2:1, na população F₂ (Tabela 2). Apenas os iniciadores LPCAT5.3.3 e PDAT17.5.1 não discriminaram eficientemente os indivíduos conforme o alelo de interesse. Com os demais iniciadores, a genotipagem HRM foi capaz de determinar a frequência dos SNPs nas duas populações de mapeamento e determinar o perfil de homozigose e heterozigose (Tabela 2 e Figura 1).

A análise de associação marcador-característica permitiu verificar que o SNP no gene *FAD3B* associase de forma significativa (Tabela 3) aos teores de ácido oleico (R²=14,69) e linolênico (R²=10,62), resultado similar aos descritos por Pinto et al. (2013). Já o SNP no gene *ABI* associou-se significativamente com o teor de ácido esteárico (R²=12,14), na população A29 x Tucunará (F₂). Não foi detectada associação significativa com nenhum dos marcadores testados na população de RILs FA22 x CD219RR.

O uso da técnica HRM em soja é eficiente, simples e de fácil implementação. O perfil descrito na literatura para a discriminação dos alelos homozigotos e heterozigotos dos SNPs avaliados foi confirmado, e o método de genotipagem testado mostra-se eficiente para a seleção assistida por marcadores moleculares.

Tabela 2. Teste de segregação com os marcadores moleculares genotipados nas populações FA22 x CD219 (RILs) e A29 x Tucunará (F₂)⁽¹⁾.

Gene	FA22 x CD219						A29 x Tucunará					
	AA	Aa	aa	Hipótese	χ ²	Probabilidade	BB	Bb	bb	Hipótese	χ ²	Probabilidade
<i>ARAF3.5</i>	35	-	33	1:1	0,059	80,83 ^{ns}	-	-	-	-	-	-
<i>ABI3.18.5.1</i>	-	-	-	-	-	-	19	25	19	1:2:1	2,68	26,15 ^{ns}
<i>FAD3B</i>	-	-	-	-	-	-	9	38	14	1:2:1	4,5	10,49 ^{ns}
<i>FAD3C</i>	-	-	-	-	-	-	15	29	19	1:2:1	2,5	63,61 ^{ns}
<i>LPCAT5.3.1</i>	-	-	-	-	-	-	20	29	15	1:2:1	1,34	51,07 ^{ns}
<i>LPCAT5.3.2</i>	-	-	-	-	-	-	21	27	16	1:2:1	2,34	30,97 ^{ns}
<i>LPCAT5.3.4</i>	-	-	-	-	-	-	19	27	18	1:2:1	1,59	45,07 ^{ns}

⁽¹⁾Nível crítico, 0; total de testes, 7; critério de proteção Bonferroni; número de distorções, 0.

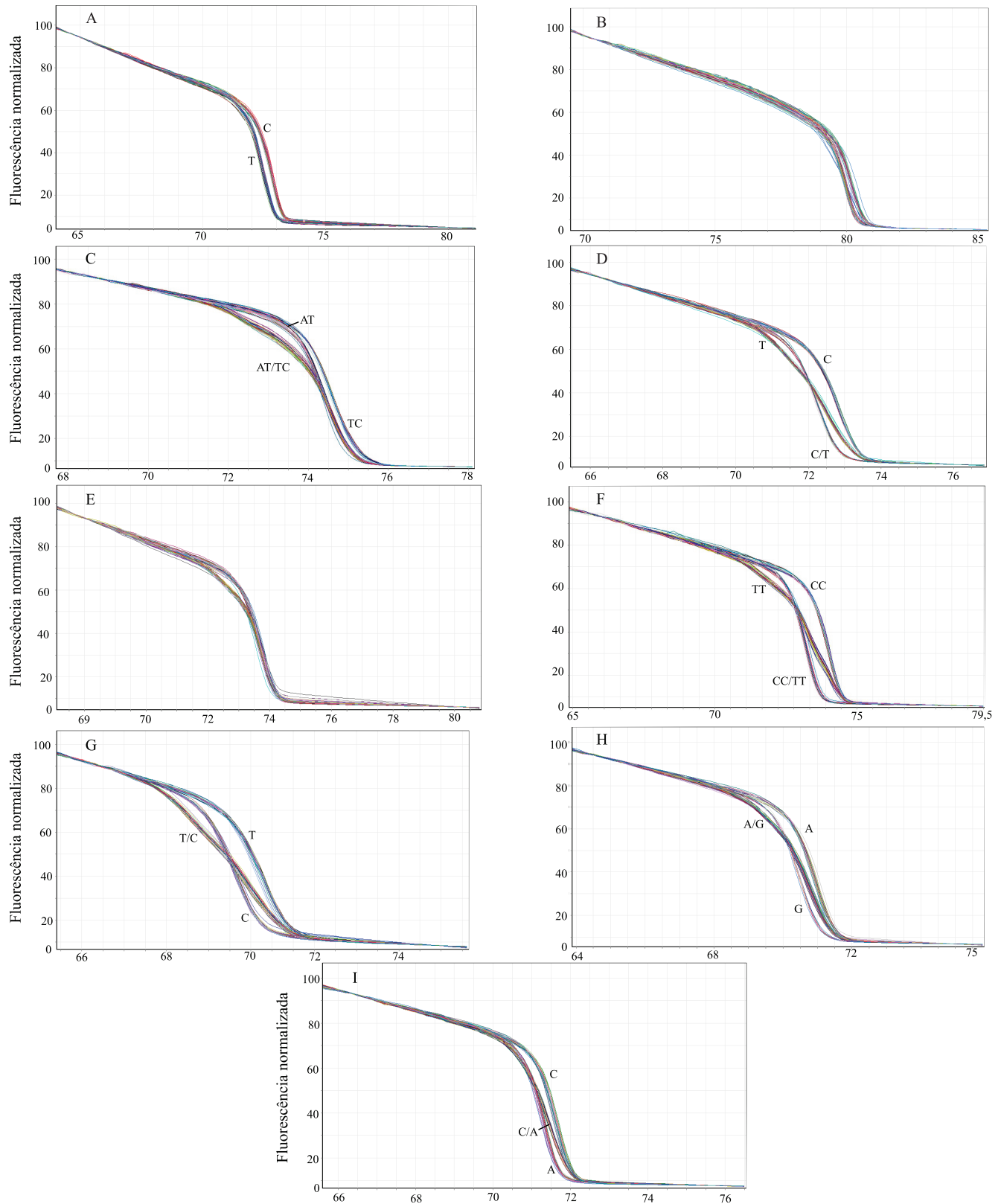


Figura 1. Análise de HRM para: população de RILs (FA22 x CD219), *ARAF3.5* (A) e *PDAT17.5.1* (B); e população F₂ (A29 x Tucunaré), *LPCAT5.3.1* (C), *LPCAT5.3.2* (D), *LPCAT5.3.3* (E), *LPCAT5.3.4* (F), *FAD3C* (G), *FAD3B* (H) e *ABI3.18.5* (I). Cada linha corresponde a um indivíduo das progênie analisadas.

Tabela 3. Análise associativa dos marcadores SNP com a composição de ácidos graxos, avaliados na população derivada do cruzamento entre A29 x Tucunará, em F₂.

Gene	Ácido palmítico			Ácido esteárico			Ácido oleico			Ácido linoleico			Ácido linolênico		
	F	Média	R ² %	F	Média	R ² %	F	Média	R ² %	F	Média	R ² %	F	Média	R ² %
<i>ABI3.18.5</i>	0,098	11,04	7,44	0,020*	4,04	12,14	1,00	17,58	0,23	1,00	60,44	2,17	0,36	6,80	3,33
<i>FAD3B</i>	1,00	11,17	1,53	0,10	3,90	7,62	0,001**	17,84	14,69	1,00	60,17	1,18	0,03*	6,74	10,62
<i>FAD3C</i>	0,10	11,02	7,19	1,00	4,00	2,71	1,00	17,54	1,82	0,36	60,26	3,30	0,09	7,05	7,47
<i>LPCAT5.3.1</i>	0,26	11,18	4,25	1,00	3,98	1,18	1,00	17,73	2,88	0,17	60,58	5,50	0,24	6,51	4,55
<i>LPCAT5.3.2</i>	0,06	11,23	8,50	1,00	3,97	2,64	1,00	17,33	1,18	1,00	60,40	0,30	1,00	6,65	0,58
<i>LPCAT5.3.4</i>	0,26	11,18	4,21	1,00	3,98	2,06	1,00	17,76	2,33	1,00	60,40	0,65	1,00	6,66	0,52

**e*Significativo a 1 e 5% de probabilidade.

Referências

- BAUD, S.; LEPINIEC, L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. **Progress in Lipid Research**, v.49, p.235-249, 2010. DOI: 10.1016/j.plipres.2010.01.001.
- BILYEU, K.; GILLMAN, J.D.; LEROY, A.R. Novel FAD3 mutant allele combinations produce soybeans containing 1% linolenic acid in the seed oil. **Crop Science**, v.51, p.259-264, 2011. DOI: 10.2135/cropsci2010.01.0044.
- BILYEU, K.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D.A.; BEUSELINCK, P. Molecular genetic resources for development of 1% linolenic acid soybeans. **Crop Science**, v.46, p.1913-1918, 2006. DOI: 10.2135/cropsci2005.11-0426.
- BILYEU, K.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D.; BEUSELINCK, P. Mutations in soybean microsomal omega-3 fatty acid desaturase genes reduce linolenic acid concentration in soybean seeds. **Crop Science**, v.45, p.1830-1836, 2005. DOI: 10.2135/cropsci2004.0632.
- BUBECK, D.M.; FEHR, W.R.; HAMMOND, E.G. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. **Crop Science**, v.29, p.652-656, 1989. DOI: 10.2135/cropsci1989.0011183X002900030021x.
- COLLINS, F.S.; BROOKS, L.D.; CHAKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. **Genome Research**, v.8, p.1229-1231, 1998. DOI: 10.1101/gr.8.12.1229.
- CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 2.1. Viçosa: Ed. da UFV, 2004.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- GRAHAM, R.; LIEW, M.; MEADOWS, C.; LYON, E.; WITTEWER, C. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. **Clinical Chemistry**, v.51, p.1295-1298, 2005. DOI: 10.1373/clinchem.2005.051516.
- GUNDRY, C.N.; VANDERSTEEN, J.G.; REED, G.H.; PRYOR, R.J.; CHEN, J.; WITTEWER, C.T. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. **Clinical Chemistry**, v.49, p.396-406, 2003. DOI: 10.1373/49.3.396.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed on: 6 Aug. 2013.
- PHYTOZOME. **Glycine max (Soybean)**. Available at: <http://www.phytozome.net/soybean>. Accessed on: 6 Aug. 2013.
- PINTO, M. de O.; GOOD-GOD, P.I.V.; MOREIRA, M.A.; DE BARROS, E.G. de. Associação de marcadores moleculares SNP com o conteúdo de ácido linolênico em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.263-269, 2013. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000300004.
- RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.94-100, 2002. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00240-6.
- REINPRECHT, Y.; LUK-LABEY, S.Y.; LARSEN, J.; POYSA, V.W.; YU, K.; RAJCAN, I.; ABLETT, G.R.; PAULS, K.P. Molecular basis of the low linolenic acid trait in soybean EMS mutant line RG10. **Plant Breeding**, v.128, p.253-258, 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2008.01571.x.
- SCHMUTZ, J.; CANNON, S.B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D.L.; SONG, Q.; THELEN, J.J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G.D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M.K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X.C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H.T.; WING, R.A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R.C.; JACKSON, S.A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v.463, p.178-183, 2010. DOI: 10.1038/nature08670.
- WITTEWER, C.T.; REED, G.H.; GUNDRY, C.N.; VANDERSTEEN, J.G.; PRYOR, R.J. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clinical Chemistry**, v.49, p.853-860, 2003. DOI: 10.1373/49.6.853.

Recebido em 7 de agosto de 2013 e aprovado em 29 de novembro de 2013