

BANCO DE DADOS DE *PRIMERS* DERIVADOS DE LOCOS MICROSSATÉLITES DO GENOMA ESTRUTURAL DO ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Luciano Carlos da Maia⁽¹⁾, Darío Abel Palmieri⁽²⁾, Mauricio Marini Kopp⁽¹⁾, Ariano Martins de Magalhães Junior⁽³⁾, Fernando Irajá Félix de Carvalho⁽¹⁾, Antonio Costa de Oliveira⁽¹⁾.¹Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPel, Campus Universitário, s/nº · Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS; ²Laboratório de Estudos em Meio Ambiente - Universidade Católica do Salvador; ⁽³⁾Embrapa Clima Temperado - lmaia.faem@ufpel.edu.br

Marcadores moleculares são marcadores de DNA baseados na utilização de *primers* (iniciadores) os quais podem acessar posições de um genoma e detectar polimorfismo em nível molecular, seja de um loco específico ou do genoma como um todo. Existem diversos tipos de marcadores moleculares: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e Microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeat*) (Varshney et al., 2005). Esses diferentes marcadores moleculares diferem com respeito a características importantes como: abundância e distribuição genômica, nível de polimorfismo detectado, informação genética por loco, reprodutibilidade, requerimentos técnicos, custo e investimento financeiro.

Prover ferramentas para conhecimento de genomas é uma aplicação básica dos marcadores moleculares. Nesse sentido, têm sido usados em análises genéticas com as mais diferentes finalidades, tais como: identificação de clones e cultivares, relações filogenéticas e de parentesco, fluxo gênico, construção e saturação de mapas genéticos, entre outras. Num aspecto mais aplicado, os marcadores moleculares em plantas são utilizados em estratégias como mapeamento comparativo, mapeamento associativo e na seleção assistida por marcadores moleculares (*MAS - Marker Assisted Selection*). Esta última é uma poderosa ferramenta para a seleção indireta de caracteres que apresentam dificuldade de observação nos primeiros estádios de seleção podendo acelerar a seleção das novas gerações e facilitar o processo de melhoramento convencional. Neste sentido, microssatélites são marcadores ideais devido a sua alta reprodutibilidade, natureza multi-alelica, característica co-dominante e ampla distribuição no genoma (Varshney et al., 2005).

Até alguns anos atrás a grande limitação para utilização em grande escala destes marcadores era a obtenção de *primers* específicos usados para amplificação dos SSRs, o que elevava o custo da técnica, demandando intensa mão-de-obra e tempo de execução. Atualmente, com o acúmulo de dados biológicos providos por iniciativas de seqüenciamento de genomas e a utilização da bioinformática é possível maximizar a identificação de um grande número de microssatélites aumentando assim a eficiência no desenvolvimento destes marcadores. Através de algoritmos específicos existe a possibilidade de localizar esses locos nos bancos de seqüências disponíveis. McCouch et al. (2002) através do IRMI (*The International Rice Microsatellite Initiative*) desenvolveram 2.414 marcadores SSRs com base nos dados de seqüenciamento do genoma do arroz produzidos pela Monsanto (www.rice-research.org) e pelo consórcio IRGSP (*International Rice Genome Sequencing Project*). Após a montagem e anotação final feita pelo IRGSP, 18.828 SSRs foram identificados utilizando o programa SSRIT (*The Simple Sequence Repeat Identification Tool* – www.gramene.org) (IRGSP, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um banco de dados para marcadores microssatélites em arroz onde sejam disponibilizadas todas as informações referentes aos locos amplificados (motivo repetido, comprimento, posição no genoma, pares de *primers* específicos, etc).

Foi utilizado o banco de dados contendo a versão final do genoma do arroz (*Oryza sativa* spp. *japonica* cv. Niponbare), seqüenciado pelo consórcio IRGSP (*International Rice Genome Sequence Project*) (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/IRGSP/Build4/build4.html>). Para a localização dos microssatélites e desenho dos *primers* foi usado o programa *SSRLocator* (Maia et al. 2007). Os requisitos estabelecidos foram: tamanho do *amplicom* (mínimo de 100 e máximo de 300 pb), tamanhos dos *primers* (mínimo de 15, máximo de 25 e ótimo de 20 pb), temperatura de anelamento (mínima de 45, máxima de 60 e ótima de 55°C) e conteúdo de GC (mínimo de 20 e ótimo de 50%) (Palmieri et al., 2005).

Na Tabela 1 é apresentado um resumo dos resultados obtidos com o total de *primers* desenhados para cada cromossomo do genoma do arroz. A lista completa contendo todos os SSRs localizados e os respectivos pares de *primers* desenhados, conforme o modelo mostrado na Tabela 2, está depositada na *HomePage* do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da FAEM/UFPEL (<http://www.ufpel.tche.br/faem/fitotecnia/fitomelhoramento/>).

Tabela 1. Total de *primers* desenhados para locos SSR no genoma do arroz. CGF/FAEM/UFPEL, Pelotas, 2007.

Cromossomo	<i>Primers</i>
1	2.910
2	2.490
3	2.545
4	1.856
5	1.953
6	1.991
7	1.794
8	1.843
9	1.501
10	1.393
11	1.767
12	1.773
Total	23.816

Tabela 2. Modelo da lista usada no banco de dados para apresentação das informações dos microssatélites identificados no genoma do arroz. CGF, 2007.

CR.	Número Loco	<i>FORWARD</i>	T.M.	
1	2	TTGAAGACTACCGAATAAGA	50	
1	3	ATTCGCTATGGTATAATTGA	50	
		<i>REVERSE</i>	T.M.	T.A.
1	2	GAGATTGAAATCTGATGATG	50	264
1	3	CTGAAGTAAGGAGATTGCTA	50	180

CR. = cromossomo; T.M.= temperatura de denaturação; T.A. = tamanho do *amplicom*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.97, n.5-6, p.816-827, 1998.

BRONDANI, R.P.V.; ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; BORBA, T.C.O.; RANGEL, P.N.; MAGALHÃES, M.R.; VENCOVSKY, R. Genetic structure of wild rice *Oryza*

glumaepatula populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. **Genetica**, v.125, n.2-3, p.115-123, 2005.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A. Y.C.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V.; Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.29, p.46-50, 2003.

INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.1, n.7052, p.793-800, 2005.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**. v.44, n.3, p.397-401. 1989.

MAIA, L.C. Desenvolvimento de ferramenta para análise *in silico* da ocorrência de microssatélites (*simple sequence repeats*) no genoma do arroz. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Brasil, 2007.

MCCOUCH, S.R.; TEYTELMAN, L.; XU, Y.; LOBOS, K.B.; CLARE, K.; WALTON, M.; FU, B.; MAGHIRANG, R.; LI, Z.; XING, Y.; ZHANG, Q.; KONO, I.; YANO, M.; FJELLSTROM, R.; DECLERCK, G.; SCHNEIDER, D.; CARTINHO, S.; WARE, D.; STEIN, L. Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research**, v.9, n.6, p.199-207, 2002.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.175-182, 1993.

PALMIERI, D.A.; ASTUA-MONGE, G.; BASILIO, A.; LIMA, V.; BACOCINA, G.; RONCOLETTA, J.G.T.; MACHADO, M.A. *In silico* identification and characterization of SSRs from Citrus ESTs. In: **Plant & Animal Genome XIV**, 2005, San Diego. Final Abstracts Guide, p.210-213, 2006.

RÖDER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M.E.; LEROY, P.; GANAL, M.W. A Microsatellite Map of Wheat. **Genetics**, v.149, n.4, p.2007-2023, 1998.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v.132, p.365-386, 2000.

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, v.39, n.2, p.277-287, 1996.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**. v.17, n.16, p.6463-6471, 1989.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, n.1, p.48-55, 2005.