

PREDIÇÃO FUNCIONAL DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À QTLs A PARTIR DO BANCO DE DADOS DO GENOMA DO ARROZ (*Oryza sativa* spp *japonica* cv *Nipponbare*).

Renata Juliana Ahler⁽¹⁾, Luciano Carlos da Maia⁽¹⁾, Juliana Severo Castelo Branco⁽¹⁾, Ivandro Bertan⁽¹⁾, Emília Malone⁽¹⁾, Fernando Irajá Félix de Carvalho⁽¹⁾, Antônio Costa de Oliveira⁽¹⁾. ¹Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPeL, Campus Universitário, s/nº · Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS – reahler@hotmail.com.br

Blocos de DNA contendo grupos de genes que mantêm interação linear com características fenotípicas são descritos como QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Mapeamentos com objetivo de localizar regiões genômicas próximas a blocos gênicos (QTLs), utilizam várias técnicas de biologia e marcadores moleculares, sendo que, a localização dessas posições, é obtida a partir da associação entre o polimorfismo de uma região do DNA e a segregação de um caráter. Dentre as várias técnicas de marcadores moleculares utilizadas com essa finalidade, uma grande quantidade de mapas genéticos e de QTLs foram obtidos por RFLP, que posteriormente possibilitaram o seqüenciamento daquele trecho recombinante do DNA que foi associado as variações fenotípicas ou variações de caracteres agrônômicos. Sendo o arroz considerado uma espécie modelo entre as Poáceas, após o término do seqüenciamento do seu genoma, o uso das informações depositadas no banco de dados da espécie pode auxiliar no reconhecimento da função de genes de espécies correlatas. O uso da bioinformática, permite localizar homologias entre seqüências de genes, RNAs, sondas derivadas de RFLP ou mesmo pontos de ancoramento de *primers* e desta forma predizer a função de um gene ou a proximidade de um marcador a um bloco de genes. O marcador *Xbcd9* derivado do cromossomo A4 do genoma do trigo (*Triticum aestivum aestivum* L.), disponível no banco de dados de Trigo e Aveia “*GrainGenes*” (USDA), foi mapeado em 1991 por James Nelson e Mark Sorrels (não publicado) e mostrou associação a diferenças no rendimento de grãos (HEIN et al., 1991).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a presença de região homóloga a essa sonda e descrever uma possível função gênica ou associação a um gene ou bloco de genes no genoma do arroz.

Primeiramente, foi localizado a seqüência da sonda RFLP (identificação: BCD9_WHE1F0042) no *GrainGenes* e posteriormente, através do programa *PrimerExpress*, foram desenhados os *primers*. Foram selecionados três genótipos, sendo as cultivares: BRS 7 “Taim” (spp *indica*) de origem brasileira, *Dawdam* (spp *japonica*) originário da Tailândia e *Taipei* (spp *japonica*) originário das Filipinas. Após a seleção, foi realizada uma reação de PCR para verificar a presença de regiões amplificadas pelos *primers* nas referidas cultivares de arroz.

Para a busca por homologias entre a seqüência da sonda RFLP e o genoma, foi utilizado o programa *BLASTN* (ALTSCHUL et al, 1990), para o alinhamento local de nucleotídeos, seguidos de uma análise minuciosa utilizando o pacote *VectorNTI*. Para obter informações do genoma do arroz (IRGSP, 2005) foi utilizado o portal NCBI (*National Center for Biotechnology Information*- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e para obter informações dos domínios e funções de genes, foi consultado o banco de dados EMBL-EBI/InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). A reação de PCR foi procedida com temperatura de anelamento (TM) de 60 °C e o resultado visualizado em gel de agarose 3% mediante a coloração com brometo de etídio.

A análise do gel de agarose mostrou que dentre os três genótipos de arroz analisados, os três foram positivos para presença de fragmentos amplificados, conforme mostrado na Figura 1. A partir do resultado positivo da existência de região amplificada no genoma do arroz, foi procedida a busca pelas homologias. O *BLASTN* (ALTSCHUL et al., 1990) resultou na ocorrência de duas regiões com seqüências concatenadas, nos cromossomos dois e nove, conforme a Figura 2, estes dois alinhamentos apresentaram

resultados “*E-Value*” de $1e^{-08}$ e $2e^{-23}$ para os cromossomos dois e nove, respectivamente, sendo que, no cromossomo dois, o total do alinhamento foi de 56 pares de bases e 334 para o cromossomo nove. A análise das duas regiões concatenadas mostrou que ambos alinhamentos ocorreram em trechos do genoma descritos como seqüências dos genes *Os09g0553200* e *Os02g0117700*. Para o gene *Os02g0117700* (cromossomo 9), o alinhamento da sonda foi dividido em 6 subseqüências (*hits*), sendo que cada uma dessas subseqüências mostrou homologia a trechos de *exons* transcritos, conforme mostrado na Figura 3. A função biológica para ambos genes contendo homologias, está descrita a partir da anotação oficial do IRGSP (*International Rice Genome Initiative*) feita por SASAKI, (IRGSP, 2005). Os genes estudados foram preditos como *UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase* e *UDP-glucose pyrophosphorylase*, conforme domínios descritos no *InterPro* (acesso IPR002618). No intuito de elucidar a função bioquímica das proteínas codificadas por esses genes, foi verificado no portal *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - Pathway maps for biological processes* - <http://www.genome.jp/kegg/>) que estas são enzimas envolvidas numa das etapas do metabolismo do amido e da sacarose. Os resultados obtidos confirmaram e esclareceram a relação do marcador *Xbcd9* e diferenças no rendimento de grãos, pois, a partir da homologia, foi possível confirmar que a região acessada por esse marcador é uma enzima que tem importância primordial no acúmulo de amidos e outros açúcares do grão, o que certamente resulta na diferença do rendimento de grãos. Um segundo aspecto, é que essa abordagem comparativa pode prover também marcadores moleculares que potencialmente serão informativos no arroz, se forem transpostos e utilizados na seleção assistida dessa espécie.

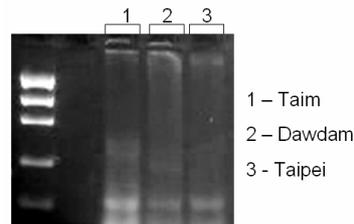


Figura 1. Gel de agarose mostrando *amplicons* em dois genótipos de arroz. CGF/FAEM/UFPel, Pelotas, 2007.

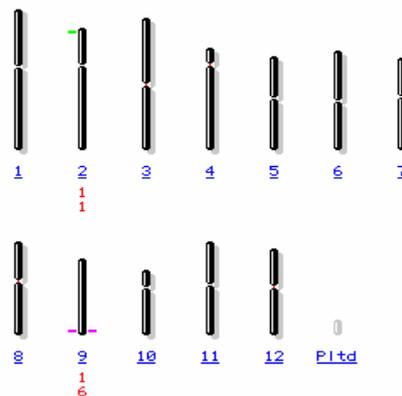


Figura 2. Alinhamento local de duas regiões homólogas entre a seqüência da sonda RFLP e regiões dos cromossomos 2 e 9 do genoma do arroz. CGF/FAEM/UFPel, Pelotas, 2007.

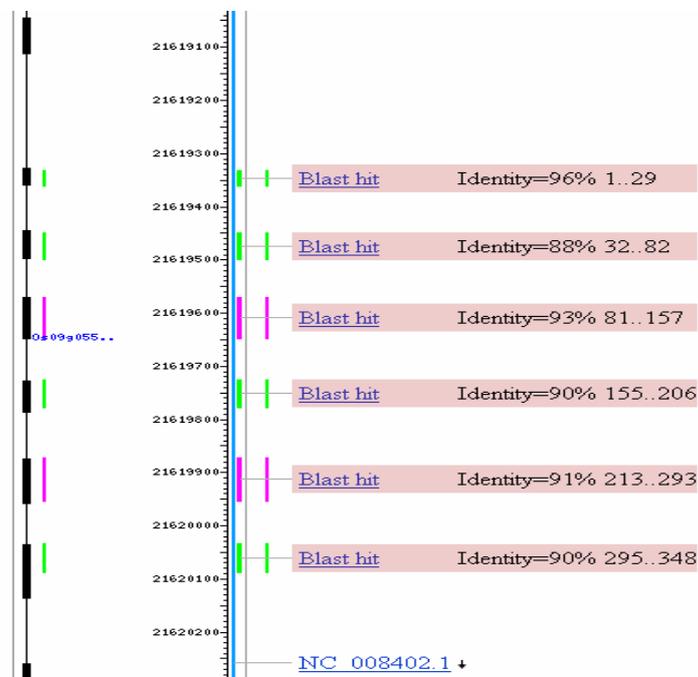


Figura 3. Alinhamento da sonda RFLP contra seis *exons* do gene *Os02g0117700* no cromossomo 9 do arroz. CGF/FAEM/UFPel, Pelotas, 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.5, n.215, p.403-10. 1990.

HEUN, M.; KENNEDY, A.E.; ANDERSON, J.A.; LAPITAN, N.L.V.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D. Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). **Journal Genome**, vol. 34, p.437-447, 1991.

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