



OCORRÊNCIA *in silico* DE MICROSSATÉLITES NO GENOMA DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Lolium*.

**CIMA, Francieli Fatima¹; AHLERT, Renata Juliana¹; MAIA, Luciano Carlos da¹;
BRESOLIN, Adriana Pires Soares¹; CARVALHO, Fernando Irajá Félix de¹;
COSTA DE OLIVEIRA, Antônio¹.**

¹Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPel, Campus Universitário, s/nº · Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS franci_cima@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) trata-se de uma planta rústica, vigorosa e agressiva, que perfilha em abundância, razão pela qual é uma das forrageiras mais cultivadas no Rio Grande do Sul, no inverno e na primavera, tanto para corte como para pastejo (PUPO, 1979). O azevém anual apresenta desenvolvimento inicial lento, entretanto, até o fim da primavera, supera as demais espécies em quantidade de forragem produzida. A ressemeadura natural contribui para que a espécie seja a mais difundida no Sul do Brasil. Produz alimento de elevado teor de proteína e de fácil digestão, sendo aparentemente muito palatável aos ruminantes. Na região da Campanha do Rio Grande do Sul, faz parte da mais tradicional consociação de pastagens cultivadas, ou seja, azevém / trevo branco / cornichão (FONTANELI et al, 1991). A espécie *Lolium temulentum* L., embora não possua importância econômica e agrícola, pode constituir uma fonte importante no estudo genético de forrageiras como o azevém.

Microssatélites ou SSRs (*Single Sequence Repeats*) são seqüências de nucleotídeos que se repetem em série, sendo tradicionalmente definidos como arranjos formados pela combinação de 2 a 6 bases (MORGANTE & OLIVIERI, 1993). Estas seqüências podem ser encontradas abundantemente em genomas de procariotos e eucariotos, em regiões codificadoras (*exons* transcritos e traduzidos), UTRs (*exons* transcritos e não traduzidos) ou ainda, em regiões de *introns* (seqüências não transcritas). Historicamente, microssatélites têm sido utilizados para ajudar na classificação e identificação de diferentes espécies (LAWSON & ZHANG, 2006).

Atualmente, várias iniciativas utilizam cDNA para o seqüenciamento de RNAs que, posteriormente, são depositados em bancos de dados conhecidos como ESTs (*Expressed Sequence Tags*)(VARSHNEY et al. 2002), os quais possibilitam a obtenção de marcadores moleculares microssatélites a partir de regiões expressas do genoma.

A obtenção de novos marcadores moleculares da classe dos microssatélites é, geralmente, uma tarefa demorada e de custos elevados, especialmente quando feita em laboratório a partir de protocolos convencionais. Assim, o uso da bioinformática para análise de bancos de dados que disponibilizam trechos de regiões seqüenciadas no DNA das espécies de interesse, em busca de regiões de DNA

repetitivo, pode fornecer novos marcadores moleculares para o estudo de espécies de interesse (VARSHNEY et al., 2005).

Este estudo objetivou verificar a ocorrência de microssatélites passíveis de serem utilizados como marcadores moleculares, através de buscas em bancos de dados, para as espécies *L. multiflorum* e *L. temulentum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A partir do *website* do TIGR (www.tigr.org) foram localizadas ESTs referentes ao genoma das espécies *L. multiflorum* e *L. temulentum* as quais foram depositadas em arquivos no padrão *Fasta* em computadores do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF/FAEM/UFPEl) e, posteriormente, analisados utilizando o programa computacional *SSRLocator* (MAIA et al., 2008) para localização dos microssatélites. O programa foi configurado para localizar microssatélites Classe I (≥ 20 pb) e Classe II (≥ 12 e < 20) (TEMNYKH et al., 2001), nos motivos compreendidos entre dímeros e hexâmeros, com número mínimo de seis repetições para dímeros, quatro para trímeros, três para tetrâmeros e pentâmeros e dois para hexâmeros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultados da busca no banco de dados foram obtidos o número de seqüências por espécie conforme mostrado na Tabela 1. Ainda na mesma tabela, é indicada a porcentagem de seqüências de microssatélites encontradas para as Classes I e II de cada espécie depositada no banco de dados.

A ocorrência total de microssatélites para a espécie *L. multiflorum* foi de 2311 locos e para a espécie *L. temulentum* foi de 1900 locos, incluindo as Classes I e II.

Na Tabela 2, estão indicados os valores percentuais da ocorrência de cada um dos motivos de repetição em relação ao total para cada uma das Classes. Foram detectados 45 microssatélites Classe I e 2266 microssatélites Classe II para a espécie *L. multiflorum* e para a espécie *L. temulentum*, 40 microssatélites Classe I e 1860 microssatélites Classe II. Analisando essa tabela, as principais diferenças encontradas, referentes às porcentagens de repetições, quando analisadas Classes I e II, foram o maior percentual encontrado dos locos hexâmeros (67,75% para *L. multiflorum* e 68,82% para *L. temulentum*) e quando analisados somente locos Classe I a predominância das ocorrências foi entre dímeros (26,67% para *L. multiflorum* e 22,5% para *L. temulentum*) e trímeros (39,33% para *L. multiflorum* e 40% para *L. temulentum*). Essa abundância de hexâmeros ocorreu devido ao número mínimo de apenas duas repetições consideradas para estes locos.

Apesar da Classe I gerar um número bastante inferior de microssatélites em relação à Classe II, o uso dessa classe como marcadores moleculares é mais interessante pelo fato desses microssatélites apresentarem maior polimorfismo e ainda, a probabilidade de ocorrência de mutações nessas seqüências é muito maior (TEMNYKH et al., 2001).

Tabela 1. Número de seqüências e porcentagem de seqüências de duas espécies do gênero *Lolium*, analisadas para ocorrência de microssatélites nas Classes I e II. CGF/FAEM/UFPEl, Pelotas, 2008.

Espécie	Número de Seqüências (ESTs)	Classe	% de Seqüências de SSR
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	5713	I	1,95

		II	98,05
		I	2,11
<i>Lolium temulentum</i> L.	5717	II	97,89

Tabela 2. Porcentagem de diferentes motivos de microssatélites Classes I e II em duas espécies analisadas do gênero *Lolium*. CGF/FAEM/UFPel, Pelotas, 2008.

Espécie	Classe	% Motivos/Repetições					
		DI	TRI	TETRA	PENTA	HEXA	TOTAL
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	I	26,67	33,33	11,11	11,11	17,78	45
	II	1,72	21,09	7,68	1,76	67,75	2266
<i>Lolium temulentum</i> L.	I	22,5	40	15	12,5	10	40
	II	2,07	20,3	7,36	1,45	68,82	1860

4. CONCLUSÃO

O número de locos microssatélites detectados é de grande valia do ponto de vista da obtenção de marcadores moleculares, pois, as quantidades de 45 e 40 locos microssatélites encontrados para *L. multiflorum* e *L. temulentum*, respectivamente, constituem uma fonte útil de marcadores para várias estratégias de estudos genéticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FONTANELI, R. S.; FREIRE JÚNIOR, N. Avaliação de consorciações de aveia e azevém anual com leguminosas de estação fria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 5, p. 623-630, maio 1991.
- LAWSON, M.J. & ZHANG, L. Distinct patterns of SSR distribution in the Arabidopsis thaliana and rice genomes. **Genome Biology**. v.2, n.7, p.R14. 2006.
- MAIA, L. C.; PALMIERI, D. A.; SOUZA, V. Q.; KOPP, M. M.; CARVALHO, F. I. F.; COSTA DE OLIVEIRA, A. *SSR Locator*: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v.2008, 9 p. 2008.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**. v.3, n.1, p.175-182, 1993.
- PUPO, N. I. H. **Manual de pastagens e forrageiras**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1979. 343 p.
- TEMNYKH, S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S. Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice

(*Oryza sativa* L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential, **Genome Research**. v.11, n.8, p. 1441-1452, 2001.

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

VARSHNEY RK, THIEL T, STEIN N, LANGRIDGE P, GRANER A. In Silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cellular and Molecular Biology Letters**. 2002;7:537-46.