

PROSPECÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS EXPRESSAS E MARCADORES MICROSSATÉLITES EM TRIGO CULTIVADO (*Triticum aestivum* L.)

**GIRARDON, Luis Felipe¹; KAVALCO, Sydney Antonio Frehner¹; VICTORIA,
Filipe de Carvalho¹; SILVA, Juliana Padilha da¹; COSTA DE OLIVEIRA,
Antonio¹.**

¹ Centro de Genômica e Fitomelhoramento, Departamento de Fitotecnia,
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,
Campus Universitário, s/nº • 96001-970 Pelotas, RS, skavalco@gmail.com.

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma planta de ciclo anual, sendo sua época de cultivo durante o inverno e a primavera. O grão é consumido na forma de pão, massa alimentícia, bolo e biscoito. O trigo ocupa o primeiro lugar em volume de produção mundial. No Brasil, 90% da produção deste cereal ocorre na região Sul (EMBRAPA-TRIGO, 2010).

A biologia molecular é uma das ferramentas utilizadas pelos melhoristas para avaliar a variabilidade genética gerando uma enorme quantidade de dados. A necessidade de posteriormente analisar e assegurar estes dados fundamentou a origem da bioinformática, oriunda da fusão das ciências da computação e biológicas (MOUNT, 2001). Várias são as ferramentas computacionais que auxiliam na prospecção de marcadores e localização de genes de interesse. Um dos métodos utilizados pela biologia molecular para se avaliar a variabilidade são os marcadores de DNA, sendo utilizados no melhoramento de plantas desde o início da década de 80 (SOLLER & BECKMANN, 1983). Resumidamente, são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locos que determinam características de interesse (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Segundo Maia *et al.*, (2008) marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeat*) são sequências nas quais uma ou poucas bases podem sofrer variações para o número de repetições. Tais variações nas regiões SSR ocorrem devido a erros no processo de replicação, principalmente no deslizamento da DNA polimerase, gerando a inserção ou deleção de pares de bases, resultando, respectivamente, em regiões maiores ou menores (IYER *et al.*, 2000; ELLEGREN., 2004). Estes marcadores são amplamente aplicados na genética e melhoramento de plantas, devido sua natureza codominante, à fácil reprodutibilidade, sua característica multialélica e por ser de grande abundância em todo o genoma (MAIA *et al.*, 2008). Seu uso para a integração de mapas genéticos, mapeamento físico e ancoragem oferece aos geneticistas e melhoristas de plantas uma maneira de vincular as mudanças no genótipo e no fenótipo (VARSHNEY *et al.*, 2005).

Projetos de genomas junto ao seqüenciamento de regiões funcionais de várias espécies, incluindo espécies de grande importância agrônômica, são responsáveis pelo grande número de seqüências depositadas nos bancos de dados. Os principais bancos são: NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) GRAMNE (*A Comparative Mapping Resource for Grains*) e TIGR (*The Institute for Genomic Research*), entre outros. Nesse sentido, a localização e / ou prospecção de genes

é possível através da utilização de técnicas de biologia molecular e ferramentas de bioinformática (KAVALCO *et al.*, 2010).

O objetivo geral do trabalho foi o de encontrar marcadores microssatélites em todo o banco de regiões genômicas expressas (EST – *Expressed Sequence Tags*) disponíveis para o trigo, estudando tais regiões e associando suas possíveis funções, processos e rotas metabólicas, em quantidade de ocorrência.

2 METODOLOGIA

Inicialmente foi realizado o download de todo o banco de ESTs disponíveis no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) para o *T. aestivum*, e realizada a retirada de redundância com auxílio do programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999). Após eliminar a redundância os contigs produzidos foram utilizados para a criação de um banco de microssatélites, e para o desenho de *primers* específicos com o auxílio do programa *SSRLocator* (MAIA *et al.*, 2008). Os contigs que continham motivos de microssatélites, foram submetidos na plataforma online do Blast2GO (CONESA *et al.*, 2005), para o entendimento das funções associadas e para o estudo das regiões gênicas funcionais. Dessa análise resultaram alguns mapas dos processos envolvidos para cada região gênica expressa obtida.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

De todo o banco de regiões expressas do trigo, contendo cerca de um milhão de seqüências depositadas (750 MB), apenas 3634 contigs resultaram da retirada de redundância (3,33 MB). Destas, 150 regiões microssatélites possíveis de serem flanqueadas por *primers* específicos foram encontradas (Tabela 01). Entre os processos biológicos relacionados com as regiões encontradas, os processos metabólicos, os processos celulares, a resposta a estímulos e a regulação biológica são os fatores com maior freqüência de associação a regiões microssatélites presentes no genoma do trigo, com as seguintes porcentagens de ocorrência, 31%, 29%, 12% e 10% respectivamente.

As funções moleculares com maior freqüência de ocorrência entre os genes contendo regiões repetidas em *tandem* são os ligantes de íons ou de DNA, a atividade catalítica, a estruturação molecular, os carreadores de elétrons, os transportadores de íons, e a regulação da transcrição, respectivamente com 41%, 39%, 4%, 4%, 3% e 3% de ocorrência. A alta ocorrência de transcritos contendo SSRs associados à função de ligação e de atividade catalítica sugere que esta classe de proteínas possa estar mais sujeita a este tipo de mutação, entretanto mais estudos necessitam ser realizados para confirmar esta constatação.

4 CONCLUSÕES

O entendimento da função deste conjunto de marcadores para o trigo possibilita a correlação entre os resultados obtidos com seus processos e rotas metabólicas, auxiliando no estudo das regiões mais significantes para o *T. aestivum*.

5 REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, A.L., CERVIGNI, G.D.L., MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira** 30:333-342, 2005.

CONESA, A., GÖTZ, S., GARCÍA-GÓMEZ, J.M., TEROL, J., TALÓN, M., ROBLES, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**. 21:3674-3676, 2005.

EMBRAPA/TRIGO. O Trigo. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>> Acesso em: 22 de agosto de 2010.

KAVALCO, S.A.F.; VICTORIA, F. de C.; GIRARDON, L.F.; PAIVA, R.P.; SILVEIRA, S.F.daS.; MAIA, L.C. da; COSTA DE OLIVEIRA, A. Estudo de Regiões Genômicas Expressas e Marcadores Microsatélites para uso no Mapeamento Genômico de Trigo. IV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale – COODETEC, Cascavel – PR, 2010.

HUANG, X., MADAM, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, 9:868-877, 1999.

IYER, R.R., PLUCIENNIK, A., ROSCHE, W.A., SINDEN, R.R., WELLS, R.D. DNA polymerase III proofreading mutants enhance the expansion and deletion of triplet repeat sequences in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**. 275(3):2174–2184, 2000.

MAIA, L.C., PALMIERI, D.A., SOUZA, V.Q.DE, KOPP, M.M., CARVALHO, F.I.DE, COSTA DE OLIVEIRA, A. SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation. **Int J Plant Genomics**. 412696, 2008.

MOUNT, D.W. "Bioinformatics – Sequence and Genome Analysis," 1st ed., **Cold Spring Harbor**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1 – 19, 2001.

SOLLER, M. & BECKMANN, J.S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical Applied Genetics**. 67:25-33, 1983.

VARSHNEY, R.K., GRANER, A., SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**. 23(1):48–55, 2005.

Tabela 01: Exemplificação dos dez primeiros resultados obtidos na prospecção das regiões microssatélites com o programa SSRLocator. CGF/UFPEL, 2010.

Sequência	Contig	Forward	TM Forward	Reverse	TM Reverse	Product Size
2	Contig44	GGTGGGGTTGA	59,019	CAGAACAGTTG	59,086	453
3	Contig86	ACCAAATCAAA	58,984	CGCAGTAAGCC	58,774	169
4	Contig96	ACCGAAGAAGA	58,618	GGGAGGTACTG	59,018	311
5	Contig112	AACGCAAGCTC	59,09	CCTCCAAGAAG	59,014	499
7	Contig146	TGAGAAATAAG	59,062	AAAACAGCAGG	58,983	277
8	Contig157	CCGGGTCTACAA	58,955	GAGAAAGAGCT	59,018	263
10	Contig199	TGTGGCTTGA	59,139	CCATGCAGTTCA	59,01	467
11	Contig199	CCATTGCCATGT	59,002	ATGGGGATGTG	59,483	172
12	Contig220	CGAGAGAACCA	58,957	TTCATCTCAGCA	58,953	497
13	Contig225	TAGATTTCCGC	59,04	ACAGTTGTGTC	60,121	207

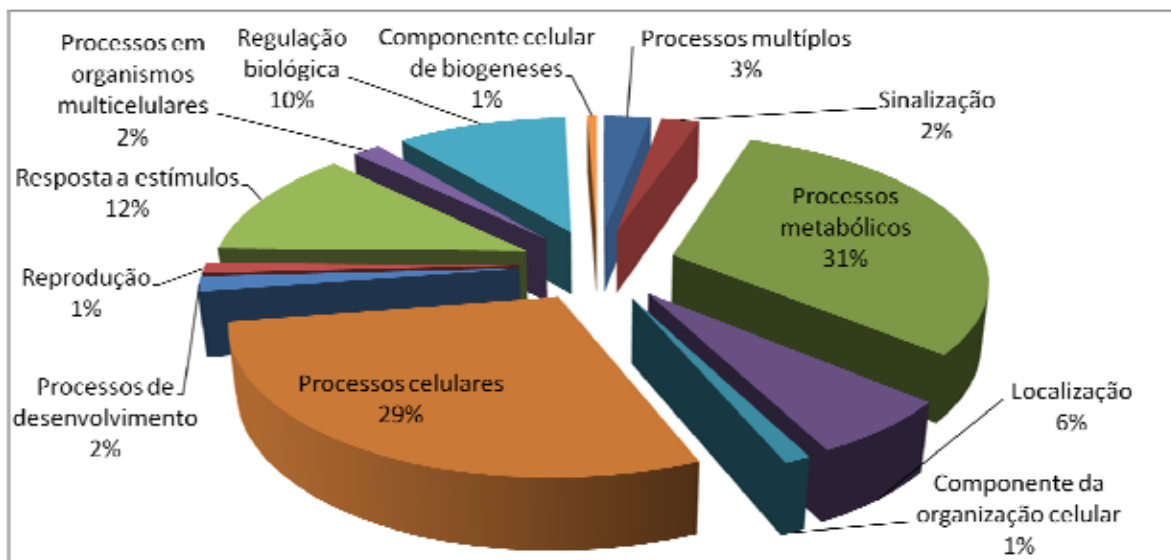


Figura 01: Processos biológicos e sua relação com as regiões microssatélites estudadas. CGF/UFPEL 2010.

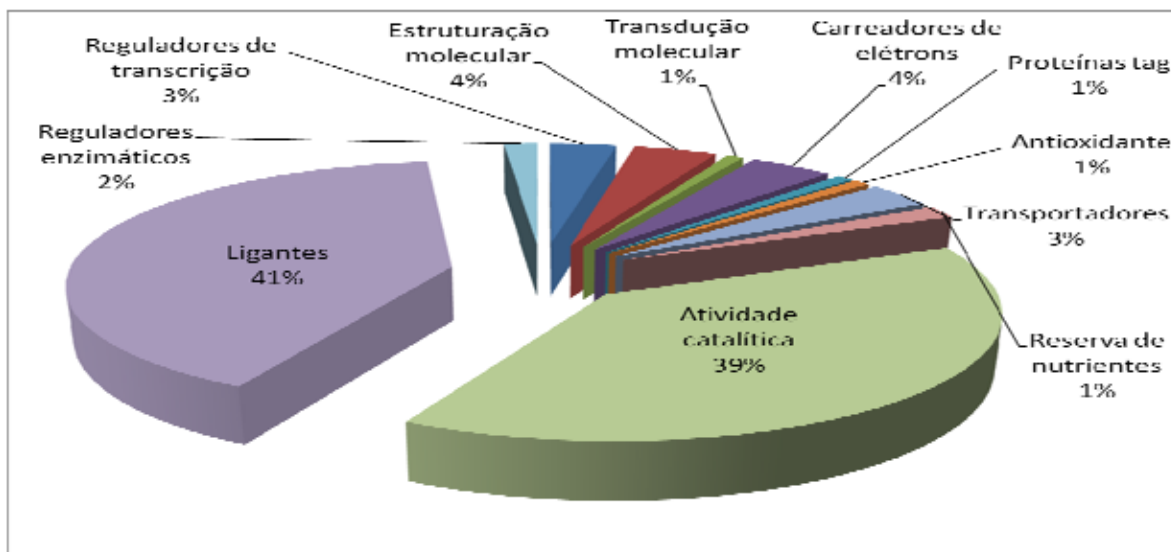


Figura 02: Funções moleculares associadas as regiões microssatélites em porcentagem de ocorrência, CGF/UFPEL 2010.