

DESENHO DE PRIMERS DERIVADOS DE LOCOS MICROSSATÉLITES DO GENOMA DE QUATRO ESPÉCIES DO GÊNERO *Oryza*.

Renata Juliana Ahlert⁽¹⁾, Luciano Carlos da Maia⁽¹⁾, Juliana Severo Castelo Branco⁽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 - reahlert@hotmail.com.br

Microssatélites ou SSRs (*Single Sequence Repeat*) foram descritos por MORGANTE & OLIVIERI (1993) como sequências de DNA repetitivo constituídos por nucleotídeos que se repetem lado a lado (em série) e são encontrados em alta freqüência nos genomas de procariotos e eucariotos. Segundo VARSHNEY et al. (2005), esta classe de marcadores é poderosa para variadas aplicações em genética e melhoramento de plantas, devido sua reproduzibilidade, natureza multi-alélica, característica co-dominante e abundância em genomas. São utilizados para a integração de mapas genéticos, posicionamento físico para seqüenciamento de trechos em plantas melhoradas e pode prover para geneticistas e melhoristas uma potente ferramenta para ligar variações genotípicas a variações do fenótipo. No passado, o uso dessa classe de marcador era limitado pela dificuldade e alto custo na obtenção dos primers a serem usados em reações de PCR para esses protocolos. Atualmente com o acúmulo de dados biológicos providos por iniciativas de seqüenciamento de genomas, a análise desses dados possibilita a localização desses locos e o desenho de primers para serem utilizados como marcadores moleculares em estudos genéticos ou na seleção assistida. O gênero *Oryza* comprehende um extenso grupo formado atualmente por 23 espécies (LONDO et al., 2006), sendo as espécies *Oryza sativa* spp *japonica* e *O. sativa* spp *indica* as mais cultivadas e estudadas. Um segundo grupo desse gênero, compreendendo as espécies *Oryza rufipogon*, *O. granulata*, *O. glaberrina* e *O. australiensis*, embora não seja de grande importância econômica e agrícola, é de extrema importância para melhoramento genético como fonte de novas formas de alelos ou diferentes genes.

O presente trabalho teve como objetivo o desenho de primers derivados de locos microssatélites encontrados no genoma das quatro espécies do gênero *Oryza*, para serem utilizados como novos marcadores moleculares nestas espécies.

A partir do NCBI, foram localizadas seqüências de DNA referentes ao genoma das espécies *Oryza rufipogon*, *O. granulata*, *O. glaberrina* e *O. australiensis*. As seqüências foram depositadas em arquivos no padrão *fasta* em computadores do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF/FAEM/UFPel). Para a localização dos microssatélites e para o desenho dos primers, foram utilizadas as rotinas do programa de computador *SSRLocator* (MAIA, 2007). O programa foi configurado para buscar microssatélites nos padrões 2x10, 3x7, 4x5, 5x5, 6x4, respectivamente para dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros. Para o desenho dos primers, foram configurados ocorrências de amplicons entre 100 e 300pb; temperaturas de anelamento dos primers (TM) mínima, máxima e ótima de 45°C, 55°C e 50°C respectivamente; tamanho de primers mínimo, máximo e ótimo de 15, 25 e 20 pb; conteúdo de GC entre 20% e 50% e com regiões de ancoramento distantes no mínimo 5 pb nos dois flancos da região do DNA repetitivo, conforme descrito por PALMIERI et al. (2005).

Como resultados da busca no *GeneBank* foram obtidos o número de seqüências por espécies conforme mostrado na Tabela 1. O resultado da quantidade total de ocorrências de microssatélites e o número de primers obtidos para cada espécie, é indicado na Tabela 2.

O número de microssatélites detectados e os respectivos primers desenhados para esses locos são de grande valia do ponto de vista da obtenção de marcadores moleculares, pois os totais de 120, 70, 30 e 18 primers para as espécies *O. rufipogon*, *O.*

granulata, *O. glaberrina* e *O. australiencis*, respectivamente, são quantidades razoáveis para a utilização em várias estratégias para estudos genéticos.

Tabela 1. Número de seqüências, total de nucleotídeos e tamanho médio das seqüências de quatro espécies do gênero *Oryza*, analisadas para ocorrência de microsatélites. CGF/FAEM/UFPel, Pelotas, 2007.

Espécie	Número de Seqüências	Total de nucleotídeos (pb)	Tamanho médio Seqüências (pb)
<i>O. rufipogon</i>	5.605	3.601.744	642,6
<i>O. granulata</i>	4.586	2.567.313	559,8
<i>O. glaberrina</i>	5.033	2.623.890	521,3
<i>O. australiencis</i>	2.635	1.684.154	639,1

Tabela 2. Total de Microsatélites e número de primers desenhados para cada espécie. CGF/FAEM/UFPel, Pelotas, 2007.

Espécie	Quantidade Microsatélites	Primers
<i>O. rufipogon</i>	137	120
<i>O. granulata</i>	38	30
<i>O. glaberrina</i>	93	70
<i>O. australiencis</i>	20	18

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

LONDO, J.P; CHIANG, Y.C; HUNG, K.H; CHIANG, T.Y; SCHAAL, B.A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. **Proceedings of the national academy of sciences of the U.S.A.** v.103, n.25, p.9578-9583, 2006.

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

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. **Proceedings: Plant and Animal Genome 2005**, San Diego, CA, 2005.

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.