



DESENHO E POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE *PRIMERS* DERIVADOS DE LOCOS MICROSSATÉLITES DO GENOMA DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Lolium*.

AHLERT, Renata Juliana¹; MAIA, Luciano Carlos da¹; BERVALD, Clauber Mateus Priebe¹; CIMA, Francieli Fatima¹; 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 reahlert@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Microssatélites ou SSRs (*Single Sequence Repeats*) 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 frequência 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 a sua reprodutibilidade, 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 podem 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.

Entre as espécies forrageiras de clima temperado, o azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.), por suas características de abundante produtividade de forragem, alta palatabilidade, excelente rebrote, fácil semeadura, grande resistência ao pastejo, a excessos de umidade e suportando altas lotações (CARAMBULA, 1971) é a espécie de maior utilização no Rio Grande do Sul, assim como na maior parte das regiões temperadas e subtropicais do mundo (MAIA, 1995). 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.

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).

Essas regiões expressas (ESTs/cDNAs) possuem sequências de DNA repetitivo que possibilitam a obtenção de marcadores moleculares microssatélites. Ainda, por serem regiões expressas os marcadores derivados podem ser definidos como marcadores funcionais, pois são associados a regiões do genoma com função

conhecida. Assim, marcadores funcionais tornam-se uma estratégia promissora para estudo da genômica funcional e, dentro disso, os marcadores microssatélites, pelas características que apresentam, os mais apropriados para esse estudo.

O presente trabalho teve como objetivo o desenho de *primers* derivados de locos microssatélites encontrados no genoma de duas espécies do gênero *Lolium*, para serem utilizados como novos marcadores moleculares nestas espécies a partir de regiões expressas publicadas em bancos de dados de ESTs.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A partir do *website* do TIGR (www.tigr.org) foram localizadas ESTs referentes ao genoma das espécies *Lolium 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. 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 52°C, 60°C e 55 °C respectivamente; tamanho de *primers* mínimo, máximo e ótimo de 15, 25 e 20 pb; conteúdo de GC entre 40% e 60% e com regiões de ancoragem distantes no mínimo 5 pb nos dois flancos da região do DNA repetitivo, conforme descrito por PALMIERI et al. (2005). Após a geração dos *primers* os mesmos foram testados através de PCR virtual também pelo programa *SSRLocator*.

Foi analisada a ocorrência de locos microssatélites nas Classes I e II nas duas espécies, desenhados *primers* e realizada a simulação de PCR utilizando o *SSRLocator*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de seqüências ESTs por espécie analisadas é mostrado na Tabela 1. Na mesma tabela, 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. Segundo TEMNYKH et al. (2001), microssatélites Classe I são mais polimórficos e possuem maior probabilidade de sofrerem mutação. Ainda, conforme a tabela o total de *primers* ancorados foi de 1574 para *L. multiflorum* e 1364 para *L. temulentum*.

Tabela 1. Número de total de seqüências ESTs, ocorrência de microssatélites e *primers* ancorados para as espécies *L. multiflorum* e *L. temulentum*. CGF/FAEM/UFPel, Pelotas, 2008.

Espécie	ESTs	SSRs	Primers
<i>L. multiflorum</i>	5713	2311	1574
<i>L. temulentum</i>	5717	1900	1364

Na Tabela 2, estão indicados os valores da ocorrência de microssatélites e *primers* ancorados para cada Classe. 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. Em relação aos *primers* ancorados, um total de 30 e 1544 conjuntos de *primers* foram obtidos para a espécie *L. multiflorum* e um total de 29 e 1335 conjuntos de *primers* para as Classes I e II da espécie *L. temulentum*, respectivamente.

Assim, foi possível ancorar *primers* em 66,67 % dos locos microssatélites Classe I de *L. multiflorum* e 68,14% de locos Classe II. Para a espécie *L. temulentum* foram ancorados *primers* em 72,5% dos locos Classe I e 71,77% Classe II.

Tabela 2. Número de ocorrências de microssatélites, número e porcentagem de *primers* ancorados para as Classes I e II de microssatélites nas duas espécies analisadas do gênero *Lolium*. CGF/FAEM/UFPel, Pelotas, 2008.

Espécie	Classes	Número de SSRs	Número de <i>Primers</i>	Porcentagem de <i>Primers</i> (%)
<i>L. multiflorum</i>	I	45	30	66,67
	II	2266	1544	72,50
<i>L. temulentum</i>	I	40	29	68,14
	II	1860	1335	71,77

Após o desenho dos *primers* para cada espécie e classe de microssatélite foi simulado o PCR na espécie de origem e na segunda espécie em estudo. Na Tabela 3 são apresentados os *amplicons* obtidos. Para os *primers* ancorados em *L. multiflorum*, quando anelados na mesma espécie um total de 32 e 1654 *amplicons* foram gerados para as Classes I e II, respectivamente. Quando os mesmos *primers* foram utilizados na simulação de PCR na espécie *L. temulentum*, foram gerados 16 *amplicons*, apenas para a Classe II. Para os *primers* ancorados em *L. temulentum* no PCR realizado para a mesma espécie, foram gerados 29 e 1374 *amplicons* para as Classes I e II, respectivamente. Quando simulado em *L. multiflorum*, foram gerados 32 *amplicons* Classe II. Também não foram obtidas amplificações para microssatélites Classe I.

Os *primers* de uma espécie quando anelados sobre a mesma espécie, funcionaram em 100% dos casos, podendo amplificar mais de um loco.

Tabela 3. Número de amplificações obtidas no PCR virtual para cada *primer* e *contig* homólogo entre as espécies, para as Classes I e II. CGF/FAEM/UFPel, Pelotas, 2008.

<i>Contig</i> SSR_ <i>Primer</i>	<i>Contig</i> Homólogo	Classe	Número de <i>amplicons</i>					Total*
			Um	Dois	Três	Quatro	Total	
<i>L. multiflorum</i>	<i>L. multiflorum</i>	I	28	2	0	0	30	32
		II	1452	75	16	1	1544	1654
<i>L. temulentum</i>	<i>L. temulentum</i>	I	29	0	0	0	29	29
		II	1301	29	5	0	1335	1374
<i>L. multiflorum</i>	<i>L. temulentum</i>	I	0	0	0	0	0	0
		II	14	1	0	0	14	16
<i>L. temulentum</i>	<i>L. multiflorum</i>	I	0	0	0	0	0	0
		II	32	0	0	0	32	32

*considerando amplificações de um mesmo *primer* em locos diferentes.

Os resultados demonstram que quando o PCR foi simulado na mesma espécie, foi obtido um número elevado de amplificações para a Classe II e um número satisfatório de amplificações para Classe I, sendo estes preferenciais para estudos genéticos, pois apresentam maior probabilidade de apresentar

polimorfismo em relação à microssatélites da Classe II. Quando o PCR foi simulado entre espécies diferentes as amplificações ficaram limitadas a Classe II, porém o número de amplificações geradas possibilita o estudo da homologia entre as espécies através das regiões homólogas que apresentam. As amplificações geradas permitem que estudos posteriores sejam realizados, pois os resultados foram obtidos a partir de regiões expressas do genoma das espécies, sendo necessária a validação destes *primers* derivados de microssatélites como marcadores funcionais.

4. CONCLUSÃO

A utilização do *SSRLocator* permitiu detectar *primers* para as espécies *L. multiflorum* e *L. temulentum* nas proporções de 67,4% e 72,1%, respectivamente. A simulação de PCR permitiu 100% de anelamento dos *primers* gerados quando anelados sobre a mesma espécie. Para *primers* de *L. multiflorum* anelados em *L. temulentum* houve amplificação de 1% dos microssatélites Classe II e quando *primers* de *L. temulentum* foram anelados em *L. multiflorum* houve amplificação de 2,4% dos microssatélites Classe II, permitindo sua utilização como marcadores moleculares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARAMBULA, M. **Producción y manejo de pasturas sembradas**. Montevideo: Hemisfério Sur, 1971. 463p.

MAIA, M.S. Secagem de sementes de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) com ar em ambiente controlado. Pelotas, 1995. 108p. **Tese** (doutorado) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.

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.

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.

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.