

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



MICROSSATÉLITES EM ESPÉCIES DO GÊNERO *ORYZA* COM GENOMA AA

**SILVEIRA, Solange Ferreira da Silveira¹; BERVALD, Clauber Mateus Priebe. ²;
MAIA, Luciano Carlos da ²; CRESTANI, Maraisa ²; DIAS, Letícia Winke³;
CARVALHO, Fernando Irajá Félix. ⁴; COSTA DE OLIVEIRA Antônio ⁴**

¹Bolsista de Iniciação Científica CGF – FAEM/UFPEL; ²Doutorando CGF – FAEM/UFPEL; ³Estagiária CGF – FAEM/UFPEL; ⁴Professores dept^o. Fitotecnia – FAEM/UFPEL
solange.agro@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, apresentando grande importância econômica e social. É um alimento nutritivo, rico em carboidratos que atualmente ocupa a terceira posição no ranking mundial e brasileiro de produção de grãos (FAO, 2009). Além disso, se constitui em um modelo genético para todos os cereais por possuir um genoma comparativamente pequeno (390 Mb) e apresentar elevada sintonia com outros genomas de cereais como aveia, trigo, milho, cevada e sorgo (KURATA *et al.*, 1994; BENNETZEN & FREELING, 1997; GALE & DEVOS, 1998).

O gênero *Oryza* compreende um extenso grupo formado atualmente por 21 espécies (LONDO *et al.*, 2006), sendo as espécies *Oryza sativa* spp *japonica* e *O. sativa* spp *indica* as mais cultivadas e estudadas. O genoma da *O. sativa* spp *japonica* foi completamente seqüenciado e mapeado, sendo considerada uma espécie modelo. As espécies do gênero *Oryza* são representadas geneticamente por 10 diferentes tipos de genomas, compreendendo os genomas AA, BB, CC, BBCC, CCDD, EE, FF, GG, JJHH e JJKK. As espécies que possuem o genoma AA são pertencentes ao *pool* gênico primário, apresentando maior facilidade de hibridações interespecíficas e conseqüente transferência de genes, sem apresentar esterilidade (REN *et al.*, 2003).

Microssatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*) são seqüências de DNA formadas pela disposição em série de nucleotídeos repetidos em arranjos formados entre um e seis pares de bases (MORGANTE e OLIVIERI, 1993). Estes constituem uma importante classe de marcadores moleculares utilizada para entender relações de espaço entre segmentos de cromossomos, podendo contribuir na análise das relações temporais e evolutivas entre espécies e gêneros (KASHI *et al.*, 1997).

O objetivo do presente trabalho foi analisar freqüências de distribuição de diferentes microssatélites nos genomas de quatro espécies do gênero *Oryza* de genoma AA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As seqüências dos genomas das espécies do gênero *Oryza* foram obtidas a partir do *GeneBank* do *National National Center for Biotechnology Information* -

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram baixadas frações genômicas (milhões de nucleotídios) de diferentes espécies de *Oryza*, *O. glaberrima* (41 Mbp), *O. nivara* (72 Mbp), *O. rufipogon* (96 Mbp) e *O. sativa*, sendo que para esta espécie foram analisados dados de duas subespécies, a subespécie *indica* (339 Mbp) e a *japonica* (371 Mbp).

As seqüências foram depositadas em arquivos no padrão Fasta e, posteriormente, analisadas utilizando o programa computacional SSRLocator (MAIA *et al.*, 2008) (<http://www.ufpel.edu.br/~lmaia.faem>) para a localização dos microssatélites. O programa foi configurado para localizar microssatélites Classe I (≥ 20 pb) e Classe II (≥ 12 pb e < 20 pb), nos tipos compreendidos entre monômeros e hexâmeros. O número mínimo de repetições para monômeros foi doze, seis para dímeros, quatro para trímeros, três para tetrâmeros e pentâmeros e dois para hexâmeros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os genomas das espécies *Oryza* e seus respectivos tamanhos seqüenciados e estimados em milhões de pares de bases (Mpb) (Ammiraju *et al.* 2006), seguidos pela quantidade total de ocorrências para microssatélites Classe I e Classe II, por tipo de microssatélite e pela freqüência do número de locos para cada milhão de pares de bases (locos/Mpb) em cada genoma.

As espécies *O. sativa* (spp. *japonica* e spp. *Indica*) apresentaram as maiores ocorrências e freqüências para todos os tipos de microssatélites, seguidas por *O. glaberrima*, *O. rufipogon* e *O. nivara*. Vale salientar que dentre as espécies estudadas, apenas *O. sativa* subspécie *japonica* está completamente seqüenciada até o momento, presumindo-se que o número de microssatélites encontrado no estudo pode estar subestimado para as demais espécies.

Os tipos de microssatélites com as maiores ocorrências e freqüências entre as espécies foram os hexâmeros, trímeros e tetrâmeros seguidos pelos demais microssatélites (Tabela 1). Deve ser dada particular importância para os trímeros e hexâmeros, pois estes tipos de seqüências repetitivas podem formar códon, e assim conseqüentemente produzir um ou mais aminoácidos (NELSON e COX, 2004).

As freqüências de cada tipo de microssatélites separadas nos genomas de espécies do gênero *Oryza* em Classes I e II são mostradas na Tabela 2. *O. sativa* spp. *japonica* e *O. sativa* spp. *indica* apresentaram as maiores freqüências, quase não diferenciando entre si, enquanto que as demais espécies apresentaram freqüências menores. De forma geral, considerando classe I e II separadamente, foram observados valores de freqüência variáveis. No entanto, observando os valores totais, as maiores freqüências para a Classe I foram encontradas em *O. sativa* spp. *japonica*, *O. sativa* spp. *indica*, *O. rufipogon*, *O. glaberrima* e *O. nivara*, enquanto que na Classe II as maiores freqüências foram encontradas em *O. sativa* spp. *japonica*, *O. sativa* spp. *indica*, *O. glaberrima*, *O. rufipogon* e *O. nivara* respectivamente.

Os microssatélites dímeros e hexâmeros apresentaram, consecutivamente, as maiores ocorrências de microssatélites para a Classe I e Classe II. Considerando que, os microssatélites Classe I são descritos como melhores marcadores moleculares, sugere-se que aqueles locos dos tipos dímeros e trímeros apontados neste estudo são os melhores candidatos a marcadores moleculares.

Entre os genomas selvagens, aqueles contendo o genoma AA são os recursos genéticos de mais fácil acesso, considerando que a espécie cultivada *O. sativa* também compartilha o mesmo genoma AA, e assim a transferência de genes das espécies selvagens podem ser facilmente alcançada através de cruzamentos. A detecção de microssatélites como marcadores moleculares nas espécies do gênero *Oryza*, que possuem o genoma AA, poderá possibilitar o melhor entendimento da diversidade e das relações entre essas espécies levando a uma melhor exploração do *pool* gênico primário, o que conseqüentemente pode contribuir em programas de melhoramento genético do arroz.

As diferenças na frequência de microssatélites encontradas no estudo comprovam a alta taxa de polimorfismo previamente conhecida destes marcadores, e demonstra a importância e grande utilidade prática dos microssatélites para a genética, genômica e estudos evolutivos. Frente aos resultados, considera-se que estudos *in silico* podem facilitar a obtenção de marcadores microssatélites e conseqüentemente auxiliar o trabalho do melhorista com estas espécies.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos nesse estudo, a espécie *O. sativa* (spp. *indica* e spp. *japônica*) apresentou as maiores ocorrências e frequências para todos os tipos de microssatélites em relação as demais espécies estudadas. No entanto, deve-se considerar que estes valores podem estar subestimados pelo fato das demais espécies ainda não possuírem todo o genoma sequenciado.

Os microssatélites dímeros e hexâmeros apresentaram, consecutivamente, as maiores ocorrências de microssatélites para a Classe I e Classe II.

Os resultados encontrados podem facilitar a obtenção de marcadores microssatélites e conseqüentemente auxiliar o trabalho do melhorista através do desenvolvimento de marcadores para o uso na seleção assistida com estas espécies.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNETZEN, J. L.; FREELING, M. The unified grasses genome: synergy and synteny. **Genome Res.**, v. 7, p.301-306, 1997.
- FAO – Food and Agriculture Organization: **FAO Statistics Division**. Disponível: <<http://faostat.fao.org> - Acessado em 18 de maio. 2009.
- GALE, M.D.; DEVOS, K.M. Plant comparative genetics after 10 years. **Science**, Washington, v.282, n.5389, p.656-659, 1998.
- KASHI, Y., KING, D., SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends Genet.** v.2, n.13, p.74-78, 1997.
- KURATA, N.; MOORE, G.; NAGAMURA, Y. et al. Conservation of genome structure between rice and wheat. **Bio / technology** v.12, p. 276-278, 1994.
- LONDO, JP., CHIANG, Y., HUNG, K., CHIANG, T., SCHAAL, BA. 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 USA** 103, p. 9578–9583, 2006.
- MAIA, L.C.; PALMIERI, D.A., DE SOUZA, V.Q., KOPP, M.M., DE CARVALHO, F.I., 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.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal.**, v.3, n.1, p.175-182, 1993.

NELSON, DL., COX, MM., **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2004.

REN, F., LI, S., HUANG, J., ZHU, Y. A comparative study of genetic relationships among the AA-genome *Oryza* species using RAPD and SSR markers. **Theor Appl Genet**, v.108, p.113–120, 2003.

Tabela 1. Quantidade total de ocorrências e freqüências (locus/Mpb) dos diferentes tipos de microssatélites, Classe I (≥ 20 pb) e Classe II (≥ 12 pb e < 20 pb), nos genomas de espécies de *Oryza* com genoma AA.

Espécies	Tam. do genoma (Mpb)		Monômeros.		Dímeros		Trímeros		Tetrâmeros		Pentâmeros		Hexâmeros		Total	
	Seq	Est*	Quant	Freq (lo./Mpb)	Quant	Freq (lo./Mpb)	Quant	Freq (lo./Mpb)	Quant	Freq (lo./Mpb)	Quant	Freq (lo./Mpb)	Quant	Freq (lo./Mpb)	Quant	Freq (lo./Mpb)
<i>O. sativa</i> subsp. <i>indica</i>	339	-	17.194	50,72	31.922	94,17	71.241	210,15	45.018	132,80	14.352	42,34	268.382	796,51	448.109	1.322
<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	371	-	16.487	44,44	36.025	97,10	80.496	216,97	48.394	130,44	16.192	43,64	295.505	791,69	493.099	1.329
<i>O. rufipogon</i>	96	439	4.314	44,94	5.835	60,78	12.501	130,22	8.910	92,81	2.643	27,53	61.863	644,41	96.066	1.001
<i>O. glaberrima</i>	41	357	2.264	55,22	2.425	59,15	4.836	117,95	4.124	100,59	1.104	26,93	26.303	641,54	41.056	1.001
<i>O. nivara</i>	72	448	3.151	43,76	3.983	55,32	9.467	131,49	6.601	91,68	1.945	27,01	46.146	640,92	71.293	990

* Ammiraju et al., 2006

Seq. – seqüenciado, Est. - estimado, Quant. – quantidade, Freq. – freqüência, lo./Mpb – locus/Mpb

Tabela 2. Distribuição de freqüência (locus/Mb) dos diferentes tipos de microssatélites, Classe I (≥ 20 pb) e Classe II (≥ 12 pb e < 20 pb), nos genomas de espécies do gênero *Oryza* com genoma AA.

Espécies	monômeros		dímeros		trímeros		tetrâmeros		pentâmeros		hexâmeros		Total		Total
	Clas I	Clas II	Clas I	Clas II	Clas I	Clas II	Clas I	Clas II	Clas I	Clas II	Clas I	Clas II	Clas I	Clas II	Clas I + II
<i>O. sativa</i> subsp. <i>indica</i>	2,42	48,30	29,35	64,82	14,62	195,53	6,76	126,04	6,96	35,37	3,80	787,89	63,91	1257,95	1321,86
<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	2,29	42,15	29,92	67,18	13,94	203,04	6,83	123,61	7,93	35,71	3,71	792,80	64,52	1264,49	1329,11
<i>O. rufipogon</i>	2,46	42,48	18,54	42,24	8,03	122,19	4,67	88,15	3,49	24,04	3,11	641,29	40,30	960,39	1000,69
<i>O. glaberrima</i>	3,15	52,07	17,63	41,51	8,05	109,90	4,07	96,51	3,93	23,00	1,41	640,12	38,24	963,12	1001,37
<i>O. nivara</i>	2,14	41,63	15,43	39,89	8,22	123,26	4,18	87,50	2,83	24,18	2,64	638,28	35,44	954,74	990,18