

PROSPECÇÃO *IN SÍLICO* DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A VIA METABÓLICA DO AMIDO E SACAROSE EM TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

GROLI, Eder Licieri¹; FINATTO, Taciane¹; HAGEMANN, Thaís¹; MAIA, Luciano Carlos da¹; COSTA DE OLIVEIRA, Antonio¹.

¹Centro de Genômica e Fitomelhoramento, Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/n, Pelotas-RS, CEP 96001-970. elicierigroli@gmail.com.

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma espécie hexaplóide que possui número básico de cromossomos igual a 7 ($2n=6x=42$), é um dos cereais mais cultivados no mundo, juntamente com o milho e o arroz, no Brasil, sua produção está concentrada principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná (FEDERIZZI, et al, 2005). O trigo está presente na dieta da maioria da população mundial, pois está contido em alimentos básicos, constituindo fonte essencial, principalmente, de amido e glúten. O amido é um polissacarídeo, sintetizado pelos vegetais para ser utilizado como reserva energética. Sua síntese ocorre principalmente nos plastídeos, a partir da polimerização da glicose, resultante da fotossíntese. (TAIZ e ZEIGER, 2004). O grânulo de amido consiste de dois carboidratos principais: amilose e amilopectina. O conteúdo relativo e a composição química do amido em trigo utilizado nas indústrias, afeta a qualidade de seus derivados. Nesse sentido, ferramentas da biotecnologia podem auxiliar o desenvolvimento de marcadores moleculares associado ao caráter qualidade e rendimento de grãos. Microsatélites ou SSRs (*simple sequence repeat*) são seqüências de DNA formadas pela disposição em série de nucleotídeos repetidos em arranjos formados entre dois e seis pares de bases (MORGANTE & OLIVIERI, 1993) e devido suas características como marcadores moleculares, os microsatélites se tornaram uma importante ferramenta para ligar variações gênicas a variações do fenótipo. A prospecção de marcadores SSRs localizados em genes associados à via do amido e da sacarose pode fornecer avanços para a seleção de constituições genéticas superiores para a qualidade industrial em trigo.

O objetivo do trabalho foi buscar *in silico* marcadores microsatélites em regiões expressas que codificam para enzimas da via metabólica do amido e sacarose em trigo (*Triticum aestivum* L.).

2 METODOLOGIA

Genes da via metabólica do amido e sacarose em arroz (*Oryza sativa* L.) foram coletados na base no banco de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Foram selecionados 81 genes que posteriormente foram alinhados no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando a ferramenta tBLASTn (alinhamento local) no intuito de encontrar seqüências homólogas nas seqüências expressas (ESTs - *expressed sequence tag*) depositadas para o genoma do trigo (*Triticum aestivum* L.). Foram consideradas as seqüências com cobertura maior que 55% e *E-value* menores que e^{-10} . Após a obtenção das seqüências homólogas em trigo, com auxílio do programa Blast2GO (CONESA et al., 2005) foi realizada a anotação da ontologia gênica das

sequências de ESTs e identificada a posição do produto gênico na via metabólica do amido e sacarose. Uma vez detectadas as ESTs envolvidas nesta via, foi realizada a busca por locos de microssatélites, utilizando o programa computacional SSRLocator (MAIA et al.,2008). Foi realizada a busca por motivos monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros com repetições em série formando fragmentos maiores que 12 pares de bases, este procedimento realiza a busca de microssatélites tanto de classe I onde as regiões repetidas em série formam fragmentos acima de 20 pares de bases, quanto os microssatélites de classe II que são aqueles com regiões repetidas em série constituindo fragmentos variando de 12 a 20 pares de bases. Foram considerados como parâmetros de busca o intervalo de 100 pares de bases entre os locos microssatélites e até cinco pares de bases entre regiões imperfeitas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do alinhamento local das sequências de DNA dos 81 genes de *O. sativa* envolvidos na via metabólica do amido e sacarose com o banco de ESTs de *T. aestivum*, foram encontradas 65 ESTs que codificam para 27 enzimas da via metabólica do amido e sacarose em trigo (Tabela 1). Foram encontradas ESTs para as enzimas: *UDP-glucuronate 4-epimerase*, *starch synthase*, *glucokinase*, *beta-fructofuranosidase*, *fructokinase*, *beta-amylase*, *alpha-amylase*, *phosphorylase*, *phosphoglucomutase*, *sucrose synthase*, *sucrose alpha-glucosidase*, *UDP-glucose 6-dehydrogenase*, *xylan 1,4-beta-xylosidase*, *alpha-glucosidase*, *glucose-6-phosphate isomerase*, *pectinesterase*, *glucose-1-phosphate uridylyltransferase*, *sucrose-phosphate synthase*, *alpha-glucanotransferase*. Foram encontrados locos microssatélites em ESTs correspondentes a 19 enzimas (Tabela 1), sendo que as enzimas em que mais foram encontrados SSRs foram *UDP-glucuronate 4-epimerase*, *beta-fructofuranosidase*, *fructokinase* e *starch synthase* (Tabela 1). *UDP-glucuronate 4-epimerase* possui como função principal converter UDP-glucuronato em UDP-D-galacturonate, essa enzima além de participar da rota metabólica do amido e sacarose também atua no metabolismo de açúcares nucleotídeos; *starch synthase* tem por função a converção de ADP-glicose em uma corrente de resíduos de D-glucose unidas por ligações 1,4-alfa-glicosídica em ADP e uma cadeia alongada de resíduos de glicose, a enzima *beta-fructofuranosidase* catalisa a hidrólise de carboidratos beta-fructofuranosídicos e, no caso da sacarose, permite a obtenção de uma mistura de açúcares formada por glicose e frutose. A *fructokinase* especificamente catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP (substrato) para a frutose como o passo inicial na sua utilização.

4 CONCLUSÃO

Foram encontradas 65 regiões expressas no trigo que codificam para 27 enzimas na via metabólica do amido e sacarose em trigo. Com base nestas informações é possível desenvolver iniciadores microssatélites que serão posteriormente utilizados na caracterização de populações segregantes de trigo bem como para mapeamento e seleção de constituições genéticas superiores.

5 REFERÊNCIAS

SALLES, G.; BUSO, C. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **COMUNICADO TÉCNICO**. Emprapa, 2003.

FEDERIZZI, Luiz C. et al. Melhoramento de Trigo. *In*: **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. BORÉM, A..EditoraUFV, 2005.

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. **International Journal of Plant Genomics**, 9 pages, 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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 3.ed. 2004.

Tabela 1. Motivos de microssatélites encontrados em seqüências expressas (ESTs) de trigo envolvidas na via metabólica do amido e sacarose. CGF/UFPel, 2010.

Identificação	Código	N.Locos	SSR
ec:5.1.3.6 - <i>UDP-glucuronate 4-epimerase</i>	AK334068.1	1	(CGCC)3 (TGCT)4 (GGCG)4-(GCGG)3 (CCT)4 (CTC)5
	AJ292521.1	1	(GCA)4 (GCA)4-(CGC)4
ec:2.4.1.21 - <i>starch synthase</i>	AK330838.1	1	(TCCAG)3 (CGG)4
	EU333947.3	1	(CCT)4
ec:2.7.1.2 - <i>glucokinase</i>	AK336196.1	4	(GGCG)3-(GCG)5-(GGCG)3- (GGCG)3-(GCG)5
	AK332966.1	1	(CGC)4
ec:3.2.1.26 - <i>beta-fructofuranosidase</i>	AF069309.1	1	(ATGG)3
	AB089269.1	1	(ATG)7
	AF030420.1	1	(TAGC)3
ec:2.7.1.4 - <i>fructokinase</i>	AK332352.1	2	(TGC)5-(GGC)4
	BT008921.1	1	(GCC)4 (GCC)5
	AK332956.1	1	(CT)8
	AK332966.1	1	(CGC)4
	AK332005.1	1	(GCC)5
ec:3.2.1.2 - <i>beta-amylase</i>	X98504.1	1	(AGT)3
ec:3.2.1.1 - <i>alpha-amylase</i>	X98504.1	1	(AGT)3
ec:2.4.1.1 - <i>phosphorylase</i>	EU595762.1	1	(GGA)4
ec:5.4.2.2 - <i>phosphoglucomutase</i>	AK332203.1	1	(GCGA)3
ec:2.4.1.13 - <i>sucrose synthase</i>	AK332338.1	1	(GAAA)3
	AJ000153.1	1	(TGAA)3
ec:3.2.1.48 - <i>sucrose alpha-glucosidase</i>	AK332352.1	2	(TGC)5-(GGC)4
	AF030420.1	1	(TAGC)3
ec:1.1.1.22 - <i>UDP-glucose 6-</i>	AK332412.1	1	(GCCT)4
ec:3.2.1.37 - <i>xylan 1,4-beta-xylosidase</i>	AK333015.1	1	(TCGC)3
ec:3.2.1.20 - <i>alpha-glucosidase</i>	AK333015.1	1	(TCGC)3
ec:5.3.1.9 - <i>glucose-6-phosphate isomerase</i>	AK333308.1	1	(CCT)4
	DQ456872.1	2	(TCCG)3-(CCGC)3
ec:3.1.1.11 - <i>pectinesterase</i>	AK335586.1	1	(GGA)4
ec:2.7.7.9 - <i>UTP-glucose-1-phosphate</i>	BT009219.1	1	(GCC)4
ec:2.4.1.14 - <i>sucrose-phosphate</i>	AF534907.1	2	(TCC)4-(GCG)5
ec:2.4.1.25 - <i>4-alpha-glucanotransferase</i>	DQ068045.1	1	(CCT)4