

BUSCA POR SEQUÊNCIAS GÊNICAS EXPRESSAS RELACIONADAS A CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE AGRONÔMICO EM ARROZ¹

Rosana Pereira Vianello Brondani², Thatiane Collet dos Santos³, Paulo Hideo Nakano
Rangel², Claudio Brondani²

Palavras-chave: ESTs, *Oryza sativa* L., Produção, Qualidade de grãos

INTRODUÇÃO

Um grande número de sequências expressas do genoma, também conhecidas por ESTs (Expressed Sequence Tag), estão sendo depositadas em banco de dados públicos, decorrente do grande esforço mundial coordenado em análise genômica funcional. A busca por ESTs, ou genes candidatos, utilizando informações de função gênica disponível em banco de dados, seguido pelo mapeamento das sequências de interesse através de análise de co-segregação de genes candidatos e QTLs, tem possibilitado a identificação de genes diretamente envolvidos na expressão de um caráter de interesse. Os mapas genéticos transcricionais ou funcionais, baseados em ESTs, estão surgindo como uma poderosa ferramenta para localizar genes potencialmente candidatos ao controle de caracteres quantitativos de interesse em humanos (O'Brien et al., 1999) e plantas (Chen et al., 2001).

A incorporação de um componente genômico funcional no programa de melhoramento genético abre novas perspectivas rumo à prospecção de genes e, conseqüentemente, ao fornecimento de subsídios para se efetuar uma busca direcionada por variabilidade alélica de genes que controlam os caracteres de interesse através da análise em acessos de arroz da coleção de germoplasma. Características relacionadas ao aumento de produtividade e incremento na qualidade de grãos são fundamentais para a sustentabilidade da cultura do arroz, e conseqüentemente, o acúmulo e transferência deste conhecimento para o melhoramento genético do arroz.

Este trabalho teve como objetivos: 1) Fazer uma busca por ESTs com funções relacionadas à produção e qualidade de grãos nos diversos bancos de dados de sequências genômicas expressas que contenham informações sobre gramíneas e outras espécies vegetais; 2) Desenhar pares de primers para a amplificação de regiões correspondentes aos genes de interesse identificados nos bancos de dados para posterior construção de um mapa genético transcricional para o arroz.

1: Pesquisa em desenvolvimento com suporte financeiro do CNPq.

2: Pesquisadores Doutores da Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, CEP 75375-000 Santo Antônio de Goiás, Go. E mail: rosanavb@cnpaf.embrapa.br; brondani@cnpaf.embrapa.br, phrangel@cnpaf.embrapa.br.

3: Bolsista de IC do CNPq, Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, CEP 75375-000 Santo Antônio de Goiás, Go. E-mail: thaty10s@yahoo.com.br

MATERIAL E MÉTODOS

Busca por genes candidatos de Interesse Agrônômico em gramíneas:

Busca por genes de interesse nos bancos de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Gramene (<http://www.gramene.org>). A busca foi realizada de duas maneiras: 1) através da utilização de palavras-chave relacionadas com características ligadas à produção e à qualidade de grãos em arroz e; 2) através da seleção de genes candidatos envolvidos na percepção da luz e sinalização, genes potencialmente com função na fotossíntese, centros de reação fotossintética, enzimas envolvidas na fixação de CO₂, incluindo as enzimas do ciclo de Calvin-Benson e enzimas relacionadas a genes que operam o metabolismo, transporte e armazenamento dos carboidratos.

Desenho de pares de primers complementares aos genes de interesse:

Para os genes candidatos de interesse identificados nos bancos de dados foram desenhados primers “forward” e “reverse” contendo de 16 a 23 pares de bases cada, obedecendo aos critérios estabelecidos pelo programa Primer (Lincoln et al., 1991). Dentre os critérios utilizados por este programa estão o conteúdo mínimo de 50% e máximo de 60% de %GC; temperatura de anelamento dos primers variando de 55 a 80°C; diferença de temperatura de anelamento entre os pares de primers máxima de 3°C. Para as seqüências que apresentavam um número de bases maior que 800pb, foi utilizado ainda o programa TRF (Benson, 1999), que identifica repetições de seqüências SSR e minissatélites. Depois de identificado o local da seqüência repetitiva, foram desenhados os pares de primers flanqueando as repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas, através da busca em bancos de dados, 233 seqüências identificadas como potenciais genes candidatos. A seleção das seqüências foi feita priorizando as identificadas para o gênero *Oryza*. Alternativamente, foram selecionadas seqüências identificadas no genoma de outras espécies de gramíneas que, sabidamente, apresentam elevado grau de homologia entre si.

Dentre as 271 seqüências identificadas, 128 referem-se à busca realizada por palavras-chave, ao qual foi possível desenhar pares de primers para 39 seqüências (Tabela 1); e 143 foram obtidas através da busca por nomes de enzimas envolvidas em rotas metabólicas, onde foram desenhados 113 pares de primers, resultando em um aproveitamento de 56% das sequencias potenciais identificadas.

Dos 113 primers desenhados a partir de enzimas presentes em rotas metabólicas, 37 foram desenhados em rotas diversas (Tabela 2), envolvidas em processos de resistência à

doenças e síntese de proteínas. As demais rotas metabólicas incluídas neste estudo estão envolvidas em funções essenciais para o metabolismo da planta, como o Ciclo de Calvin-Benson, responsável pela fixação de CO₂ pela planta. Isto é principalmente baseado em uma rápida produção de biomassa devido ao aumento nas taxas de assimilação de CO₂ e supressão da fotorrespiração (Häusler et al., 2002). Rotas como a glicólise e o Ciclo do Ácido Cítrico são responsáveis pela oxidação de vários metabólitos e participam do processo de respiração celular, respectivamente. As rotas da síntese e metabolismo do amido e da sucrose são responsáveis pelo armazenamento de carboidratos como fonte de energia. O acúmulo de amido depende da disponibilidade de substrato para a síntese de amido e mais indiretamente, da fotossíntese e do metabolismo de açúcar para o transporte e suprimento de energia (Chen et al., 2001).

Tabela 1: Número de pares de primers desenhados em seqüências adquiridas por palavras-chaves utilizadas na busca no banco de dados.

Palavra-chave	Nº de pares de primers desenhados	Nº de pares de primers microssatélites	Nº de pares de primers minissatélites
Gelatinization temperature	5	2	-
Production Rice	3	2	1
Quality protein	19	18	1
Carbohydrate metabolism	8	-	-
rice			
Production Oryza	2	-	-
Yield Oryza	1	-	-
Protein content rice	1	-	-
Total	39	22	2

A ação de cada rota não é isolada, e sim uma ação conjunta de todas as rotas, que determinará as características expressas pela planta, como as características relacionadas à produção e à qualidade de grãos. Segundo Schneider et al. (1999), genes que podem afetar a qualidade e a produção de açúcar em *Beta vulgaris* estão envolvidas em rotas bioquímicas como o Ciclo de Calvin, o Ciclo do Ácido Cítrico e em processos como o metabolismo de amido, fotorrespiração, síntese, transporte e degradação da sacarose, glicólise, metabolismo do nitrogênio e osmoproteção.

Dentre os 160 primers desenhados, 34 estão flanqueando sequências simples repetidas, conhecidas como SSR, e 18 flanqueiam seqüências contendo repetições minissatélites, ambas identificadas dentro dos genes candidatos. As seqüências repetitivas são encontradas em grande proporção e bem distribuídas no genoma dos organismos

eucariotos, permitindo uma ampla amostragem genômica. A utilização de locos EST contendo sequências repetidas altamente polimórficas aumentará a probabilidade de êxito na detecção de variabilidade alélica de um gene, possibilitando o seu mapeamento genético no mapa transcricional de arroz, e posteriormente, a correlação entre cada alelo e seu efeito no fenótipo de acessos de arroz importantes para o melhoramento genético.

Tabela 2: Número de pares de primers desenhados em seqüências referentes à busca por rotas metabólicas.

Rotas metabólicas	Nº de primers desenhados	Nº de primers microssatélites	Nº de primers minissatélites
Ciclo de Calvin	19	-	2
Metabolismo do amido	6	1	-
Síntese da sucrose	1	1	-
Metabolismo dos fatores de crescimento da planta	1	-	-
Metabolismo do nitrogênio	7	-	2
Glicólise	10	2	3
Síntese e degradação do amido	10	2	1
Metabolismo da sucrose	8	-	1
Ciclo do ác. cítrico	6	-	-
Biossíntese de aminoácido em folhas de plantas C3	2	-	-
Fotorrespiração	3	-	1
Rotas Diversas	37	6	6
Total	110	12	16

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A identificação de genes candidatos, a disponibilização de um mapa transcricional com regiões de interesse localizadas e a busca direcionada por variabilidade alélica nos genótipos de arroz de interesse para o programa de melhoramento terá valor inestimável, uma vez que orientará a adição de variabilidade genética para o aumento da produção e qualidade de grãos de arroz. Uma busca direcionada utilizando genes relacionados ao teor de amilose já está sendo feita em 96 genótipos de arroz que apresentam teores alto, intermediário e baixo de amilose, a fim de correlacionar os alelos identificados com seu respectivos teores. Todas as sequências com significado biológico para os quais foram desenhados primers serão integradas em um mapa genético construído com marcadores

SSR para o arroz e correlacionadas com as características de interesse agrônomo, através da análise de QTLs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENSON, G. Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 2, p. 573-580, 1999.

CHEN, X.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. A potato molecular function map for carbohydrate metabolism and transport. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 284-295, 2001.

HÄUSLER, R.E.; HIRSCH, H.J.; KREUZALER, F.; PETERHÄNSEL, C. Overexpression of C4-cycle enzymes in transgenic C3 plants: a biotechnological approach to improve C3-photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, nº 369, p. 591-607, 2002.

LINCOLN S.E.; DALY M.J.; LANDER, E.S. “Primer” software, available from E. Lander, Whitehead Institute, Cambridge, MA. 1991.

O’BRIEN, S.J.; MENOTTI-RAYMOND, M.; MURPHY, W.J.; NASH, W.H.; WIENBERG, J.; STANYON, R.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A; WOMACK, J.E.; GRAVES, J.A.M. The promise of comparative genomics in mammals. **Science**, v. 286, p. 458-480, 1999.

SCHNEIDER, K.; BORCHARDT, D. C.; SCHÄFER-PREGL, R.; NAGL, N.; GLASS, C.; JEPPSSON, A.; GEBHART, C.; SALAMINI, F. PCR-based cloning and segregation analysis of functional gene homologues in *Beta vulgaris*. **Molecular Genomics and Genetics**, v. 262, p. 515-524, 1999.