

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Validação de marcadores microssatélites derivados de
regiões funcionais do genoma de aveia

Fabiana Fonseca dos Santos

Pelotas, 2010

FABIANA FONSECA DOS SANTOS

**Validação de marcadores microssatélites derivados de
regiões funcionais do genoma de aveia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof^o. PhD. Antônio Costa de Oliveira

Co-Orientadores: Prof^o. PhD. Fernando Irajá Félix de Carvalho
Prof^a. PhD. Ana Lúcia Soares Chaves

Pelotas, 2010

Banca examinadora:

Prof^o. PhD. Antônio Costa de Oliveira – Orientador _____
(Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel / UFPEL)

Prof^a. Dr^a. Giani Mariza Bärwald Böhn _____
(IFSUL/Pelotas)

Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena Gomes Rocha _____
(Instituto de Biologia / UFPEL)

Dr^a. Liliane Marcia Mertz _____
(Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel / UFPEL)

DEDICO

À minha amada família...

...meus pais João e Regina...

...minhas irmãs Vani Letícia e Katiúscia...

...meu irmão João Jesus...

...minha Vó Vani...

... vocês são tudo prá mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por pela força e proteção em todos os momentos...

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de mestrado em Biotecnologia.

Ao Professor PhD. Antônio Costa de Oliveira pela contribuição em minha formação profissional como orientador e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Professora PhD. Ana Lúcia Soares Chaves pela sua co-orientação, amizade, conselhos e apoio.

Ao Professor PhD. Fernando Irajá Félix de Carvalho por seu auxílio como co-orientador.

Ao Professor Dr. Luciano Carlos da Maia pelas suas valiosas sugestões em todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos queridos professores da pós-graduação em Biotecnologia e Agronomia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento pelos ensinamentos transmitidos.

Às queridas amigas Claudete, Adriana, Taciane e Carina pela amizade, carinho, apoio e incentivo sempre.

Aos queridos colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento pela amizade e convivência, em especial ao amigo Sydney Kavalco.

À amiga querida Ane Crochemore, que conheci durante o mestrado, mas tenho certeza que será uma amizade prá vida toda.

Um agradecimento especial para a amiga e confidente Polyana pelo companheirismo e amizade.

Aos meus pais João e Regina que nunca mediram esforços para a realização de meus sonhos e por sempre acreditarem em mim. Meus irmãos Vani Letícia, Katiúscia e Joãozinho e ao meu cunhado André pelo incentivo e amor em todos os momentos. Minha vó Vani por suas palavras de carinho, tão importantes prá mim. Minha eterna gratidão a todos vocês!

"Enquanto este planeta foi girando na sua órbita, (...), intermináveis formas, belas e admiráveis, a partir de um começo tão simples, evoluíram e continuam a evoluir".

Charles Darwin, 1859

RESUMO

Santos, Fabiana Fonseca dos. **Validação de marcadores microssatélites derivados de regiões funcionais do genoma de aveia**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. Orientador: PhD. Antônio Costa de Oliveira.

O conhecimento da estrutura genética de diversas espécies de aveia pode ser obtido com o uso de marcadores moleculares microssatélites, os quais representam poderosa ferramenta na averiguação de parâmetros genéticos. Este trabalho teve como objetivo buscar a identificação e a caracterização da ocorrência de marcadores microssatélites em aveia através da bioinformática, descrevendo a possível função de cada um dos genes, com base no genoma do arroz e da *Arabidopsis thaliana*. Visando o desenvolvimento e a validação de *primers*, foram obtidos a partir de um banco de dados público de EST (*Expressed Sequence Tag*) de aveia um total de 7.632 *contigs* que tiveram eliminada sua redundância, e para caracterização de locos SSR (*Simple Sequence Repeat*) foi utilizado o programa *SSRLocator*. Para o desenho de iniciadores foi utilizado no *SSRLocator* o módulo contendo o programa *Primer3* sendo encontrados 58 *primers*, dos quais dez foram selecionados para a validação através da reação

em cadeia da polimerase. Dez genótipos de aveia foram avaliados quanto ao nível de polimorfismo. Foi verificado polimorfismo em 80% dos *primers*, sendo que, o restante apresentou bandas monomórficas. A alta diversidade gênica revelada pelos marcadores microssatélites neste estudo possivelmente reflete uma alta diversidade genética dentro do germoplasma de *Avena sativa*.

Palavras-chave: bioinformática, iniciadores, polimorfismo, transferabilidade, *Avena sativa*.

ABSTRACT

Santos, Fabiana Fonseca dos. **Validation of microsatellite markers derived from functional regions of the oat genome.** 2010. 54 f. Dissertation (Masters in Biotechnology) - Graduate Program in Biotechnology. Universidade Federal de Pelotas Pelotas. Advisor: Antonio Costa de Oliveira PhD.

The understanding of the genetic structure of the oat species can be obtained with the use of microsatellite molecular markers which represent powerful tools in the investigation of genetic parameters. This study aimed to search the identification and characterization of microsatellite markers occurrence in oat through bioinformatics, describing the possible role of individual genes based on the genome of rice and *Arabidopsis thaliana*. For the development and validation of EST (Expressed Sequence Tags) *primers*, sequences were obtained from a public database. A total of 7632 oat *contigs* were obtained after eliminating the redundancy. To characterize SSR (simple sequence repeats) loci, the *SSRLocator* program was used. For the design of *primers*, the module containing the program *Primer3* was used. A total of 58 *primers* were found, from which ten were selected for validation by polymerase chain reaction. Ten genotypes were used to assess polymorphism

detection ability of *primers*. Polymorphism was observed in 80% of *primers*, whereas the rest showed monomorphic bands. The high genetic diversity revealed by microsatellite markers in this study may reflect a high genetic diversity within the germplasm of *Avena sativa*.

Keywords: bioinformatics, *primers*, polymorphism, transferability, *Avena sativa*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Marcadores Moleculares de DNA	14
2.2. Marcadores Microsatélites.....	15
2.3. Ocorrência de Microsatélites	19
2.4. Distribuição dos Microsatélites	19
2.5. Aplicações dos Microsatélites	22
2.6. Desenvolvimento de marcadores baseados em microsatélites	24
2.7. Programa de Melhoramento Genético da aveia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel	25
2.8. Marcadores Moleculares em aveia	27
3. ARTIGO: Validação de marcadores microsatélites derivados de regiões funcionais do genoma de aveia	29
4. CONCLUSÕES	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

A aveia é uma forrageira de clima temperado e subtropical, anual, de hábito ereto, com desenvolvimento uniforme e bom perfilhamento. A nível mundial ocupa o sexto lugar em termos de produção de grãos e possui alto valor nutricional, cereal rico em proteínas, fibras, ácidos graxos, vitaminas e minerais. A aveia é considerada alimento funcional já que seu consumo freqüente previne e trata algumas doenças.

Este cereal é cultivado com vários propósitos: para pastagens, forragens, grãos, sendo que a maior parte da produção mundial é distribuída para alimentação animal, sendo o restante para a alimentação humana e para uso industrial, sementes e exportação.

No Brasil, essa cultura vem aumentando sua área de cultivo a cada ano devido a sua importância na rotação de culturas ou ainda por atender o moderno contexto como um alimento funcional, obtendo em 2002, o quinto lugar entre os cereais com maior área cultivada (257.229 ha), representando uma produção de 372.117 t (FAOSTAT, 2003). Ainda assim, sua área plantada é insignificante se comparada ao potencial para cultivo. Isto está relacionado principalmente com a falta de conhecimento em relação aos seus benefícios nutricionais, além da escassez de produtos atrativos e variados utilizando a aveia como base.

Apesar da importância dessa espécie, poucos investimentos no setor de biotecnologia beneficiam estudos em aveia. Varshney, Graner e Sorrells (2005) classificam essas espécies como plantas órfãs e afirmam que, a transferência de conhecimentos acumulados na genômica funcional e estrutural de espécies denominadas como modelo, representa uma estratégia que a partir de investimentos menores podem beneficiar o conhecimento genético dessas espécies e contribuir diretamente com programas de melhoramento genético.

Das estratégias utilizadas em programas de melhoramento os marcadores genéticos moleculares são atualmente uma das ferramentas que possibilitam avanços na genética, pois, o fato destes não serem influenciados pelo ambiente e serem independentes do estágio da vida da planta possibilitam conhecer e identificar aqueles genótipos portadores de genes de interesse agrônomo (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Atualmente uma classe de marcadores moleculares denominada microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) é descrita como a mais eficaz para ligar as diferenças genotípicas com as diferenças do fenótipo.

Com avanços de informações genômicas disponibilizadas em bancos de dados públicos a obtenção de novos marcadores moleculares está bastante facilitada. Alguns destes bancos de dados contém informações referentes a regiões expressas (mRNA, ESTs ou cDNAs) do genoma de várias espécies, neste contexto, localizar marcadores moleculares nestes bancos de dados propiciam a obtenção dos chamados “marcadores moleculares funcionais”, devido ao fato destes serem oriundos de genes funcionais e expressos. A utilização deste tipo de marcadores é vista com grande entusiasmo, pois, existe uma maior probabilidade de associação com aquelas diferenças fenotípicas de interesse. A obtenção destes marcadores é feita a partir de trabalhos de bioinformática (*in silico*), necessitando posteriormente da comprovação da funcionalidade destes em protocolos de biotecnologia em laboratório.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo buscar a identificação e caracterização da ocorrência de marcadores microssatélites em ESTs de aveia, visando desenvolver marcadores para serem usados na cultura. A possível função de cada um dos genes correspondentes as ESTs estudadas foi proposta com base no genoma do arroz e da *Arabidopsis thaliana*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Marcadores Moleculares de DNA

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, deficiência clorofílica, cor de pétala ou morfologia foliar. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Classificados como marcadores moleculares, estes se baseiam na variação natural da sequência de bases do DNA, não são influenciados por diferentes condições ambientais nem fisiológicas do organismo, sendo utilizados em análises genéticas.

O RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), proposto por Botstein et al. (1980) é capaz de diferenciar indivíduos através de variações individuais nos nucleotídeos devido a mutação, deleção, inserção e inversão. Com o surgimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS; FALOONA, 1987), uma nova geração de marcadores moleculares ganhou importância, sendo classificados como marcadores baseados

em PCR. Podem ser citados, entre eles, o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) e os microssatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*).

Os marcadores moleculares possuem algumas diferenças, como a abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro. Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética com as mais diversas finalidades, tais como identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos (BUSO et al., 2003).

Estes marcadores moleculares podem ser obtidos através de informações genômicas disponibilizadas em bancos de dados públicos, analisados por métodos de uso computacional para tratar e contextualizar estes dados, por intermédio da bioinformática. O termo *in silico*, foi originalmente usado para denotar simulações computacionais que modelam um processo natural ou de laboratório. Para se comprovar a funcionalidade dos trabalhos de bioinformática utilizam-se diversos protocolos de biotecnologia.

2.2. Marcadores Microssatélites

O DNA satélite foi descoberto em 1960. Cientistas descobriram que, quando centrifugavam o DNA sob certas condições, este se apresentava em duas ou mais camadas: uma banda principal contendo genes, e bandas secundárias, que foram chamadas bandas satélites. As bandas satélites mostravam-se como sendo constituídas de sequências de DNA repetidas e muito longas (CAMPOS, 2003).

Uma vez que apresentam baixo grau de complexidade e o conteúdo de G+C difere significativamente do restante do genoma, possuem densidade física diferente e por isso formam bandas superiores no gradiente e foram chamados DNA satélite. *Loci* satélites podem ser constituídos de repetições com tamanho de dois a vários milhares de pares de bases (pb). Estão localizados na heterocromatina, principalmente no centrômero (TAUTZ, 1989).

Marcadores Moleculares Microssatélite ou Sequências Simples Repetitivas (SSR), também chamados *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), *Sequence Tagged Microsatellites* (STMS) ou *Single Sequence Length Polymorphisms* (SSLP), consistem em 1 a 6 nucleotídeos repetidos *em tandem*, e são classificadas pelo motivo repetido, podendo ser mononucleotídeo, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos. Os *loci* microssatélite são multi-alélicos codominantes, e têm sido classificados de acordo com a natureza das repetições em perfeito (sem interrupções), imperfeito (com uma ou mais interrupções) e compostos (repetições adjacentes de uma sequência diferente) (WEBER, 1990). Os compostos se dividem em classe I, com *loci* maior que 20 pb, e de classe II, entre 12 a 20 pb, dependem do desenvolvimento de *primers* específicos para cada espécie e estas regiões genômicas serem amplificadas através da PCR (FARIAS; HRBEK; BRINKMANN, 2000). Deste modo, cada segmento amplificado com diferente tamanho representa um alelo diferente do mesmo loco (YU; PARK; POYSA, 1999; CAIXETA; BORÉM; KELLY, 2003a). O maior problema, no entanto, reside no fato de que os *primers* utilizados em sua amplificação apresentam diferentes comprimentos e composição de nucleotídeos, o que gera a necessidade de otimizar programas de PCR para cada loco (OGLIARI; BOSCARIOL; CAMARGO, 2000).

Os marcadores microssatélites constituem a classe de marcadores moleculares mais polimórficos atualmente. Este polimorfismo é gerado pela perda ou ganho de sequências repetidas mais provavelmente através do ganho. Este fenômeno não é ainda completamente

entendido, porém acredita-se que esta expansão ocorra durante a replicação. Os SSRs são inerentemente instáveis e os modelos que têm sido propostos para explicar a geração de microssatélites e instabilidade são o deslizamento da DNA polimerase (*slippage*). Através da atividade exonucleásica de *proofreading* 3'→5' da DNA polimerase, são formados *hairpins* fazendo com que a enzima replique a mesma região duas vezes e a recombinação desigual entre cromossomos homólogos, e estes são cada vez mais desvendados. As taxas de mutação variam de 10^{-3} a 10^{-6} (HOELZEL; HOELZEL, 1998). Apesar de suas altas taxas evolutivas, os microssatélites são conservativos em suas regiões flanqueadoras e podem persistir por um longo período sem modificações (ZARDOYA; AROUHEIF; MEYER, 1996).

Segundo Richards e Sutherland (1992) no primeiro modelo (*slippage*), após a dissociação das fitas durante a replicação, ocorre uma reassociação desalinhada. O deslize estrutural pode ser estabilizado por *hairpin*, triplex, ou rearranjo quadruplex das fitas de DNA. Assim, espera-se que os repetidos sejam capazes de formar DNAs alternativos, tais conformações seriam geradas mais freqüentemente do que outras. As repetições que mostram um potencial considerável para estruturas com formas alternativas incluem (CTG)_n (CAG)_n, (CCG)_n (CGG)_n, (GAA)_n (TTC)_n, (AGG)_n (CCT)_n, e (TGG)_n (CCA)_n (GACY et al., 1995; BIDICHANDANI; ASHIZAWA; PATEL, 1998; USDIN, 1998).

Embora uma série de resultados experimentais argumentem em favor do modelo acima, a recombinação homóloga também pode resultar em instabilidade genética de certos SSRs (JAKUPCIAK; WELLS, 1999). Tais modelos geram novos microssatélites ou aumentam o polimorfismo dos pré-existentes. Pode-se esperar que a fixação dos novos SSRs gerados seja determinada pela interação de vários fatores, dos quais o número de repetições, o tipo de repetição, a sequência flanqueadora, a posição genômica do SSR, conhecimentos bioquímicos e genéticos da célula são muito importantes (TÓTH; GÁSPARI; JURKA, 2000).

Eventos como *slippage* e algumas alterações mutacionais (substituições de base, inserções ou exclusões) na evolução, podem explicar muitas das características do DNA repetitivo e são, portanto, suscetíveis de terem desempenhado um papel importante em sua origem. Sendo esses, que dariam origem a repetições intercaladas de motivos estreitamente relacionados. Tais eventos também podem tender a excluir as sequências não repetitivas entre as repetições, aumentando a extensão e homogeneidade de trechos repetitivos. A expansão global da repetição simples do DNA é influenciada pelo grau de eventos de *slippage* que são intrinsecamente inclinados para inserções ou exclusões e pelas forças seletivas desconhecidas que podem atuar para manter ou eliminar regiões repetitivas. O *slippage* na sua forma mais simples envolve desnaturação local e deslocamento das fitas de DNA seguido de desemparelhamento de bases complementares no local de uma fita de repetição curta (LEVINSON; GUTMAN, 1987).

Conforme Schlötterer e Tautz (1992) os locos microssatélites estão envolvidos num processo de mutação gradativa (stepwise mutation process) no qual um alelo pode mutar em um ou dois pares de base para mais ou para menos. Estudos conduzidos em humanos revelaram que indivíduos mutantes diferiram de seus progenitores em apenas uma ou duas unidades de repetição (WEBER; WONG, 1993).

Os elementos repetitivos são uma característica importante dos genomas eucarióticos e, na verdade representam uma grande proporção da variação no tamanho do genoma. No genoma humano, 44% dos nucleotídeos são fornecidos por elementos repetitivos, muitos desses são derivados de elementos transponíveis ativos e são frequentemente julgados como DNA- sem função (STEIN, 2001).

2.3. Ocorrência de Microssatélites

Calcula-se que em humanos, um microssatélite seja encontrado a cada 6 Kb, principalmente nos braços cromossômicos (BECKMANN; WEBER, 1992). Segundo Morgante e Olivieri (1993), em plantas foram pesquisadas 34 espécies e suas sequências para repetições de dinucleotídeos e trinucleotídeos, sendo encontrada uma frequência de um microssatélite a cada 50 Kb. Nesse mesmo contexto, segundo Maughan, Saghai e Buss (1995), foi observado um microssatélite, aproximadamente, a cada 64 Kb em monocotiledôneas e um a cada 21 Kb em dicotiledôneas.

2.4. Distribuição dos Microssatélites

Os microssatélites ocorrem em todos os genomas eucarióticos e, parcialmente, também em procariotos e eubactérias (TAUTZ, 1989). São encontrados com maior frequência em genomas de eucariotos (elementos repetidos mais freqüentes em mamíferos CA e TG e em plantas AT). Os SSR têm sido observados em diversos organismos, humanos, baleia, *Drosophila*, camundongos, bovinos, ovinos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Os microssatélites podem ser encontrados em qualquer parte do genoma, tanto em regiões codificadoras quanto em não-codificadoras das proteínas. Devido à sua alta mutabilidade, microssatélites são conhecidos por ter um papel significativo na evolução do genoma pela criação e manutenção de variação genética quantitativa (TAUTZ; TRICK; DOVER, 1986; KASHI; KING; SOLLER, 1997).

Segundo You-Chun Li et al. (2002) os microssatélites são mais abundantes em regiões não-codificadoras. Esse argumento pode ser justificado, pois em regiões promotoras,

o comprimento de SSRs pode influenciar a atividade da transcrição (KASHI; KING; SOLLER, 1997). Tem sido demonstrado que SSRs em exons são menos abundantes do que em regiões não-codificadoras (HANCOCK, 1995) e *taxa* que apresentam diferentes preferências para diferentes tipos de SSR (BECKMANN; WEBER, 1992; LAGERCRANTZ; ELLEGREN; ANDERSSON, 1993; TAUTZ; SCHLÖTTERER, 1994). Além disso, o conteúdo total de microssatélites no genoma correlaciona-se com o tamanho do genoma dos organismos (HANCOCK, 1996b). Acredita-se que a distribuição de SSRs gênicos nos mapas genéticos refletem a distribuição de genes ao longo do mapa genético (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), os SSRs são frequentemente distribuídos ao acaso. Entretanto, estudos atuais demonstram que existem padrões específicos de distribuição dos diferentes motivos repetidos nos diferentes tipos de sequências: codantes, não codantes, introns e regiões intergênicas. Esses padrões ainda variam entre *taxa*, em termos da frequência de microssatélites e de tipos de repetições preferenciais. Essa especificidade pode ser compreendida, em parte, pela interação de mecanismos evolutivos através da seleção diferencial em regiões do genoma e em diferentes espécies. Deve-se considerar que, devido às sequências parciais disponíveis nos bancos de dados, os resultados se aplicam principalmente para as regiões dos genomas que contêm genes codificadores de proteínas (TÓTH; GÁSPARI; JURKA, 2000).

Os níveis relativos de variabilidade alélica em comprimentos de introns, exons, regiões intergênicas, ainda não foram adequadamente estudadas em todas as espécies (LONG; SOUZA, 1998). Espera-se que, no fenótipo, as consequências da variação de comprimento não sejam iguais entre as regiões do gene. Sequências que têm grandes e diretos efeitos sobre os fenótipos tendem a manter a menor quantidade de variação sob seleção. Portanto, espera-se que as sequências de exons tenham baixos níveis de polimorfismo de comprimento, mas os

níveis relativos de variação entre os exons, introns e outras regiões não são previsíveis, porque introns, bem como regiões promotoras, podem afetar a expressão gênica (BOLLE; HERRMANN; OELMULLER, 1996; LONG; SOUZA, 1998). Se esses sítios são mudados ou removidos, o produto do gene pode ser alterado, resultando em uma proteína não-funcional (BROWN; SMITH; SIMPSON, 1996). Laurie e Stam (1994) determinaram que o polimorfismo dentro de um intron do gene da enzima álcool desidrogenase em *Drosophila melanogaster* tem um efeito sobre a quantidade de proteína presente.

Da mesma forma, Fridman, Pleban e Zamir (2000) sugeriram que a variação do comprimento no intron de um gene do tomate, da enzima invertase foi o responsável pelas diferenças alélicas na expressão do gene. Além disso, o tamanho do intron em si parece ser forçado dentro dos limites máximo e mínimo pelas pressões de seleção (CARVALHO; CLARK, 1999). Não se sabe em que medida a variação dentro de algumas centenas de pares de bases da região promotora afetará a expressão. As evidências observadas sobre os níveis de variação relativa entre diferentes regiões do gene são necessárias para entender melhor a importância fenotípica de diferentes regiões do gene e prever a viabilidade do desenvolvimento de marcadores de DNA para amplificar regiões do gene em particular (HOLLAND et al., 2001).

Alguns dados substanciais indicam que a expansão e as contrações de SSRs em regiões codificantes de proteínas podem levar a um ganho ou perda da função dos genes através de mutação frameshift ou mRNA expandidos tóxicos. Os SSRs nos introns podem afetar a transcrição do gene, ou também induzir o silenciamento gênico mediado pela heterocromatina. Esses processos geram mudanças no DNA que deve ser reparado por sistema de DNA reparo, mismatch repair (MMR). A mutação não detectada pela correção do sistema MMR tornaria novos alelos nos locos SSR, e em seguida, regularia ou mudaria produtos de genes e, eventualmente, levaria a mudanças no fenótipo. Portanto, SSRs dentro

dos genes devem ser submetidos a mais forte pressão seletiva que outras regiões do genoma funcional devido à sua importância. Estes SSRs podem fornecer uma base molecular para rápida adaptação às mudanças ambientais em procariontes e eucariontes (LI et al., 2004).

A teoria *slippage* por si só não pode explicar a distribuição de microssatélites no genoma como um inteiro. O potencial inerente de uma sequência para formar conformações DNA alternativa pode ser importante para a geração de SSRs, mas não pode explicar as diferenças observadas entre os *taxa*. As enzimas e outras proteínas envolvidas em vários aspectos do processamento de DNA (replicação e reparação) e remodelagem da cromatina podem ser responsáveis pela especificidade nos *taxa* e abundância de microssatélites. Deve-se ressaltar que não somente a repetição do genoma difere, mas também o tipo preferido de microssatélites são muito diferentes (HANCOCK, 1996b). Isso pode indicar que SSRs desempenham um papel importante na evolução do genoma considerando que os processos responsáveis pela geração de SSR e fixação também devem ter sofrido alterações durante a evolução (TÓTH; GÁSPARI; JURKA, 2000).

2.5. Aplicações dos Microssatélites

Para a maioria das espécies, apenas uma pequena parte do genoma consiste de genes que codificam proteínas. O restante do genoma, durante muito tempo, foi considerado sem função, e nessa parte incluíam-se os microssatélites. As diversas funções dos microssatélites, tanto na organização da cromatina quanto na regulação dos processos metabólicos do surgimento de doenças humanas, a ativação ou inativação de genes e a produção de proteínas truncadas eram preteridas.

Microssatélites são altamente informativos, marcadores de *locus* específicos que foram relatados para muitas espécies de plantas incluindo milho (*Zea mays*), cevada

(*Hordeum vulgare*), alface (*Lactuca sativa*), arroz (*Oryza sativa*), girassol (*Helianthus annuus*), soja [*Glycine max* Merr], tomate (*Solanum lycopersicum*), e trigo (*Triticum aestivum*) (PAL et al., 2002). Sendo hipervariáveis, os microssatélites tem comprovado serem altamente informativos em estudos de genética e evolução (BUCHANAN et al., 1994; SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1992; PAL et al., 2002).

Os marcadores SSR são úteis para uma variedade de aplicações na genética e melhoramento de plantas, devido sua reprodutibilidade, relativa abundância e uma boa cobertura do genoma. Tendo diversas aplicações, tais como: genômica funcional, mapeamento associado, análises de diversidade, mapeamento genômico, transferabilidade e mapeamento comparativo, gene *tagging* e análises de *Quantitative Trait Locus* (QTL). De um modo geral, as *Expressed Sequence Tag* (EST) têm gerado projetos com grande quantidade de dados de sequências disponíveis publicamente para várias espécies de plantas; estes dados podem ser extraídos de *Simple Sequence Repeats* (SSRs). Estes SSRs são úteis como marcadores moleculares, pois desenvolvê-los tem um baixo custo financeiro, eles representam genes transcritos e funções putativas que podem ser frequentemente deduzidas por pesquisas de homologias. Claramente a mais significativa aplicação de EST-SSR é para mapeamento comparativo, com bons exemplos em gramíneas e espécies de leguminosas. Um banco de dados de EST-SSR com pares de *primers* que se amplificam em locus ortólogos entre espécies e que são uniformemente distribuídos nos genomas de arroz, *Medicago* e *Arabidopsis*, sendo muito úteis para o melhoramento genético, especialmente diminuindo custos com espécies cultivadas. O desenvolvimento de marcadores com alelos específicos para genes de importância agronômica são fundamentais para o avanço da ciência e melhoramento de plantas (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005).

Também podem ser utilizados para investigação forense, análise populacional, estudos ecológicos, paternidade e biologia da conservação, na construção de mapas genéticos, associação entre instabilidade do número de repetições e doenças genéticas humanas.

2.6. Desenvolvimento de marcadores baseados em microssatélites

Grande quantidade de trabalho é necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores. Uma biblioteca de fragmentos genômicos pequenos (300 a 500 pares de bases) é construída para o organismo de interesse. Estes clones são sequenciados para a presença de microssatélites utilizando-se sondas sintéticas complementares aos elementos repetidos mais comuns no organismo (por exemplo, poli GT para mamíferos onde elementos CA são mais comuns). Os clones positivos são sequenciados e pares de *primers* específicos são construídos para sequências únicas cuidadosamente selecionadas (utilizando-se programas de computador) de cada lado do microssatélite (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Para Zane, Bargelloni e Patarnello (2002), três metodologias são úteis na obtenção de *primers* microssatélites. A primeira é através da identificação das sequências simples repetidas em biblioteca de DNA genômico por meio da técnica de hibridização de colônias (RASSMANN; SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1991). O segundo método envolve o mecanismo de extensão do *primer* utilizando-se o DNA genômico do fago *M13 helper* para a clonagem de fragmentos de DNA para espécie de interesse (PAETKAU, 1999; OSTRANDER et al., 1992). E a última é a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas para determinadas repetições (HAMILTON et al., 1999).

Para identificar SSRs em bancos de dados existem vários critérios que podem ser usados, dependendo se serão levadas em conta a frequência global, a frequência dos diferentes comprimentos dos SSRs e dos motivos repetidos. Há várias ferramentas de pesquisa

disponíveis para SSR, com critérios e diferentes conjuntos de dados para a mineração de ESTs. Em geral, quando o comprimento mínimo da repetição é de 20 pb, os SSRs de plantas de várias espécies estão presentes em aproximadamente 5% das ESTs. A taxa de amplificação que se tem verificado em diversos estudos varia de 60 a 90% para os EST-SSRs e genômicos. Contudo, a função dos genes que contém SSRs e o papel dos motivos SSRs na função dos genes das plantas são pouco conhecidas (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005).

Para identificar repetições dos DNAs, vários algoritmos foram desenvolvidos. A identificação e caracterização de repetições são fundamentais para compreender a evolução, funcionamento e organização dos genomas e permitir a filtração para muitos tipos de pesquisas de homologia. As bio-ontologias e os problemas atuais na sua concepção e desenvolvimento incluem a capacidade de consulta em bases de dados e os problemas de construção de ontologias que descrevem o conhecimento complexo, tais como os fenótipos (BARD; RHEE, 2004).

2.7. Programa de Melhoramento Genético da aveia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel

O programa da UFPel, iniciado em 1995, lançou cinco cultivares de aveia branca, dando continuidade as pesquisas da instituição gerando resultados promissores para os próximos anos. O melhoramento genético tem contribuído de forma expressiva para o desenvolvimento da cultura da aveia no Brasil. Os programas de melhoramento têm apresentado maior interesse no desenvolvimento de constituições genéticas com elevado potencial produtivo e rendimento industrial.

A seleção de genótipos que evidenciam desempenho superior para a qualidade e rendimento industrial, aliado à alta produtividade e estabilidade na produção de grãos, tem

representado grande dificuldade, principalmente pela complexidade da expressão fenotípica destes caracteres, resultante de interações complexas entre fatores genéticos e de ambiente. Neste sentido, o conhecimento e adequada manipulação do germoplasma de aveia em programas de melhoramento poderão promover a obtenção, com maior facilidade, de genótipos superiores para os caracteres relacionados ao rendimento de grãos e à qualidade industrial, conseqüentemente, fornecer ao produtor cultivares mais estáveis e competitivas no mercado nacional (CARVALHO et al., 2007).

O primeiro passo para se alcançar o objetivo proposto é a caracterização das cultivares de aveia recomendadas para cultivo pela Comissão Brasileira de Pesquisa da Aveia, que são submetidas a diferentes ambientes de cultivo para a análise dos componentes diretos do rendimento, bem como, os atributos da qualidade industrial e nutricional do grão, principalmente no que se refere ao conteúdo de β -glucana. Estudos de herdabilidade dos distintos caracteres considerados serão efetuados na busca do entendimento da estabilidade e correlação entre caracteres, almejando uma estratégia mais efetiva de desenvolvimento de constituições genéticas que associem alta produtividade de grãos, elevado rendimento industrial e qualidade de grãos (CARVALHO et al., 2007).

Além disto, o Programa de Melhoramento da UFPel busca a identificação de genótipos mais estáveis em relação aos caracteres de interesse, para validar a disponibilização ao produtor e à indústria de cultivares de elevado padrão de produção e comercialização, bem como a possibilidade de introdução de genótipos promissores em blocos de cruzamento do programa de melhoramento do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da FAEM/UFPEL, para obtenção de ganho genético nestes caracteres (CARVALHO et al., 2007). Com a seleção assistida por marcadores moleculares reduz-se o tempo necessário para se obter um genótipo de interesse.

2.8. Marcadores Moleculares em aveia

Apesar da importância dessa espécie, poucos investimentos no setor de biotecnologia beneficiam estudos em aveia. Trabalhos de genética molecular têm demonstrado que o genoma mais antigo, dentre as gramíneas, é o arroz e que os demais cereais, como trigo, aveia, cevada e milho, originaram-se desse genoma. Há evidências suficientes de que muitos genes associados a caracteres quantitativos são iguais e podem ser idênticos por descendência nas diferentes espécies de gramíneas (WILSON; McCOUCH; SORRELS, 1996).

Este estudo utilizou dados de duas plantas consideradas modelos, a espécie *Oryza sativa*, o arroz, por causa de seu pequeno tamanho do genoma, mapa genético enriquecido, relativa facilidade de transformação e sintonia com outros cereais. E a *Arabidopsis thaliana* também devido a pequeno tamanho, curto tempo de geração, alta acessibilidade, fácil manipulação, pequeno genoma, ampla conservação de mecanismos. A disponibilidade de duas espécies modelo, arroz e *Arabidopsis* com tantos recursos genômicos, permite análises comparativas e inferências na evolução, adaptação e diferenciação das angiospermas (RENSINK; BUELL, 2004).

A variação em algumas das regiões não codificadas traz pequenas consequências nas populações de plantas e pode manter altos níveis de variação da sequência dentro dessas regiões. A consequência prática disso é que para as espécies cultivadas com limitada disponibilidade de marcador polimórfico com PCR (como aveia), bancos de dados de sequência pública podem ser facilmente e com sucesso prospectados para o desenvolvimento de marcadores polimórficos. A natureza do genoma alohexaplóide da *A. sativa* e a elevada taxa de autopolinização em cultivares de aveia torna a existência de múltiplos locus prováveis (HOLLAND et al., 2001).

Segundo Jannink e Gardner (2005) os marcadores baseados em PCR são geralmente mais rápidos e menos dispendiosos que os ensaios com marcadores baseados em hibridização (RFLP), fazendo-os úteis para aplicações no melhoramento, mas existem poucos marcadores para aveia. Novas abordagens para o desenvolvimento de marcadores acessíveis, incluindo o uso de pares de *primers* construídos para outras espécies ou uso de sequências de informação publicamente disponíveis. Tem sido aplicados frequentemente, entretanto, os dados de desenhos de *primers* vem demonstrando sequências de aveia com amplicons não frequentemente polimórficos (HOLLAND et al., 2001). As sequências de microssatélites em aveia geralmente são menos polimórficas do que em outras espécies, independente se as sequências são originadas da hibridação de bibliotecas como em Li, Rosnagel e Scoles (2000) e Pal et al. (2002), ou a partir da análise de sequências depositadas, como em Holland et al.(2001).

3. ARTIGO: Validação de marcadores microssatélites derivados de regiões funcionais do genoma de aveia

Fabiana Fonseca dos Santos⁽¹⁾, Luciano Carlos da Maia⁽²⁾, Fernando Irajá Félix de Carvalho⁽³⁾,
Ana Lúcia Soares Chaves⁽⁴⁾ e Antônio Costa de Oliveira⁽⁵⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Campus Universitário, s/nº Cep: 96010-900 Capão do Leão, RS, Brasil. E-mail fabianaproambiente@yahoo.com.br

^(2,3,5)Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Centro de Genômica e Fitomelhoramento, Campus Universitário, s/nº Cep: 96001-970 Capão do Leão, RS, Brasil Caixa-Postal: 354. E-mails lucianoc.maia@gmail.com, valescalc@hotmail.com, acostol@terra.com.br

⁽⁴⁾Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Química e Geociências, Departamento de Bioquímica, Campus Universitário, s/nº Cep: 96010-900 Capão do Leão, RS, Brasil Caixa-Postal: 354. E-mail alschaves@yahoo.com.br

Resumo

O conhecimento da estrutura genética de diversas espécies de aveia pode ser obtido com o uso de marcadores moleculares microssatélites, os quais representam poderosa ferramenta na averiguação de parâmetros genéticos. Este trabalho teve como objetivo buscar a identificação e a caracterização da ocorrência de marcadores microssatélites em aveia através da bioinformática, descrevendo a possível função de cada um dos genes, com base no genoma do arroz e da *Arabidopsis thaliana*. Visando o desenvolvimento e a validação de *primers*,

foram obtidos a partir de um banco de dados público de EST (*Expressed Sequence Tag*) de aveia um total de 7.632 *contigs* que tiveram eliminada sua redundância, e para caracterização de locos SSR (*Simple Sequence Repeat*) foi utilizado o programa *SSRLocator*. Para o desenho de iniciadores foi utilizado no *SSRLocator* o módulo contendo o programa *Primer3* sendo encontrados 58 *primers*, dos quais dez foram selecionados para a validação através da reação em cadeia da polimerase. Dez genótipos de aveia foram avaliados quanto ao nível de polimorfismo. Foi verificado polimorfismo em 80% dos *primers*, sendo que, o restante apresentou bandas monomórficas. A alta diversidade gênica revelada pelos marcadores microssatélites neste estudo possivelmente reflete uma alta diversidade genética dentro do germoplasma de *Avena sativa*.

Termos para indexação: bioinformática, iniciadores, polimorfismo, transferabilidade, *Avena sativa*.

Validation of microsatellite markers derived from functional regions of the oat genome

Abstract

The understanding of the genetic structure of the oat species can be obtained with the use of microsatellite molecular markers which represent powerful tools in the investigation of genetic parameters. This study aimed to search the identification and characterization of microsatellite markers occurrence in oat through bioinformatics, describing the possible role of individual genes based on the genome of rice and *Arabidopsis thaliana*. For the development and validation of EST (Expressed Sequence Tags) *primers*, sequences were obtained from a public database. A total of 7632 oat *contigs* were obtained after eliminating the redundancy. To characterize SSR (simple sequence repeats) loci, the *SSRLocator* program was used. For the design of *primers*, the module containing the program *Primer3* was used. A

total of 58 *primers* were found, from which ten were selected for validation by polymerase chain reaction. Ten genotypes were used to assess polymorphism detection ability of *primers*. Polymorphism was observed in 80% of *primers*, whereas the rest showed monomorphic bands. The high genetic diversity revealed by microsatellite markers in this study may reflect a high genetic diversity within the germplasm of *Avena sativa*.

Index terms: bioinformatics, *primers*, polymorphism, transferability, *Avena sativa*.

Introdução

A aveia é um importante cereal de inverno e devido a sua importância na rotação de culturas e adubação verde, sua área de cultivo no Brasil vem aumentando a cada ano. A aveia também é considerada alimento funcional pela SBAF (Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais), trazendo benefícios à saúde.

Os programas de melhoramento genético de aveia no Brasil tem pouco mais de quatro décadas, e só há pouco tempo cruzamentos vêm sendo realizados de forma sistemática com sucesso (BORÉM, 1999). A biotecnologia é uma aliada dos programas de melhoramento clássico, capaz de introduzir novas características às plantas selecionadas, de uma maneira rápida e precisa. As informações contidas nas ESTs (*Expressed Sequence Tags*) são importantes fontes de pesquisa, por causa da similaridade na organização do genoma e das sequências de nucleotídeos dos genes entre espécies de gramíneas. Visto que o genoma da aveia é pouco estudado, as informações do arroz, trigo e cevada, podem ajudar nos estudos de espécies órfãs como a aveia (PAL et al., 2002). Dentro das ESTs, a ocorrência de microssatélites pode gerar marcadores importantes para serem transferidos entre espécies próximas, uma vez que há uma tendência das ESTs de permanecerem mais conservadas.

Os marcadores microssatélites (SSR) possuem um alto polimorfismo, decorrente das altas taxas de mutação que sofrem e são flanqueados por sequências únicas podendo ser amplificados através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), (MORGANTE; OLIVIERI, 1993).

Os SSR ancorados em PCR utilizando-se *primers* complementares com repetições oferecem abordagem flexível para estudos de variação de DNA na maioria dos genomas eucariotos, com uso potencial em genética populacional, taxonomia molecular, mapeamento genômico, e satisfatória triagem para mutações somáticas (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994).

A estratégia da mineração de marcadores moleculares a partir da integração *in silico* de sequências com descrições funcionais dos genes demonstra ser promissora, pois, possibilita prever as funções para estes genes e verificar a associação destes com rotas bioquímicas e metabólicas responsáveis pelas características que se deseja analisar em rotinas *in vitro* (HENINNG et al., 2009). Os marcadores moleculares possibilitam a seleção assistida para genótipos de interesse agrônômico, sendo que, na ausência de marcadores para os caracteres de interesse pode-se obter estes marcadores através de análises de bioinformática. Com isto, pode-se aumentar a eficiência dos programas de melhoramento, contribuindo para o incremento da área cultivada e maior produtividade.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo buscar a identificação e a caracterização da ocorrência de marcadores microssatélites em ESTs de aveia, visando desenvolver marcadores para serem usados na cultura. A possível função de cada um dos genes correspondentes aos ESTs estudados foi proposta com base no genoma do arroz e da *Arabidopsis thaliana*.

Material e Métodos

Prospecção de iniciadores derivados de SSR-EST

Sequências EST (*Expressed Sequence Tag*) de aveia foram copiadas a partir do banco de dados NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*), totalizando 7.632 *contigs* que foram armazenadas em arquivo padrão fasta, em computadores do Centro de Genômica e Fitomelhoramento. Para eliminar a redundância entre EST do banco de dados foi utilizado o programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999).

Para a caracterização de locos SSR (*Simple Sequence Repeat*) foi utilizado o programa SSRLocator (MAIA et al., 2008) e, neste mesmo programa foi realizado PCR simulado para verificar quantos amplicons ocorreram em cada sequência.

Para o desenho de iniciadores foi utilizado no SSRLocator o módulo contendo o programa Primer3 (ROZEN; SKALETISKY, 2000). Os parâmetros para desenho dos iniciadores foram: T_m (*Temperature of melting*) mínima 57⁰C, máxima 63⁰C e ótima de 60⁰C, conteúdo GC de 40 a 50% e tamanho de fragmentos amplificados (*amplicon*) com mínimo de 100 e máximo de 300 nucleotídeos. Para comprimento dos iniciadores (*primer length*) foram selecionados mínimo de 19, máximo 22 e ótimo de 20 nucleotídeos ou pares de bases (pb).

Ontologia

Para a predição da função gênica (ontologia) as sequências de aveia foram comparadas nos programas BLASTN e BLASTX com sequências de arroz e *Arabidopsis* respectivamente, sendo as sequências homólogas selecionadas as com ($E\text{-value} \leq 1e^{-10}$). As sequências selecionadas tiveram suas funções pesquisadas no Gene Ontology (www.geneontology.org) e o Interpro (www.ebi.ac.uk/interpro). Das sequências escolhidas, foram encontradas algumas possíveis funções relacionadas: a sequência 1, ao etileno e os

processos de desenvolvimento da planta, regeneração de ramos, a sequência 377, proteína transmembrana que facilita o para transporte de íons, sequência 1394, proteínas do vacúolo, similares as caspases e possivelmente envolvidas no mecanismo de morte celular programada que ocorre em diferentes fases de desenvolvimento da planta, sequência 2259, permeases e transporte de aminoácidos para a célula, sequência 2345, kinesinas, relacionadas a motilidade celular e reparo de lesões e modelagem tecidual, sequência 3480, mobilização e armazenamento de ferro, sequência 3631, ciclofilina que participa de ligação que ativa íons que promovem permeabilidade transitória, sequência 3777, proteína hipotética, transportadora de metabólitos que permitem a circulação e interação de substâncias, sequência 4180, proteína hipotética, transferência lipídica e armazenamento de proteínas nas sementes e a sequência 4421 proteína hipotética que participa da transferência de metabólitos.

Primers e genótipos

Foram escolhidas dez sequências com seus respectivos *primers* construídos, de acordo com posição do SSR para permitir uma melhor amplificação. Em julho de 2009 foram selecionados dez genótipos de aveia branca do banco ativo do germoplasma do Centro de Genômica e Fitomelhoramento URS 20, UFRGS 14, UPF 16, IAC 17, URS 21, UFRGS 19, UPF 18, ALBASUL, BARBARASUL e BRISASUL. Cinquenta sementes de cada genótipo foram colocadas para germinar, a 20⁰C na estufa incubadora de BOD, conforme as Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 1992), durante quinze dias. Posteriormente foi realizada a extração de DNA com aproximadamente 300 mg de tecido foliar fresco, no laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPEL com as dez cultivares, conforme o protocolo CTAB 2% (SAGHAI-MAROOF et al., 1984). A verificação da concentração e qualidade final do DNA extraído pode ser verificada pela visualização em gel de agarose, comparando-se com padrões de concentrações moleculares conhecidas.

Ainda, foram realizados testes com cinco dos dez *primers* de aveia (1, 377, 1394, 2345, 3631) para dois genótipos de arroz (Sinuelo, Fronteira) e três de trigo (CD117, Tangará, Quartzito).

Reação em Cadeia da Polimerase

As reações de amplificação (PCR) foram realizadas em termociclador MJ research modelo PTC-100. Utilizou-se 30 ng de DNA genômico total que foram combinados com 1,5pM de cada *primer* microsatélite, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 mM de cloreto de magnésio e 0,1U de Taq DNA polimerase em volume final da reação de 20µL. O programa de amplificação utilizado: (i) desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, (ii) 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C (*primers* 1394, 3631), 58°C (*primers* 1, 377, 2345, 3480, 3777, 4180, 4421) ou 60°C (*primer* 2259), por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, e (iii) extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto da amplificação separado por eletroforese foi visualizado em géis de agarose 2% corados com brometo de etídeo, por 1h a 80 volts, e também foram revelados na acrilamida a 6% em uma corrida a 60 watts durante 2h e 30min. Os fragmentos amplificados em acrilamida foram visualizados após coloração do gel com nitrato de prata, seguindo protocolo descrito por Creste, Tulmann e Figueira (2001). O tamanho dos alelos foi estimado em comparação visual com o marcador de peso molecular (de 50pb a 1000pb) de Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

Foi construída uma matriz de dados, com atribuição de escores, baseada na ausência (0) e presença (1) de bandas, usando o software NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analyses for Personal Computers), versão 2.1 (ROHLF, 2001). A análise de similaridade entre os genótipos foi efetuada empregando-se o coeficiente de Jaccard, através do SIMQUAL (similaridade para dados qualitativos). O agrupamento dos genótipos foi realizado pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA), através de SAHN

(agrupamento sequencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo), de acordo com Sneath & Sokal, citados por Crisci e Armengol (1983). O dendrograma foi seccionado ao nível de precisão de 0,15 para observação dos grupos formados.

Resultados e Discussão

Este trabalho mostrou a utilidade dos marcadores microssatélites em investigar o nível de variabilidade genética, a distribuição desta variação e as relações genéticas existentes dentro de um grupo de genótipos elite da cultura da aveia no Brasil.

As 58 sequências obtidas através do programa *SSRLocator*, foram submetidas a um alinhamento de nucleotídeos (BLASTN) que resultou em 31 sequências homólogas com o arroz e 12 sequências homólogas com a *Arabidopsis*. No alinhamento de nucleotídeos traduzidos contra uma base de polipeptídeos (BLASTX), foram encontradas 22 sequências homólogas com o arroz e 17 sequências homólogas com a *Arabidopsis*. As ocorrências de locos microssatélites em regiões expressas de aveia (ESTs) foram analisadas e descritas quanto a função potencial dos genes nos quais estavam inseridos. As sequências tiveram suas funções relacionadas a rotas bioquímicas e metabólicas que fazem parte dos processos de desenvolvimento da planta, em sua regeneração, desidratação, transporte de metabólitos, movimentos celulares, armazenamento, regulação de íons, circulação e interação entre substâncias.

A busca por regiões funcionais do genoma da aveia visou o desenvolvimento e a validação de iniciadores (*primers*) para a utilização em futuras análises genéticas de aveia e possível transferabilidade desses marcadores para espécies correlacionadas. Dos testes realizados com cinco *primers* de aveia para dois genótipos de arroz e três de trigo, apenas um

deles, o *primer* 2345 amplificou nos três genótipos de trigo testados, respectivamente: (CD117, Tangará, Quartzo) e em arroz o genótipo que obteve amplificação foi o Fronteira.

A natureza codominante dos marcadores microssatélites possibilita genotipar um indivíduo a partir do padrão de bandas geradas. A análise de similaridade a partir do coeficiente de Jaccard está representada na figura 1. Pelo dendrograma pode-se observar que cinco grupos principais foram formados: o grupo 1 formado pelo genótipo Barbarasul, o grupo 2 formado pelos genótipos Brisasul, UFRGS19, UPF18 e UFGRS14, o grupo 3 formado pelos genótipos Albasul e IAC7, o grupo 4 formado por URS 21 e o grupo 5 formado por URS20 e UPF16. A maior similaridade foi observada entre UPF18 e UFRGS14, seguidos respectivamente por: Brisasul e UFRGS19, URS20 e UPF16, Albasul e IAC7. Altos níveis de similaridade genética são esperados entre indivíduos de um mesmo subgrupo, pois indica que partilham uma origem comum. Porém, estes resultados devem ser observados com cautela devido ao fato do pequeno número de marcadores utilizados. A similaridade média entre os genótipos foi de 0,67 e o valor do coeficiente de correlação cofenética (r) de 0,86 revelou um bom ajuste entre os genótipos, a matriz de similaridade e o dendrograma.

Foram testados um total de dez *primers* para amplificação de produtos específicos em reações de PCR, em dez genótipos de aveia, com o objetivo de validação. No caso de ausência de amplificação, tentou-se otimizar as condições da PCR, incluindo temperaturas estimadas de anelamento diferentes concentrações de *primers*, ajuste da concentração de $MgCl_2$. Do total, dez (100%) pares de *primers* amplificaram. Com Holland et al. (2001) 89% dos marcadores microssatélites desenvolvidos revelaram a presença ou ausência de polimorfismos. Li et al. (2009) usaram sequência simples de repetição cloroplasto consenso (ccSSR) para avaliar a variação genética e as relações genéticas de 80 acessos de 25 *taxa* do gênero *Avena*, sendo que 15 dos 16 marcadores ccSSR (93,75%) foram polimórficos. O

índice médio de similaridade genética entre os 80 acessos *Avena* foi 0,545, variando 0,188-1,000.

Neste estudo ocorreram 80% de bandas polimórficas. O alto polimorfismo observado entre os grupos genômicos, possivelmente reflete, a grande variabilidade existente dentro do complexo de genótipos de *Avena sativa*, como também comprova a natureza multialélica deste tipo de marcador. Ainda, 20% de bandas monomórficas, sendo que três pares de *primers* (1, 1394, 3631) apresentaram falhas na amplificação de alguns indivíduos. A ausência de amplificação em alguns genótipos pode demonstrar diferenças nas sequências que flanqueiam os microssatélites, produzindo alelos nulos, os quais podem ser detectados após várias repetições do experimento, para garantir que não ocorreram falhas na reação. O mais alto polimorfismo foi obtido com os *primers* 4180 e 4421 (Figura 2), e o mais baixo pelos *primers* 1 e 3777. O *primer* 3777 apresentou heterozigose em oito genótipos. A utilização de uma amostra de dez *primers* de EST-SSRs, revelando que 80% dos *primers* apresentaram polimorfismo entre os genótipos de aveia, indica que dos 58 EST-SSRs encontrados, conforme a tabela 1, 46 devem funcionar em aveia, sendo uma boa contribuição para futuros trabalhos de mapeamento genético da cultura.

Apesar da importância da aveia, ainda são poucos os estudos dessa cultura. Segundo Li, Rosnagel e Scoles (2000), o desenvolvimento de microssatélites em aveia ficava atrás de outras culturas de cereais há dez anos atrás. Entretanto, há relatos que para espécies como aveia, os pesquisadores podem adquirir informações facilmente em bancos de dados públicos e desenvolver marcadores polimórficos (HOLLAND et al., 2001).

Os microssatélites não são mais polimórficos que outros marcadores (RFLP, AFLP). Mas, com SSRs únicos pré-selecionados de bibliotecas ou sequências com poucas cópias, o número de marcadores polimórficos é grande (PAL et al., 2002). No entanto, Varshney et al.

(2002) relatam que entre a mineração e a análise foram encontrados microssatélites em uma escala de 6-11% das sequências de EST total de todas as espécies de cereais (arroz, cevada, trigo, milho, sorgo e centeio) estudadas, com exceção de aveia (0,4%), onde apenas um pequeno conjunto de dados estava disponível. Considerando que os marcadores SSR derivados de EST são geralmente menos polimórficos, em comparação com SSRs genômicos que são situados em regiões mais conservadas do genoma. No entanto, este demérito pode ser compensado pelo seu maior potencial de transferência de espécies afins às vezes até mesmo em diferentes níveis taxonômicos.

Para Tinker et al. (2009) a descoberta genômica em aveia e sua aplicação à melhoria da cultura têm sido dificultada pela falta de marcadores genéticos comuns a diferentes mapas genéticos, e pela dificuldade de realização de análise do genoma inteiro utilizando marcadores de alto rendimento. O arsenal de marcadores moleculares em aveia é baseado em tecnologias que incluem SCAR, SSR, AFLP e RFLP. Infelizmente, essa diversidade de tecnologias cria dificuldades na realização de genômica comparativa na comunidade de aveia. Tecnologias baseadas em PCR são as mais fáceis de implementar, mas exigem uma grande quantidade de diferentes *primers* e condições de amplificação que podem necessitar de otimização em diferentes laboratórios.

Esforços para aumentar a disponibilidade de marcadores microssatélites em aveia estão em curso, mas apenas um número limitado destes marcadores foram publicados, e apenas um subconjunto deles são polimórficos em qualquer dada população de aveia. Futuros avanços na pesquisa de aveia, incluindo o sequenciamento e a genômica funcional, dependerá da disponibilidade de um consenso robusto de mapeamento contendo marcadores de confiança que podem ser registrados numa base de alto rendimento. Além disso, há indícios crescentes de que a associação de estudos do genoma inteiro pode render resultados em um

informativo de endogamia com espécies como o trigo e essa estratégia tem mostrado um bom potencial em aveia (TINKER et al., 2009).

Conclusões

1. O auxílio da bioinformática tanto na busca e qualidade bem como na interpretação dos resultados gerados de microssatélites, facilita o desenvolvimento de *primers* desenhados, influenciando diretamente na eficácia do marcador e tempo para sua construção.

2. Através das buscas em bancos de dados públicos pode-se encontrar 58 EST-SSRs em aveia, com o programa SSRLocator, comparadas no BLASTN e BLASTX com o arroz e *Arabidopsis*, permitindo verificar grande homologia entre as espécies, sugerindo uma possível transferabilidade desses marcadores para espécies correlacionadas.

3. A construção de novos marcadores SSR a partir EST de bancos de dados públicos e sua validação em laboratório é importante e necessária para contribuir em futuros trabalhos de mapeamento genético de aveia. Foram obtidos 8 pares de *primers* polimórficos de 10 avaliados, sendo considerado um bom resultado.

4. A alta diversidade gênica revelada pelos marcadores microssatélites neste estudo possivelmente reflete uma alta diversidade genética dentro do germoplasma de *Avena*. Estes dados permitem sugerir que o material analisado é representativo de parte da diversidade genética existente em *Avena sativa*.

Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, p.365, 1992.
- BORÉM, A. **Hibridação artificial de plantas**. Universidade Federal de Viçosa, p. 121-125, 1999.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. **Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining**. Plant Molecular Biology Reporter, v. 19, p. 299-306, 2001.
- CRISCI, J.V.; ARMENGOL, M.F.L. **Introducción a la teoría y practica de la taxonomia numerica**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 132p, 1983.
- HENINNG, F.A.; MAIA, L.C.; MERTZ, L.M.; ZIMMER, P.D.; OLIVEIRA, A.C. **Predição in silico de Marcadores Microsatélites Relacionados ao Tegumento de Sementes de Soja**. Revista Brasileira de Sementes, v. 31, n. 4, p. 049-056, 2009.
- HOLLAND, J.B; HELLAND, S.J.; SHAROPOVA, N.; RHYNE, D.C. **Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promote regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat**. Genome, v. 44, p. 1065-1076, 2001.
- HUANG, X.; MADAN, A. **CAP3: A DNA sequence assembly program**. Genome Research, n. 9, p. 868-877, 1999.
- Interpro Protein sequence analysis & classification. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>_Acesso em 2009.

LI, C.D.; ROSSNAGEL, B.G.; SCOLES, G.J. **The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars.** Theoretical and Applied Genetics, n.101, p. 1259-1268, 2000.

LI, W. T.; PENG, Y. Y.; WEI, Y. M.; BAUM, B. R.; ZHENG, Y. R. **Relationships among *Avena* species as revealed by consensus chloroplast simple sequence repeat (ccSSR) markers.** Genetic Resources and Crop Evolution, v. 56, n. 4, p. 465-480, 2009.

MAIA, L. C.; PALMIERI, D. A.; SOUZA, V. Q.; KOPP, M. M.; CARVALHO, F. I. F.; COSTA, K. M.; SIU, G.; HOOD, L.E.; SHASTRI, N.; OLIVEIRA, A. C. **THE MOLECULAR-GENETICS OF THE T-CELL ANTIGEN RECEPTOR AND T-CELL ANTIGEN SSRLocator – Tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation.** International Journal of Plant Genomics, 2008.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. **PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics.** The Plant Journal, v. 3, p. 175-182, 1993.

PAL, N; SANDHU, J.S; DOMIER, L.L; KOLB, F.L. **Development and Characterization of Microsatellite and RFLP-Derived PCR Markers in Oat.** Cell Biology & Molecular Genetics, v.42, p.912-918, 2002.

ROHLF, J. **NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** Version. 2.1. New York: Exeter, 2001.

ROZEN, S.; SKALETSKY H. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** Methods Mol Biol, v. 132, p. 365-86, 2000.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. **Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A, v.89, n.2, p.1477-1481, 1984.

The Gene Ontology. Disponível em : <http://www.geneontology.org/> Acesso em 2009.

TINKER, N. A.; KILIAN, A.; WIGHT, C. P.; USZYNSKA, K. H.; WENZL, P.; RINES, H. W.; BJØRNSTAD, A.; HOWARTH, C. J.; JANNINK, J. L.; ANDERSON, J. M.; ROSSNAGEL, B. G.; STUTHMAN, D. D.; SORRELLS, M. E.; JACKSON, E. W.; TUVESSON, S.; KOLB, F. L.; OLSSON, O.; FEDERIZZI, L. C.; CARSON, M. L.; OHM, H. W.; MOLNAR, S. J.; SCOLES, G. J.; ECKSTEIN, P. E.; BONMAN, J. M.; CEPLITIS, A.; LANGDON, T. **New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplasm characterization.** BMC Genomics, p. 1-22, 2009.

VARSHNEY, R. K.; THIEL, T.; STEIN, P. L.; GRANER, A. ***In silico* analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species.** Cellular & Molecular Biology Letters, v. 7, p. 537-546, 2002.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. **Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.** Genomics, San Diego, v.20, p.176-183, 1994.

Tabela 1. Lista de iniciadores derivados de regiões SSR de sequências EST de aveia.

Sequencia	Contig	Tipo	LocoSSR	Foward	TM Foward	Reverse	TM Revers	Product Size
1	sequence_1			GCACACACCATCCGCTCTCC	62,637	CACGCCCTGAAGTGTGTC	62,777	170
2	sequence_10			CGAGGCGTAGTAGATACCGC	59,889	ACGATAAAACCGACAGGCAC	60	284
3	sequence_39			AAACTCGATCCGTGTTGAGG	60,111	GCGATTCCATTAACGAGAGG	59,668	277
4	sequence_59			GGAGTCATCCATCCCAAATG	60,135	TCTGCATCTGGTTCTGCATC	59,95	297
5	sequence_59			GGAGTCATCCATCCCAAATG	60,135	TCTGCATCTGGTTCTGCATC	59,95	297
6	sequence_65			GGCCAGGTCGACAAGTAGAT	59,166	GAGAGGAAGATGGATGCTCG	59,91	112
8	sequence_97			ACAAGTGTTCCTCCTCGTCG	60,298	AACGGCCCAACAACGTAAAC	59,898	295
10	sequence_377			GGAGACGACGGTAGAGGTGA	60,261	TGCTGGATTTTCATGGTGGTA	59,924	246
11	sequence_397			TTTGGTTGGGTGAAGAGGAC	59,943	CAGCAGCAAGAAAGCACAAAG	59,928	299
12	sequence_455			TCCTCCTCCAGGATGTGACT	59,638	TTCTATCTGAAACCGGCCAC	60,074	263
13	sequence_496			GGCAGGAGGGAGAGAGAGA	60,649	TTGTGGTGCGAGGGATTGTA	59,964	111
14	sequence_1007			ATGGATTACTGCTGCTGGCT	59,866	CAAGAAGGCACAGAACCTCC	59,844	206
17	sequence_1049			GGTCAAGACAGATCCACCCA	60,934	CCCAGGCTGAAGATAAGCAC	59,836	225
18	sequence_1133			CCTCGATGATCCGTGAAACT	60,073	AGCGATTGGAGGAATTACACA	59,583	101
21	sequence_1394			GCTTGTGTGAATGTGTGGCT	59,758	GCTGGTGATGTCCGTGTATG	59,992	287
22	sequence_1434			ATCGGATCATGGAGAGATCG	59,995	TGCATCTTCAAAGGCACCA	60,257	267
23	sequence_1578			TTTCTTTCTCGGTGGGTCTC	59,259	ACATGCAATTCTCACCCGTA	59,995	191
24	sequence_1623			CCACCGACGAATCATCTTTT	59,933	TCCAATCCATTTCTTTTCCC	60,995	213
25	sequence_1646			GGGTAGCCAACGAAGACAA	60,11	GAGCTGGGAAGAACAGATGC	59,957	206
26	sequence_1678			GATTGGTATAGCACACGCC	60,361	AGCTTATGCCTTTCCGGA	60,228	297
27	sequence_1704			GAGCAAAATGGTTGGGAAAGA	60,051	GTCAACTCCACCACGTTCT	60,009	142
28	sequence_1974			TGACTCGATCTTTGGACCTTT	60,11	ACAACAAGGGAATACAGCCG	59,993	297
30	sequence_2259			GAGCTCCATTGCGTTGTTGT	60,119	ATATGGCAATAGCAGCCAG	60,081	149
31	sequence_2273			AAGGAGAGCACTGGGGATT	60,074	GTACCCGAGACCTAGCCTCC	60,096	299
32	sequence_2293			CTCATGTGCATGCATTTTCC	60,08	TTCATTGGTTTCTCTTGCC	59,916	211
34	sequence_2345			GCTTGGGTGGAGACTCAAAG	59,844	GATGGATTGCATCCCTCAAT	59,715	271
35	sequence_2457			ACAGGAACAATTCGCTCAGG	59,966	CAAAAACGCTGCTTCTGCCA	60,027	185
36	sequence_2573			CTCTCTCCACGACGTCTC	59,986	GCATTTTACATGCATCGGGT	60,731	285
37	sequence_2577			GCAGAAGTCCCTTTTTCGGTT	60,61	AATAAGGAAGAAAACGCCCC	59,442	165
38	sequence_2593			GGGCTACGTGCCAAGATAAA	60,096	CCTTGACGTACAGCTACCA	59,928	116
39	sequence_2871			CGCATCTGGTGACAAACTA	60,011	AATACCGATCGCCTTGTGAC	59,962	256
41	sequence_2957			CTGGGGCAGGGAGAATACTA	59,146	CGTCGACAACTGAAAAAGCA	60,027	279
42	sequence_3094			TTTGGTGTGCAAGGAGTCTG	59,873	TGCGATAAATCAACCACTCG	59,688	207
43	sequence_3241			AGGACAAAACATGGCGAATC	59,939	GATCCTCACCATGAAGGGAA	59,862	138
44	sequence_3390			CTCATTTTCGGGGTTCTACCA	59,926	ATCAAGGAGCAGCGAGACAT	59,981	217
45	sequence_3480			ATGAGCAAACCGGATACAGG	59,955	AAGTAAGCAGCTCTGCGAGG	59,92	245
46	sequence_3548			GGAGACGGGGTTACAACCTGA	59,966	GGGTCGGGTCGTCTTCTTAT	60,328	282
47	sequence_3625			AAACATCGCCATAAGGATCG	59,923	TGTTACGTACATCCGGCAAA	59,992	196
48	sequence_3631			GAGCTGGGAAGAACAGATGC	59,957	GCTGGGGATAATTCTGTGGA	59,894	292
49	sequence_3777			GATCGAGGAGGAGAAAAGGG	60,147	TTGAGCTCTCTCGGTGACAA	59,701	238
50	sequence_3803			CGGACTGATCGTAACAGCAA	59,864	TTACACAGAAGAAACCGGGC	60,11	277
51	sequence_3841			AGCAAGGCATCACACTCTCC	60,418	GAGTAGCTGCACCTCACCTC	59,48	180
52	sequence_3944			GAGCTGGGAAGAACAGATGC	59,957	GGGTTAGCCAACGAAGACAA	60,11	206
53	sequence_3953			GCTTTTCTGCTCTCTGATG	59,955	GAAACCAAGCCAGAAACCT	60,476	150
54	sequence_4093			CAAGCACAACACAGACCCC	60,203	GAGGAAACCCATCACCAGAA	59,903	186
55	sequence_4131			CAAACTGAGACACGCAT	59,751	TCCAGTTTGTGACAGGATG	59,831	259
56	sequence_4180			GATTTGTTGCAACCATGTGC	59,979	TCTGACAACAAACAGAGCAA	59,475	169
57	sequence_4270			CTGCTGAGTGGATGCCTGTA	60,008	AGACACAATCCCAAGAGTGC	60,12	201
58	sequence_4421			CACCGCACATGCTATCTCT	58,903	CTGGCTGGAGCATACCAACT	60,277	270

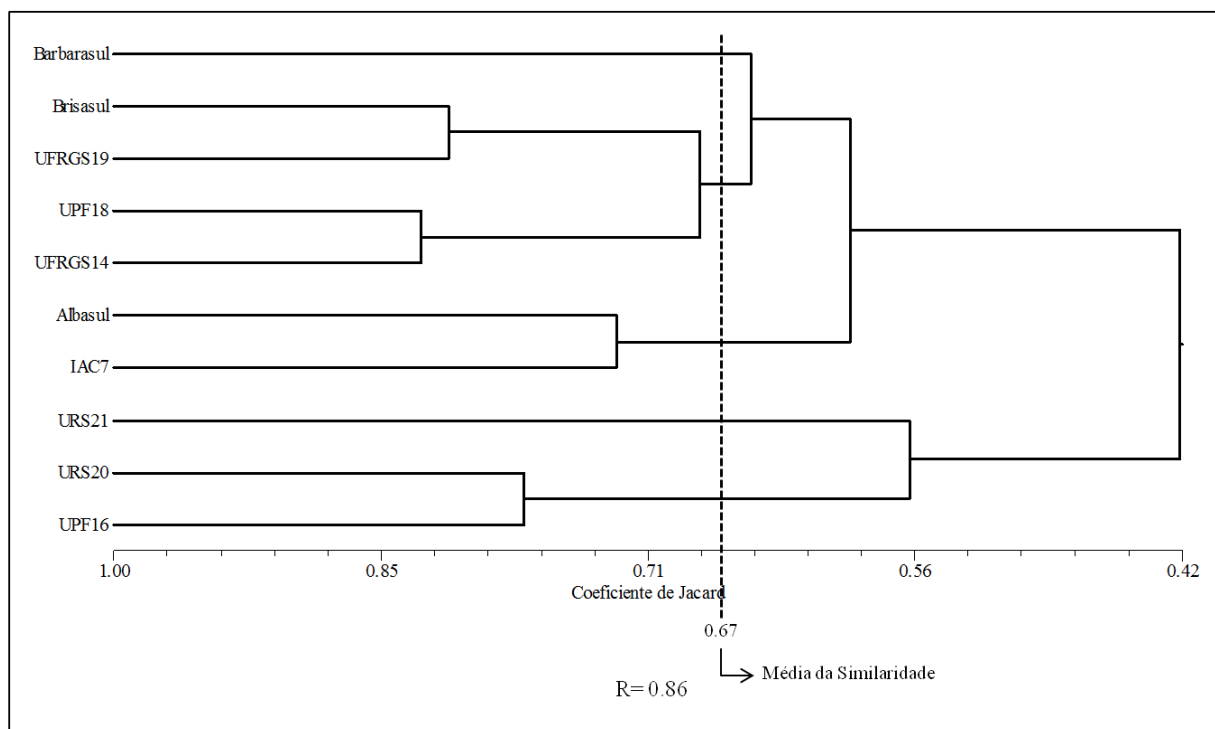


Figura 1. Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 10 genótipos de aveia, através do coeficiente de Jaccard.

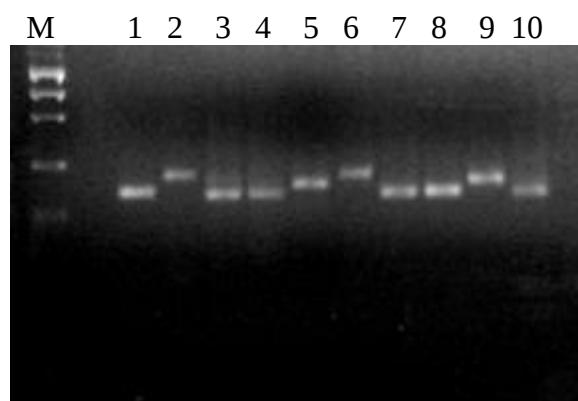


Figura 2. Polimorfismo microssatélite em genótipos de aveia, respectivamente (Barbarasul, Albasul, Brisasul, UFRGS19, IAC7, URS21, UPF18, UFRGS14, URS20, UPF16) empregando o primer 4421 em gel de agarose.

4. CONCLUSÕES

O auxílio da bioinformática tanto na busca e qualidade bem como na interpretação dos resultados gerados de microssatélites, facilita o desenvolvimento de *primers* desenhados, influenciando diretamente na eficácia do marcador e tempo para sua construção.

Através das buscas em bancos de dados públicos pode-se encontrar 58 EST-SSRs em aveia, com o programa SSRLocator, comparadas no BLASTN e BLASTX com o arroz e *Arabidopsis*, permitindo verificar grande homologia entre as espécies, sugerindo uma possível transferabilidade desses marcadores para espécies correlacionadas.

A construção de novos marcadores SSR a partir EST de bancos de dados públicos e sua validação em laboratório é importante e necessária para contribuir em futuros trabalhos de mapeamento genético de aveia. Foram obtidos 8 pares de *primers* polimórficos de 10 avaliados, sendo considerado um bom resultado.

A alta diversidade gênica revelada pelos marcadores microssatélites neste estudo possivelmente reflete uma alta diversidade genética dentro do germoplasma de *Avena*. Estes dados permitem sugerir que o material analisado é representativo de parte da diversidade genética existente em *Avena sativa*. Nos próximos anos a pesquisa de aveia terá um maior desenvolvimento com informações de sequenciamento e genômica funcional.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARD, J.B.L.; RHEE, S.Y. **Ontologies in Biology: Design, Applications and Future Challenges**. Nature Reviews/Genetics, v. 5, p. 213-221, 2004.

BECKMANN, J. S.; WEBER, J. L. **Survey of human and rat microsatellites**. Genomics, v. 12, p. 627-631, 1992.

BIDICHANDANI, S.I.; ASHIZAWA, T.; PATEL, P.I. **The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure**. Am. J. Hum. Genet. v. 62, p. 111–121, 1998.

BOLLE, C.; HERRMANN, R.G.; OELMULLER, R. **Intron sequences are involved in the plastid- and light-dependent expression of the spinach Psad gene**. Plant J. v. 10, p. 919–924, 1996.

BORÉM, A. **Hibridação artificial de plantas**. Universidade Federal de Viçosa, p.121-125, 1999.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms**. American Journal of Human Genetics, n. 32, p. 314-331, 1980.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, p.365, 1992.
- BROWN, J.W.S.; SMITH, P.; SIMPSON, C.G. ***Arabidopsis* consensus intron sequences**. Plant Mol. Biol. v. 32, p. 531–535, 1996.
- BUCHANAN, F.C.; ADAMS, L.J.; LITTLEJOHN, R.P.; MADDOX, J.F.; CRAWFORD, A.M. **Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites**. Genomics v. 22, p. 397–403, 1994.
- BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A. Y.C.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S; BRONDANI, R.V. **Marcadores Microssatélites em espécies vegetais**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n.29, p.46-50, 2003.
- CAIXETA, E.T.; BORÉM, A.; KELLY, J.D. **Microssatelite Markers for Common Bean**. Annual Report of Bean Improvement, n. 46, p. 157-158, 2003a.
- CAMPOS, S.D. **Marcadores moleculares de DNA microssatélite**. Disponível em: WWW.drashirleydecampos.com.br. Acesso em 11 de junho de 2003.
- CARVALHO, A.B.; CLARK, A.G. **Intron size and natural selection**. Nature (London), 401, p. 344, 1999.
- CARVALHO, F. I. F.; SILVA, J. A. G.; HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C. **Estabilidade no comportamento de caracteres relacionados ao rendimento de grãos, à qualidade industrial e nutricional em aveia branca (*Avena sativa* L.)**. Projeto CAPES, FAPERGS, CNPq, Iniciativa privada Fundação Pró-Sementes, 2007.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. **Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining**. Plant Molecular Biology Reporter, v. 19, p. 299-306. 2001.
- FAOSTAT Database Results. Disponível em: <http://www.fao.org/>. Acesso em 10 de outubro de 2003.

FARIAS, I. P.; HRBEK, T.; BRINKMANN, H. **Desenvolvimento de microssatélites para *Arapaima gigas***. (Protocolo), 20 p. Universidade Federal do Amazonas. 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Ministério da Agricultura e do Abastecimento-MA , Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia-CENARGEN, p.15, 1996.

FRIDMAN, E.; PLEBAN, T.; ZAMIR, D. **A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v. 97, p. 4718–4723, 2000.

GACY, A.M.; GOELLNER, G.; JURANIĆ, N.; MACURA, S.; MACMURRAY, C.T. **Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro**. Cell, 81, p. 533–540, 1995.

HAMILTON, M.B.; PINCUS, E.L.; DIFIORE, A.; FLEISCHER, R.C. **Universal Linker and Ligation Procedures for Construction of Genomic DNA Libraries Enriched for Microsatellites**. Biotechniques, v. 27, p. 500-507, 1999.

HANCOCK, J. M. **The contribution of slippage-like processes to genome evolution**. Journal Molecular Evolution, v. 41, p. 1038-1047, 1995.

HANCOCK, J. M. **Simple sequences and the expanding genome**. BioEssays v. 18, p. 421–425, 1996b.

HENINNG, F.A.; MAIA, L.C.; MERTZ, L.M.; ZIMMER, P.D.; OLIVEIRA, A.C. **Predição *in silico* de Marcadores Microssatélites Relacionados ao Tegumento de Sementes de Soja**. Revista Brasileira de Sementes, v. 31, n 4, p. 049-056, 2009.

HOELZEL, R.; HOELZEL, A. R. **Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach**. Paperback, p. 468, 1998.

HOLLAND, J.B; HELLAND, S.J.; SHAROPOVA, N.; RHYNE, D.C. **Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promote regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat.** Genome, v. 44, p. 1065-1076, 2001.

HUANG, X.; MADAN, A. **CAP3: A DNA sequence assembly program.** Genome Research, n. 9, p. 868-877, 1999.

Interpro Protein sequence analysis & classification. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> Acesso em 2009.

JAKUPCIAK, J. P.; WELLS, R. D. **Genetic instabilities in (CTG-CAG) repeats occur by recombination.** J. Biol. Chem., n. 274, p. 23468-23479, 1999.

JANNINK, J.L; GARDNER, S.W. **Expanding the Pool of PCR-Based Markers for Oat.** Genomics, Molecular Genetics & Biotechnology, v.45, p.2383-2387, 2005.

KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. **Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation.** Trends in Genetics, v. 13, p. 74-78, 1997.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. **The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates.** Nucl. Acids Res. v. 21, p. 1111-1115, 1993.

LAURIE, C.C.; STAM, L.F. **The effect of an intronic polymorphism on alcohol dehydrogenase expression in *Drosophila melanogaster*.** Genetics, v. 138, p. 379–385, 1994.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. **Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution.** Molecular Biology and Evolution, v.4, n.3, p. 203-221, 1987.

LI, C.D.; ROSSNAGEL, B.G.; SCOLES, G.J. **The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars.** Theor. Appl. Genet, n.101, p. 1259-1268.2000.

- LI, W. T.; PENG, Y. Y.; WEI, Y. M.; BAUM, B. R.; ZHENG, Y. R. **Relationships among *Avena* species as revealed by consensus chloroplast simple sequence repeat (ccSSR) markers.** Genetic Resources and Crop Evolution, v. 56, n. 4, p. 465-480, 2009.
- LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. **Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution.** Molecular Biology and Evolution, v.21, n.6, p. 991-1007, 2004.
- LONG, M.; SOUZA, S.J. **Intron–exon structures: from molecular to population biology. In Advances in genome biology, genes and genomes.** Edited by R.S. Verma. JAI Press, London, p. 143–178, 1998.
- MAIA, L. C.; PALMIERI, D. A.; SOUZA, V. Q.; KOPP, M. M.; CARVALHO, F. I. F.; COSTA, K. M.; SIU, G.; HOOD, L.E.; SHASTRI, N.; OLIVEIRA, A. C. **THE MOLECULAR-GENETICS OF THE T-CELL ANTIGEN RECEPTOR AND T-CELL ANTIGEN SSRLocator – Tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation.** International Journal of Plant Genomics, 2008.
- MAUGHAN, P. J.; SAGHAI MAROOF, M. A.; BUSS, G. R. **Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean.** Genome v. 38, p. 715–723, 1995.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. **PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics.** The Plant Journal, v. 3, p. 175-182, 1993.
- MULLIS, K.; FALLONA, F. **Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction.** Methods Enzymol, v. 55, p. 335-350, 1987.
- OGLIARI, J. B.; BOSCARIOL, R.L.; CAMARGO, L.E.A. **Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci .** Genetics and Molecular Biology, v. 23, n. 2, p. 395-398, 2000.

OSTRANDER, E. A.; JONG, P. M.; RINE, J.; DUYK, G. **Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA v. 89, p. 3419-3423, 1992.

PAETKAU, D. Microsatellites obtained using strand extension: an enrichment protocol. **Biotechniques**, v. 26, p. 690-697, 1999.

PAL, N; SANDHU, J.S; DOMIER, L.L; KOLB, F.L. **Development and Characterization of Microsatellite and RFLP-Derived PCR Markers in Oat.** Cell Biology & Molecular Genetics, v.42, p.912-918, 2002.

RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. **Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting.** Electrophoresis, v. 12, p. 113-118, 1991.

RENSINK, W.A.; BUELL, R. **Arabidopsis to Rice. Applying Knowledge from a Weed to Enhance Our Understanding of a Crop Species.** Plant Physiology, v. 135, p. 622-629, 2004.

RICHARDS, R.I.; SUTHERLAND, G.R. **Dynamic mutations: A new class of mutations causing human disease.** Human Molecular Genetics, 70: p. 709-712, 1992.

ROHLF, J. **NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** Version. 2.1. New York: Exeter, 2001.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** Methods Mol Biol, 132: p. 365-86, 2000.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. **Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A, v.89, n.2, p.1477-1481, 1984.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. **Slippage synthesis of simple sequence DNA**. Nucleic Acids Research, v. 20, p. 2211-215, 1992.

STEIN, L. **Genome annotation: from sequence to biology**. Nature Reviews/ Genetics, v. 2, p. 493-503, 2001.

TAUTZ, D. **Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers**. Nucleic Acids Research. v.17, n.16, p.6463–6471, 1989.

TAUTZ, D.; SCHLÖTTERER C. **Simple sequences**. Curr. Opin. Genet. Dev. v. 4, p. 832–837, 1994.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER. G. A. **Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation**. Nature v. 322, p. 652-656, 1986.

The Gene Ontology. Disponível em : <http://www.geneontology.org/> Acesso em 2009.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. **Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and Analysis**. Genome Research, v.10 n.7, p.967-981, 2000.

TINKER, N. A.; KILIAN, A.; WIGHT, C. P.; USZYNSKA, K. H.; WENZL, P.; RINES, H. W.; BJØRNSTAD, A.; HOWARTH, C. J.; JANNINK, J. L.; ANDERSON, J. M.; ROSSNAGEL, B. G.; STUTHMAN, D. D.; SORRELLS, M. E.; JACKSON, E. W.; TUVESSON, S.; KOLB, F. L.; OLSSON, O.; FEDERIZZI, L. C.; CARSON, M. L.; OHM, H. W.; MOLNAR, S. J.; SCOLES, G. J.; ECKSTEIN, P. E.; BONMAN, J. M.; CEPLITIS, A.; LANGDON, T. **New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplasm characterization**. BMC Genomics, p. 1-22, 2009.

USDIN, K. **NGG-triplet repeats form similar intrastrand structures: Implications for the triplet expansion diseases**. Nucleic Acids Res, n. 26, p. 4078-4085, 1998.

VARSHNEY, R. K.; THIEL, T.; STEIN, P. L.; GRANER, A. **In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species**. Cellular & Molecular Biology Letters, v 7, p. 537-546, 2002.

- VARSHNEY, R.K; GRANER, A; SORRELLS,M.E. **Genic microsatellite markers in plants: features and applications**. Trends in Biotechnology, v.23 n.1, p. 48-55, 2005.
- WEBER, J. L.; WONG, C. **Mutation of human short tandem repeats**. Human Molecular Genetics,v. 2, n. 8, p. 1123-1128, 1993.
- WEBER, J.L. **Informativeness of human (dC-dA)n. (dGdT)N Polymorphisms**. Genomics, n.07, p. 524-530, 1990.
- WILSON, W.A.; McCOUCH, S.R.; SORRELS, M. **Comparative genetics of wheat, barley, oats, rye and maize**. In: Scoles, G and Rossnagel, B (ed) Proc. of V Int. Oat Conference. Saskatoon, p. 189-196, 1996.
- YOU-CHUN, L.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. **Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review**. Molecular Ecology, n 11, p. 2453-2465, 2002.
- YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V. **Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus and Vigna*)**, Genome, n. 42, p. 27-34, 1999.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. **Strategies for microsatellite isolation: a review**. Molecular Ecology,v. 11, p. 1-16, 2002.
- ZARDOYA, R.; AROUHEIF, E.; MEYER, A. **Evolution and orthology of hedgehog genes**, Elsevier Science, v.12 n.12, p. 496-497, 1996.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. **Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification**. Genomics, San Diego, v.20, p.176-183, 1994.