

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE *ASTYANAX CF. FASCIATUS* - CITÓTIPO (2N=46)

Caio Cesar Brito Silva 1; Fernando Stopato da Fonseca 2; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf 3

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: caiocesar.96@hotmail.com 1

Pesquisador do Instituto de Pesca; e-mail: stopatofonseca@gmail.com 2

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br 3

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: Microsatélites; *Astyanax*; DNA Barcoding; Sequenciamento de próxima geração

INTRODUÇÃO

O gênero *Astyanax* (Baird & Girard, 1854) encontra-se em “*incertae sedis*” na família Characidae (LIMA *et al.*, 2003), devido a sistemática confusa. (MARCENIUK e HILSDORF, 2010). É um dos gêneros de peixes mais ricos em especiosidade e de ampla distribuição geográfica. Neste táxon encontra-se o *Astyanax cf. fasciatus* (Cuvier, 1819), popularmente conhecido como "Lambari-do-rabo-vermelho" ou "Lambari Guaçu", sendo considerado por Marceniuk e Hilsdorf (2010) como uma espécie muito ativa que ocorre por toda América Central e Sul, atingindo aproximadamente 10,0 cm de comprimento total.

Apesar de não existirem programas de melhoramento para os lambaris, muitos produtores vêm utilizando-os na aquicultura devido a características evidenciadas por Almeida (2007), como a fácil reprodução, hábito alimentar onívoro e crescente demanda comercial. Muitos programas de melhoramento genético têm empregado marcadores microsatélites, por serem informativos, possuírem expressão codominante e elevado polimorfismo (MATIOLI, 2001). Estes marcadores são utilizados para o estabelecimento de relações filogenéticas, construção de mapas genéticos e definição de estratégias de melhoramento (FERGUSON *et al.*, 1995). Desta forma este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um painel de loci microsatélites, sendo de extrema importância na caracterização dos recursos genéticos selvagens da espécie para sua utilização em programas de melhoramento genético e conservação.

OBJETIVOS

Geral:

Desenvolvimento de marcadores microsatélites para a espécie *Astyanax cf. fasciatus* - citótipo (2N=46).

Específicos:

Fase 1: Análises *in silico* das sequências geradas por meio sequenciamento de próxima geração;

Fase 2: Desenvolvimento dos *primers*, utilizando o software PRIMER 3 (QDDGalaxy_VM);

Fase 3: Padronização dos *primers*;

Fase 4: Seleção dos loci polimórficos.

METODOLOGIA

Inicialmente foram coletadas no período de 2013 a 2014, 114 peixes lambari-do-rabo vermelho provenientes do estado de São Paulo, sendo (30 indivíduos da Represa de Ponte Nova, 30 da Represa Jundiá, 30 da Represa Cachoeira de Emas e 24 do Rio Preto) e dos 78 indivíduos de Minas Gerais (54 da Represa de Furnas e 24 da Represa Camargo). Com base na morfologia, o *Astyanax* cf. *fasciatus* teve identidade reconhecida, fragmentos da nadadeira caudal foram retirados e conservados em álcool 95%. A extração do ácido desoxirribonucleico genômico (gDNA) ocorreu pela técnica de extração salina modificada (ALJANABI e MARTINEZ, 1997). O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria, sendo sua qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, e armazenado em freezer - 20°C para conservação do mesmo. Confirmou-se a identidade dos indivíduos pelo método DNA Barcoding, combinando-se quatro *primers* da região Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI), dois *Forward* (F1, F2) e dois *Reverse* (R1, R2) com gradiente de temperatura de anelamento e concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂). Os resultados de amplificação foram purificados utilizando-se o protocolo de purificação ExoSAP e enviados para sequenciamento pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) da Universidade de São Paulo (USP). No programa CodonCode Aligner 5.1.5 e MEGA6.0 as sequências foram analisadas e feito o consenso.

Um *pool* de quatro amostras foi submetido ao sequenciamento de próxima geração pela Plataforma Illumina 1.9 (HiSeq 2500) para a construção de uma biblioteca genômica. Após a limpeza e filtragem pelo CLC_{Bio}, foram gerados *primers* das regiões que flanqueiam os *motifs* microssatélites pelo pacote QDD Galaxy VM, sendo reavaliadas quanto a qualidade no OligoAnalyzer 3.1 (IDT DNA). Após gradiente de temperatura de anelamento e concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂) foram escolhidas as melhores condições de amplificação para cada locus.

As PCR foram desempenhadas no termociclador Veriti™ Dx (Applied Biosystems®) para uma reação final de 20 µL, contendo: 20 ng/µL de DNA, 0,5 UI de Taq DNA Polimerase (Sinapse), 10x PCR Buffer Mg²⁺ Free, gradiente de (1,0 a 3,5 mM) de [MgCl₂], 100 mM de dNTP, 10 µM de cada primer (Forward, Reverse) e Forward oligo-M13 de DNA desenvolvido por Schuelke (2000), marcado com o fluoróforo: IRDye 700 (5'- /5IRD700/TGTAAAACGACGGCCAGT -3') e água destilada deionizada. As amplificações dos locus STR procederam sob as seguintes condições: Etapa 1 - 1x (aquecimento inicial (95°C/5 minutos); Etapa 2 - 35x [desnaturação {95°C/40 segundos (s)}; anelamento (variando de acordo com o locus / 60 s); extensão (72 °C / 40 s)] e etapa 3 - 1x extensão final (72 °C / 420 s).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações de gDNA por meio da utilização do método salino modificado, forneceram material suficiente para o desenvolvimento deste trabalho. Na análise do (COI), os primers F2 e R2 obtiveram melhor resultado de amplificação com temperatura de 60° C e MgCl₂ de 2,5 mM, gerando amplicons com média de 620 pb. A partir da análise das sequências no CodonCode Aligner e alinhamento no MEGA6.0 (Takamura *et al.*, 2013), foram observados 12 sítios variáveis, com distância média de divergência evolucionária entre lambari Guaçu e Peva de 0,0156 a 0,0215, e após avaliação no Blast separaram-se com 100% de identidade. Após a análises das amplificações em gel de agarose 2,0 %, pela da técnica de eletroforese, os valores de temperatura e concentração de cloreto de magnésio foram padronizados para os 22 locus microssatélites (17 di- 2 tri- e 3 tetranucleotídeo) e encontram-se categorizados na (Tabela3).

Tabela 3: *Primers* desenvolvidos para *Astyanax cf. fasciatus* - citótipo (2N=46)

| <i>Loci</i> | Seqüência do Primer (5'- 3') | Ta (T°C) | [MgCL ₂] | Mr | NR | T (pb) |
|-------------|--|-------------|----------------------|------|----|--------|
| ASF01 | F: TGAGGTCCTTATTCTGGAGC R: TGTCTTAGTGTGGCCAGTCG | 59°C | 2,0 mM | AC | 7 | 187 |
| ASF02 | F: AGCATCTTCATGAGAAAGACC R: TTGATTGACAGCATTATCCG | 59°C | 2,0 mM | AC | 8 | 232 |
| Asf03 | F: TGCACTCAATGTCTACTCAGC R: CTCACTCTGTCCTCTGATGG | 59°C | 2,0 mM | CT | 8 | 276 |
| Asf04 | F: ACCTAAACTCGTGCTGATGG R: GCCTATCCTGTGCTTTATCG | 56°C | 2,5 mM | GT | 7 | 238 |
| Asf05 | F: CCAGTTGTGACTCATTGAGG R: TTGACCTTGATGAATTCTGG | 60°C | 2,5 mM | TG | 7 | 178 |
| Asf07 | F: TGGTTGATATGGTGTGTGC R: CAGGCTTGTGCTATCAGG | 60°C | 3,0 mM | CA | 7 | 208 |
| Asf08 | F: AGCTTGTAACACCCACACC R: CTGACAGACAATTCTACCCG | 59°C | 3,0 mM | TG | 7 | 300 |
| Asf09 | F: TAGTACCCACCTTACCACG R: CAGCGCTAAATAATTCACCC | 61°C | 2,5 mM | GT | 7 | 181 |
| Asf10 | F: GCTGTGACATCTCAGACAGG R: AGCATAATGTATGTGCTGTGG | 60°C | 2,0 mM | AC | 7 | 135 |
| Asf11 | F: ACGTACTGTGGGACTTCAGC R: TAGAAGCTCAGAACAGCACC | 60°C | 1,5 mM | GA | 7 | 257 |
| Asf12 | F: AATCATTTCTCACTGCATCG R: TGCCACTGCATTATGTACG | 61°C | 2,5 mM | AC | 7 | 141 |
| Asf15 | F: CAGTCAATGCTCAACAGACC R: TCCACACTAGATGTGTTCTCC | 57°C | 2,0 mM | TAC | 8 | 222 |
| Asf16 | F: AAGTGACGGATATGTTTCCC R: CACTTGTTCOAAGACTTCCC | 59°C | 2,0 mM | TCT | 8 | 226 |
| Asf17 | F: TCCCTAAAGCAGAGGAAGC R: AAGTAAATTTCTGAACCCGC | 61°C | 2,5 mM | AGA | 7 | 265 |
| Asf19 | F: CAACTTTCTCAACCTCTCGC R: CGATTTAAGCTCTTGTGGC | 60°C | 3,5 mM | TCTA | 13 | 210 |
| Asf20 | F: AGCTTTGTCATGATTAGCCC R: ATGGGATCAAACAGTACAGG | 60°C | 2,5 mM | GTCT | 8 | 224 |
| Asf21 | F: AGCCTTTAATCAACCTCCG R: TCAGAAACGACACCAGACC | 58°C | 2,0 mM | AC | 7 | 168 |
| Asf22 | F: TGAAACTGGTGAGTAAATCAGG R: GCCTTCACTGAATCTCTTCC | 60°C | 2,0 mM | AC | 7 | 202 |
| Asf23 | F: GAAACTGGCTCTCATCAGC R: GGTCAGGACCTTCTATCAACC | 61°C | 2,0 mM | AC | 7 | 150 |
| Asf24 | F: TGTCATAGCAATTACAGCAGC R: GCATTACTTTCCTTCCCACC | 60°C | 2,0 mM | AC | 7 | 145 |
| Asf25 | F: AACTTAAACCTGAACTGCCG R: GCCAGCAGGTCTACATAAGC | 60°C | 2,0 mM | AC | 7 | 166 |
| Asf26 | F: AACATATTCCGAATGGTTGC R: ATTCCATCCCCTCACTAGC | 61°C | 2,0 mM | AC | 7 | 235 |

(Ta) Temperatura de anelamento; [MgCL₂] Concentração de cloreto de magnésio; (Mr) Motivo de repetição; (NR) Número de repetições; (T) Tamanho do produto de PCR; (-) *Locus* sem amplificação.

CONCLUSÃO

A metodologia de sequenciamento de próxima geração possibilitou a formação de uma biblioteca genômica de alta qualidade, permitindo o desenvolvimento de 22 pares de *primers* microssatélites. Esses resultados permitirão o desenvolvimento da próxima etapa do trabalho, onde os 22 *locus* serão testados em quatro populações de *Astyanax cf. fasciatus* coletadas para avaliação dos índices de variabilidade genética, tais como heterozigidade observada e esperada, bem como a frequência alélica. Os resultados a

serem publicados serão fundamentais para os estudos genéticos populacionais desta espécie, em trabalhos de conservação ou melhoramento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJANABI, S. M; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

ALMEIDA, R. B. C. *Astyanax altiparanae* (Pices, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação. 2007. 119 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2007.

MARCENIUK, A. P; HILSDORF, A. W. S. Characiformes. In: **Peixes: Das Cabeceiras do Rio Tietê e Parque das Neblinas**. São Paulo: Canal 6, 2010. p. 35-74.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAMA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. 2003 Genera incertae sedis in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. (Ed.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. 1 ed. Porto Alegre: ED-IPUCRS. 2003. p.106-169.

FERGUSON, A.; TAGGART, J. B.; PRODHOL, A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to Salmo. **J. Fish Biol.** v.47, suppl. A, p.103-126, 1995.

MATIOLI, S. R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: Matioli SR. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001, p. 202.

TAKAMURA, K.; STECHER G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. (2013) MEGA 6.0. **Molecular Biology and Evolution**: 30. 2725-2729

AGRADECIMENTOS

OS AUTORES AGRADECEM A UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES (UMC) PELO APOIO INSTITUCIONAL E AO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPQ) PELA BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA CONCEDIDA, A FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) E FUNDAÇÃO DE AMPARO AO ENSINO E PESQUISA (FAEP) PELO AUXÍLIO FINANCEIRO AO PROJETO.