

VALIDAÇÃO DE INICIADORES MICROSSATÉLITE ESPÉCIE ESPECÍFICO DE *JOHNGARTHIA LAGOSTOMA* (H. MILNE-EDWARDS, 1837) (BRACHYURA, GECARCINIDAE)

Laís Ramires Camargo¹, Fabíola Cristina Ribeiro de Faria².

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: laiskamargo@hotmail.com¹

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabiola@umc.br²

Área do Conhecimento: Ecologia Populacional

Palavras-chave: *Johngarthia lagostoma*, conectividade genética, microssatélites, estruturação genética.

INTRODUÇÃO

O caranguejo terrestre *Johngarthia lagostoma* tem distribuição restrita a Ilha de Ascensão e a três pequenas ilhas brasileiras. Espécies com distribuição geográfica restrita à ilhas oceânicas despertam muito a curiosidade dos sistematas, pois podem ser utilizadas como modelos para explicar padrões de especiação e biogeografia (EIZIRIK, 1996). Um dos principais objetivos da genética da conservação é avaliar os níveis de diversidade genética existente em uma dada espécie ou população, assim também, avaliar a distribuição e amplitude geográfica desta atividade. Esses objetivos se fazem importantes para identificar e priorizar áreas nas quais programas de manejo e conservação devem ser implantados (MORITZ & FAITH, 1998). A utilização de marcadores moleculares permite conhecer como a variabilidade genética é partilhada entre as populações, nos fornecendo dados para avaliar a distância genética e caracterizar linhagens (FREELAND, 2005). Entre os mais variados marcadores moleculares utilizados atualmente em estudos de estruturação genética em populações podemos destacar os microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas (SSRs- *Simple Sequence Repeats*) ou repetições pequenas de *tandem* (STRs- *Short Tandem Repeats*) (HAAG, 2009). O desenvolvimento de *primers* é um passo muito importante e requer cuidados para se obter uma reação bem sucedida e que se torna um procedimento um pouco mais simples quando a sequência do DNA alvo a ser amplificada já é conhecida (GARCÊS & LIMA, 2004). Os iniciadores microssatélites, são uma das melhores opções para investigar polimorfismos de populações e estudos de diversidade e mapeamento genético, orientando pesquisas em futuros cruzamentos, estudos genéticos e seleção por marcadores, tendo em vista o fato de que projetos e avanços no sequenciamento genético tem trazido credibilidade no desenvolvimento desses marcadores com baixo custo e maior rapidez (MACHADO & SILVA, 2013).

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo, desenvolver e validar iniciadores microssatélites específicos de *Johngarthia lagostoma*, a partir de sequenciamento de nova geração, que serão utilizados em futuros estudos de estruturação populacional visando responder questões ligadas a padrões biogeográficos.

METODOLOGIA

As amostras utilizadas no presente trabalho são provenientes da coleção de tecido do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Para a verificação da concentração e qualidade do DNA genômico extraído foram utilizadas duas metodologias, NANO-VUE e Eletroforese em gel de agarose com uso de marcador de peso molecular. Um pool de amostras contendo 100 µg de DNA foram enviadas para o Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ – USP) para a criação de uma biblioteca genômica utilizando o programa Sanger e a plataforma

de Nova Geração Illumina 1.9. As sequências obtidas foram triadas com o intuito de descartar sequências inadequadas e buscar *loci* microssatélites adequados para a construção de iniciadores, a partir de parâmetros pré estabelecidos. Nesta etapa foram utilizados programas computacionais específicos, QDD Galaxy e PRINSEQ. A partir dos *loci* selecionados iniciadores foram construídos utilizando-se o software Primer3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000). A validação dos iniciadores será realizada por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando-se kits comerciais, sendo testados diferentes concentrações de MgCL₂ e diferentes temperaturas de anelamento. Os produtos de PCR serão submetidos à eletroforese submersa em gel de agarose 2% corada com SYBR® Safe DNA Gel Stain Invitrogen™ e em seguida visualizados, para a verificação da qualidade das bandas, no fotodocumentador ImageQuant™ 300 Imager (GE HealthcareLife). Serão considerados como válidos aqueles iniciadores que apresentarem os resultados esperados quanto ao tamanho do fragmento amplificado (em número de pb) e repetitividade nos indivíduos analisados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de gDNA nas amostras variou de 78,5 ng/ul a 97,5 ng/ul e a pureza (A260/A280) variou de 1,83 a 2,042. Não sendo observado arrastes no gel de agarose. Tais parâmetros indicam boa qualidade do gDNA extraído. A razão A260/280 é usada como um indicador de pureza das amostras onde os valores entre 1,8-2,0 são indicativos de DNA de boa qualidade. O gel de eletroforese também é uma ferramenta efetiva para revelar a condição das amostras, incluindo a presença ou ausência de DNA e impurezas, como detergentes ou proteínas. Foram obtidas 57.520.014 sequências de 100 pb e analisadas quanto a sua qualidade no programa PrinSEQ. Para a análise de microssatélites são estabelecidas sequências de 300 pb, desta forma utilizou-se o programa CLCBio para realizar a limpeza e ao mesmo tempo o alinhamento de pelo menos 7 sequências e extensão das mesmas. A partir deste programa de bioinformática, foram gerados 561.008 contigues sendo estes analisados no programa QDDGalaxy, com a quantidade média de GC em 37%. Foram obtidos 37 *loci* microssatélites, destes foram selecionados 17 (Tabela 2) para a construção dos iniciadores levando em consideração os parâmetros pré estabelecidos (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros selecionados para desenvolvimento dos *iniciadores*.

Parâmetro	Valor
Tamanho Mínimo do Produto de PCR	120pb
Tamanho Máximo do Produto de PCR	300pb
Tamanho Ótimo do Produto de PCR	20pb
Tamanho Mínimo dos <i>Primers</i>	18pb
Tamanho Máximo dos <i>Primers</i>	25pb
Temperatura Ótima de Melting	60°C
Temperatura Mínima de Melting	57°C
Temperatura Máxima de Melting	63°C
Máxima Diferença entre o tamanho dos <i>Primers</i>	5pb

Tabela 2. *Primers* selecionados para validação.

Identificação	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
PoolNew 4	TCTGAGTGGTCTCCCAAACG	GCGGTTGTTCTTGTGTGTCG
PoolNew 5	GACCCTGTACCTGTTTCAGACG	CTACGCCACTAACGGATTGG
PoolNew 8	AATGAAGATCGCGAGAAACG	GATGCACTGCAGTAGTCTGAGG
PoolNew 9	GTGTGGCAATCTTAGCTTTGG	GGACACCATTACACTATGCTGC

PoolNew 10	CATGCCAGATGCGTCTCC	CCTGTACCAAACCAGAACCC
PoolNew 11	TATATTGCTGCCACCATTGC	CTCTGGAGTATAGGCGGTGG
PoolNew 16	AGTGACTCAAACACGGAAGG	AGTCGTCCTAGCAAAGCGG
PoolNew 18	ACGAGATAGTACGGGCTGGC	CGTCAGTCACGACCACTACC
PoolNew 25	TTGGGTTTCCAGAAACATATCC	TCACATCATGGGAGTTCAGC
PoolNew 27	GGATTTGAGTTTGTCCCGC	TGGGATACAAGTCAGTCCTGC
PoolNew 28	GTCAAGTGACGAGCTCCTGG	AATTCACGTTGTGTTCCTCCG
PoolNew 30	GCAACGGTGACTACTCGTCC	GCGTACTGTAGCCCTCAACG
PoolNew 31	GTGCTCTGAGACGGAAACG	TCGGTGGTTCAGAAAGTTC
PoolNew 32	TCTGGAAGTTGTCACGATGC	TCCGTACAGATACTCGCTCC
PoolNew 33	CGTATTCCTGAAAGTCTGGC	TGGGACAAGTCTTCAGGAGC
PoolNew 35	ACTGATGGCCAACACGTAGC	CCCGGAGGACCAATAACC
PoolNew 36	TTACGAAGGATGCACACGC	CCTTGGTCTTCTCCTCTCC

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o DNA obtido é boa qualidade garantindo a confiabilidade dos iniciadores construídos. As bases estão bem definidas facilitando, assim, a leitura das sequências e que garante resultados mais confiáveis. De acordo com Garcês & Lima (2004) o desenvolvimento dos *iniciadores* para PCR é uma etapa crucial para a realização de uma reação com sucesso e se faz necessário respeitar algumas regras e utilizar programas específicos para o desenho dos mesmos e o uso de programas de bioinformática se faz imprescindível neste processo. Os autores ainda afirmam como resultado de sua pesquisa, que todavia, devemos considerar que nem todos os *primers* desenhados serão validados positivamente, observando-se ocasiões, onde, somente um ou outro primer reconhecido durante a validação *in silico* se apresentaram eficazes e ainda conclui que os resultados obtidos utilizando estas estratégias podem sim orientar o pesquisador na seleção de *primers* com potencial para validação positiva.. Esta etapa está sendo realizada por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) onde estão sendo testadas diferentes concentrações de MgCl₂, Taq polimerase e gradientes de temperatura de anelamento. Os produtos de PCR são submetidos à eletroforese submersa em gel de agarose 2% corada com SYBR® Safe DNA Gel Stain Invitrogen™ e em seguida visualizados, para a verificação da qualidade das bandas, no fotodocumentador ImageQuant™ 300 Imager (GE HealthcareLife). Serão considerados como válidos aqueles iniciadores que apresentarem os resultados esperados quanto ao tamanho do fragmento amplificado (em número de pb) e repetitividade nos indivíduos analisados.

CONCLUSÕES: Foi possível isolar gDNA de qualidade o que garantiu a obtenção de de sequências com potencial para o desenvolvimento de iniciadores microssatélites. A partir destas sequencias foi possível construir 17 iniciadores que passarão por testes para validação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. **Revista Brasileira de Genética** (Suplemento), v. 19 (1), p. 23-29, 1996.

FREELAND, J. W.; e CHICHESTER, Ltd. S.; **Molecular ecology**, v. 23 (4), UK, fev. 2005.

GARCÊS, S. P. S. & LIMA A. O. S.; **Desenho e Validação *in silico* de Primers**, II Workshop de Tecn. da Inf. aplicada ao Meio Ambiente – CBCComp., 2004.

HAAG, T. **Genética da Conservação e Ecologia Molecular de Onças-Pintadas (*Panthera onca*, *Felidae*)** 2009, p. 1-34. Tese (Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular), UFRGS Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MACHADO, E. L. & SILVA, S. A.; **Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira**, *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.48 (11), p. 1457-1463, 2013.

MORITZ, C. & FAITH D., Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 419-429, 1998.