

DESENVOLVIMENTO DE UM PAINEL DE *LOCI* MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE *Astyanax cf. fasciatus* - CITÓTIPO (2n=46)

Caio Cesar Brito Silva¹; Fernando Stopato da Fonseca²; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: caiocesar.96@hotmail.com¹

Pesquisador do Instituto de Pesca; e-mail: stopatofonseca@gmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br³

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: Microssatélites; *Astyanax cf. fasciatus*; Lambari; Conservação

INTRODUÇÃO

O peixe lambari do rabo vermelho *Astyanax cf. fasciatus*, é uma espécie muito ativa e de ampla distribuição, ocorrendo em toda América Central e Sul. De pequeno porte com aproximadamente 10,0 cm de comprimento total, habita rios de pouca correnteza e áreas com água parada (MARCENIUK & HILSDORF, 2010). Os lambaris devido a sua fácil reprodução, aceitabilidade de ração e aumento da demanda comercial como evidenciado por Almeida (2007), tem se tornado espécies candidatas na aquicultura nacional, contudo para que haja melhor aproveitamento deste recurso e conhecimento de sua biologia e preservação, ferramentas moleculares como os marcadores microssatélites podem ser muito viáveis neste sentido. Segundo (MATIOLI, 2001), os microssatélites têm sido empregados em programas de melhoramento genético por serem informativos, possuírem expressão codominante e elevado polimorfismo. 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* microssatélites e analisar a diversidade genética de populações desta espécie, haja visto que este tipo de dado, possa contribuir para o entendimento do dinamismo de sua estrutura populacional e seja essencial para programas de melhoramento e conservação.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um painel de *loci* microssatélites para o lambari do rabo vermelho *Astyanax cf. fasciatus* citótipo (2n=46), analisar a diversidade e estrutura genética de populações selvagens da espécie.

METODOLOGIA

As amostras de DNA foram extraídas pelo método salina modificada (ALJANABI & MARTINEZ, 1997), sendo oriundas de fragmentos de nadadeira caudal do peixe que estão depositadas e conservadas no banco de tecidos do Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura - (LAGOAA). Neste estudo foram utilizados um total de 90 indivíduos de 3 localidades: Represa Ponte Nova de Salesópolis - SP (N=30); Cachoeira de Emas em Pirassununga - SP (N=30); Represa de Furnas em Alfenas - MG (N=30). Os 22 *primers* (17-dinucleotídeo, 2-tri e 3-tetra), foram submetidos em reação de cadeia da polimerase (PCR) com as amostras de DNA diluídas para a concentração de uso (20 a 50 ng/μl). As reações ocorreram para um volume final de 20 μL, contendo: 20 ng/μL de DNA, 0,5 UI de Taq DNA Polimerase (Sinapse), 10x

PCR Buffer Mg²⁺ Free, MgCl₂ de (1,0 a 3,5 mM), 100 mM de dNTP, 10 µM de cada *primer* (Forward, Reverse) e Forward oligo-M13 de DNA, e água destilada deionizada. As ampliações dos *loci* STR foram realizadas no termociclador Veriti™ Dx (Applied Biosystems®) sob as seguintes condições: Etapa E1 - 1x (aquecimento inicial (95°C/10 minutos); E2 - 35 x desnaturação (95°C/40 segundos s); E3 - anelamento (variando de acordo com o locus/60 s); E4 - extensão (72 °C/40 s) e E5 - 1x extensão final (72 °C/420 s). Tendo-se a amplificação verificada via eletroforese em corridas de gel de agarose 1,5 %, confirmados e analisados em gel de poliacrilamida 6,5% no genotipador 4300 DNA Analyzer (Li-cor). O tamanho (pb) dos alelos foram determinados no *software* SAGA^{GT} referenciado com marcador de peso molecular de 50-350pb (Uniscienze®). O número de alelos por *locus*, heterozigosidade observada e esperada, e as estimativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram avaliados utilizando o *software* HW-Quickcheck. Na determinação do conteúdo de informação polimórfica (PIC) realizou-se a avaliação pelo Cervus v. 3.0. Para verificar a presença de alelos nulos, *dropout* e erros de genotipagem utilizou-se a avaliação *in silico* pelo Micro-Checker. O desequilíbrio de ligação foi avaliado pelo programa GENEPOP v. 4.0. A estimativa de diferenciação populacional D_{EST} utilizou-se o Fstat. A estruturação populacional foi realizada no programa STRUCTURE (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 22 *loci*, 18 foram caracterizados como polimórficos sendo: (Asf01, Asf02, Asf03, Asf04, Asf05, Asf07, Asf08, Asf09, Asf10, Asf12, Asf15, Asf16, Asf17, Asf19, Asf22, Asf23, Asf24 e Asf26) (Tabela-1), fora considerado em média 65 amostras para cada *locus* do conjunto das populações (Salesópolis, Pirassununga e Alfenas) , o número de alelos por *locus* variou de 2 a 23 com número médio de alelos de 7,4 e com o *locus* de dominância de repetições do tipo AC. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) médio foi de 0,6667, todas os *locus* estavam em (EHW) equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que o p-valor foi não significativo ($p > 0,05$) indicando que a média da frequência alélica nas populações estudadas não difere da média em uma população fictícia que está EHW, atendendo as premissas como ausência de seleção e reprodução panmítica, também não apresentando erros de genotipagem, alelos nulos ou *dropout* pela avaliação *in silico*. A (H_o) heterozigosidade observada e (H_e) heterozigosidade esperada, variou entre 0,03 (Asf12) e 0,93 (Asf16) a 0,03 (Asf12) e 0,89 (Asf03), respectivamente, os parâmetros indicados variaram de moderado a alto nível de diversidade genética. O índice de médio $D_{EST} = 0,1867$ ($p < 0,05$) demonstrou alta diferenciação genética (Tabela 2). Na análise de estruturação, pode-se constatar a estruturação de duas populações, sendo que as populações de Pirassununga e Alfenas podem ser consideradas muito próximas geneticamente e a de Salesópolis como uma só, esses dados foram obtidos com $K=2$.

Tabela 1: T_a , temperatura de anelamento; M_r , motivo de repetição; S_r , tamanho dos alelos; N , número de indivíduos; A , número de alelos; H_o , heterozigosidade observada; H_e heterozigosidade esperada; PIC, conteúdo de informação polimórfica; EHW, equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$).

Locus	Primer sequência (5'-3')	T_a	M_r	S_r	N	A	H_o	H_e	PIC	EHW
Asf01	F: TGAGGTCCTTATTCTGGAGC R: TGTCTTAGTGTGCCAGTCG	59	AC	199-215	78	6	0,86	0,72	0,749	0,06
Asf02	F: AGCATCTTCATGAGAAAGACC R: TTGATTGACAGCATTATCCG	59	AC	247-313	53	17	0,89	0,88	0,924	0,59
Asf03	F: TGCACCTCAATGTCTACTCAGC R: CTCACCTGTCTCTGATGG	59	CT	291-355	73	23	0,83	0,89	0,9	0,17
Asf04	F: ACCTAAACTCGTGCTGATGG R: GCCTATCCTGTCGTTTATCG	59	GT	257-271	83	6	0,72	0,63	0,694	0,14
Asf05	F: CCAGTTGTGACTCATTACAGG R: TTGACCTTGATGAATTCTGG	60	TG	194-198	49	3	0,36	0,47	0,589	0,11
Asf07	F: TGGTTGATATGGTGTGTGTC R: CAGGCTTGTGCTATCAGG	60	CA	221-227	56	4	0,58	0,68	0,588	0,16
Asf08	F: AGCTTGTAACACCCACACC R: CTGACAGACAATTCTACCCG	59	TG	292-318	75	5	0,41	0,39	0,31	0,49
Asf09	F: TAGTACCCACCTTCACCACG R: CAGCGCTAAATAATTCACCC	61	GT	196-204	65	4	0,83	0,71	0,573	0,1
Asf10	F: GCTGTGACATCTCAGACAGG R: AGCATAATGTATGTGCTGTGG	60	AC	148-158	59	6	0,69	0,71	0,631	0,47
Asf12	F: AATCATTCTCACTGCATCG R: TGCCACTGCATTATGTACG	61	AC	151-159	73	2	0,03	0,03	0,065	0,5
Asf15	F: CAGTCAATGCTCAACAGACC R: TCCACACTAGATGTGTTCTCC	57	TAC	219-237	42	7	0,65	0,57	0,716	0,16
Asf16	F: AAGTGAGGATATGTTTCCC R: CACTGTGTTCCAAGACTTCCC	59	TCT	246-306	77	14	0,93	0,88	0,887	0,25
Asf17	F: TCCCTAAAGCAGAGGAAGC R: AAGTAAATTTCTGAACCCGC	61	AGA	278-293	67	6	0,59	0,7	0,736	0,1
Asf19	F: CAACTTTCTCAACCTCTCGC R: CGATTTAAGCTCTTGTGGC	60	TCTA	206-262	48	9	0,88	0,77	0,856	0,12
Asf22	F: TGAAACTGGTGAGTAAATCAGG R: GCCTTCACTGAATCTCTTCC	60	AC	215-221	71	4	0,6	0,76	0,699	0,14
Asf23	F: GAAACTGGCTCTCATCACG R: GGTCAGGACCTTCTATCAACC	61	AC	175-179	75	3	0,59	0,62	0,476	0,4
Asf24	F: TGTCATAGCAATTACAGCAGC R: GCATTACTTTCTTCCCACC	60	AC	169-185	77	7	0,86	0,79	0,858	0,24
Asf26	F: AACATATTCCGAATGGTTGC R: ATTCCATCCCCTCACTAGC	61	AC	221-259	57	8	0,79	0,76	0,751	0,47

Tabela 2: Análise par a par do índice D_{EST} (abaixo da diagonal), valores significativos ($p < 0,05$) após ajuste de Bonferroni (acima da diagonal).

Localidade	Salesópolis	Pirassununga	Alfenas
Salesópolis	-	0,03	0,03
Pirassununga	0,2358	-	0,03
Alfenas	0,2138	0,1104	-

Figura 1. Análise estrutural pelo programa STRUCTURE (2000), mostrando a existência de duas populações bem definidas, separando a população 1 (Salesópolis) de 2 (Pirassununga) e 3 (Alfenas).



CONCLUSÕES

Todos os 18 *loci* microssatélites caracterizados neste painel, foram altamente polimórficos, com alto valor de PIC, grande variação no número de alelos por *locus*, e moderado a alto nível de diversidade genética. O índice geral de D_{EST} demonstrou alta diferenciação genética entre as populações analisadas, tendo uma menor diferenciação entre populações de Alfenas e Pirassununga o que corrobora com os resultados de estruturação, que mostra as duas juntas, separando-se da população de Salesópolis. Os *loci* mostraram-se eficientes na caracterização de recursos genéticos de populações, mostrando-se viáveis para estudos de conservação, programas de reprodução e melhoramento de espécies.

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.

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.

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.

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

AGRADECIMENTOS

OS AUTORES AGRADECEM A UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES (UMC) PELO APOIO INSTITUCIONAL E PELA BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA CONCEDIDA, AO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPQ), 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.