

Biblioteca genômica de *Loci* potencialmente amplificáveis em Viola - *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1840).

VERÔNICA HAMMES GARCIA¹; RAFAEL ALDRIGH TAVARES²; SUZANE FONSECA FREITAS³; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA⁴; SÉRGIO RENATO NOGUEZ PIEDRAS⁵

¹ Departamento de Zootecnia UFPEL – Pós Graduação – verônica.hgarcia@gmail.com

² Departamento de Zootecnia e Ciências Biológicas UFSM

³ Graduação em Zootecnia - UFPEL

⁴ Instituto de Biologia UFPEL

⁵ Departamento de Zootecnia UFPEL - sergiopiedras@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os constantes avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA, com a redução dos custos, tem aumentado os estudos sobre ecologia, evolução, melhoramento genético e genética de populações. Os marcadores microssatélites (SSP – Simple Sequence Repeats) se mostram ferramentas importantes para estes estudos (CASTOE et al. 2012; MELO et al. 2008; TAVARES, 2011), e segundo Castoe et al. (2012) a partir desta nova geração de seqüenciamento é possível se obter os microssatélites por menores custos, com mais eficiência e em maior escala. Ultrapassando antigas técnicas que demandavam grande esforço, como a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas e radioativas. Esse avanço na tecnologia tem permitido desenvolver marcadores moleculares para espécies que ainda não possuem informações genéticas e que mesmo não sendo modelos, possuem forte potencial para se tornarem economicamente importantes. A partir do sequenciamento do DNA destas espécies, são gerados os *Loci* potencialmente amplificáveis (PALs) (LANCE et al., 2013), que são uma ferramenta poderosa para o estudo genético (CALABUIG et al., 2012).

Loricariichthys anus, chamada popularmente por Viola, é um peixe pertencente à ordem Siluriforme, família Loricariidae e não apresentava interesse comercial e ecológico até meados da década de 1980. A partir de 1990 começou a ser comercializada e atingiu no ano de 2011, 52% das espécies capturadas na Lagoa Mangueira (SANTOS, 2012). A Viola ocorre na América do Sul, rios costeiros do Uruguai e no sul do Brasil, bacia inferior do Paraná (FISH BASE). De Britto (2012) descreveu que o filé da Viola possui um pequeno teor de gordura e um alto teor de proteína, o que influencia a desempenho produtivo e a aceitação pelo mercado consumidor, modifica o sabor da carne e demonstra um alto valor nutritivo.

Pouco se conhece sobre a biologia deste peixe, porém o interesse pelo cultivo de espécies nativas vem crescendo, e isso, aliado ao seu forte potencial econômico faz dela um importante recurso pesqueiro. Sendo assim se faz necessário conhecer suas características genéticas e populacionais tanto para o desenvolvimento aquícola, quanto para monitoramento populacional e conservação da espécie.

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver *Loci* potencialmente amplificáveis de marcadores microssatélites para a espécie *Loricariichthys anus*, levando a conhecer sua genética.

2. METODOLOGIA

O material biológico foi coletado na Barragem do Chasqueiro (Arroio Grande-RS) que é reconhecida como área de grande produção pesqueira e desperta interesse de comunidades pesqueiras da região. O DNA genômico total foi extraído a partir de nadadeira caudal de *L. anus* através do protocolo modificado de sal (BARRERO et al., 2008).

A biblioteca genômica foi preparada seguindo o protocolo padrão do Kit Illumina Nextera DNA Library. O sequenciamento desta única biblioteca genômica foi conduzido em um seqüenciador MiniSeq (Illumina, San Diego, USA) com 150 pares de bases. Os resultados obtidos foram analisados no programa PAL_FINDER_V0.02.03 para identificar as leituras que continham microssatélites com dinucleotídeos (2mer), trinucleotídeos (3mer), tetranucleotídeos (4mer), pentanucleotídeos (5mer) e hexanucleotídeos (6mer).

Estas seqüências para serem consideradas SSRs deveriam ter pelo menos 12 pb de comprimento para 2mer, 3mer e 4mer e de 15pb a 18pb para 5mer e 6mers, respectivamente. Uma vez identificadas as leituras com loci SSRs, estas foram agrupadas para um subdiretório local do programa Primer 3 v.2 (LANCE et al., 2013) para o desenho dos primers.

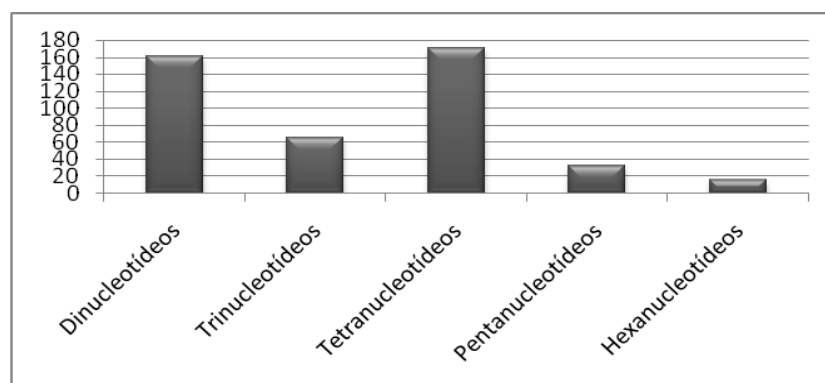
Após obter os PALs, a partir destes foram selecionados os “Best PALs”, os loci SSRs de melhor qualidade, a partir dos seguintes critérios: serem seqüências de repetições simples; e com longas repetições, tendo mais de 7 unidades de repetições, sendo estas mais propensas a ter alta variabilidade na população (CASTOE et al., 2012; LANCE et al., 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sequenciamento da biblioteca genômica foram obtidas 1.103.580 leituras contendo aproximadamente 0,159 Gpb. Desconhece-se o tamanho do genoma de *L. anus*, porém o genoma de peixes teleósteos já estudados pode variar de 0,40 Gpb a 4,40 Gpb (GREGORY et al., 2007), sendo assim se obteve uma pequena cobertura do genoma.

Deste total de leituras, 350.678 continham SSRs, sendo destas somente 444 que apresentam seqüências flanqueantes para o desenho de primers, sendo 36% de 2mers, 15% de 3mers, 38% de 4mers, 7% de 5mers e 4% de 6mers. As repetições mais frequentes foram de dinucleotídeos e tetranucleotídeos (figura 1), o que se demonstra semelhante ao que foi encontrado, por Luo et al. (2012) que obtiveram como mais frequente tetranucleotídeos em *Schizothorax biddulphi* e por Lance et al. (2013) que em *Rhinichthys osculus* e *Prosopium williamsoni* o motivo mais frequente foi dinucleotídeo.

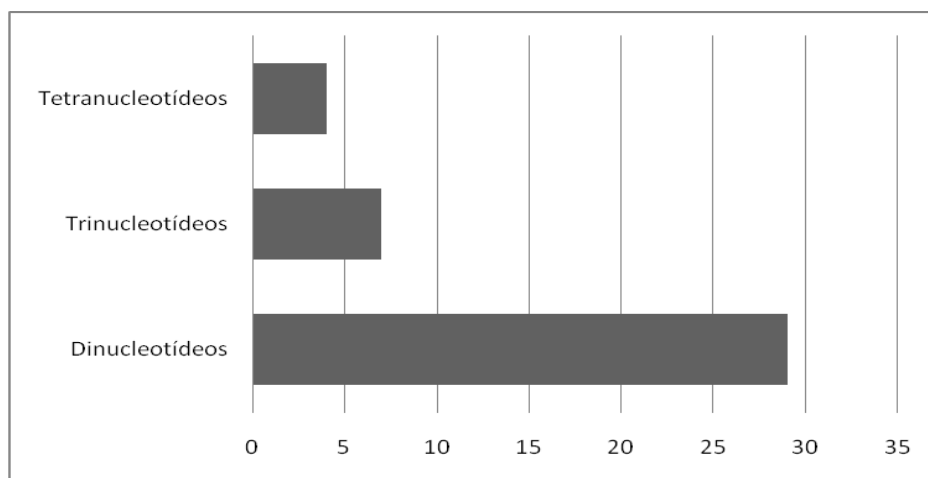
Figura 1. Tamanho das repetições de microssatélites potencialmente amplificáveis.



Nesta biblioteca foram obtidos poucos loci SSRs - 444, em comparação a outras espécies sequenciadas com a mesma plataforma, como o “zebrafish” (*Danio rerio*), espécie modelo que obteve 116.915 SSRs (ROUCHKA, 2010), e com a cobertura do genoma de 1,7 Gpb, bem superior ao utilizado neste estudo que foi de 0,159 Gpb.

O número de bPALs foi de 40 sequências (figura 2), sendo valores bem inferior dos encontrados por Lance et al. (2013) em peixes. Essa dificuldade de obter uma mesma eficiência de PALs como foi verificada em outras espécies não pode ser conclusiva, porém estas diferenças podem ser devido a cobertura do genoma, tamanho de leituras, tamanho total do genoma, mostrando a grande variação que pode ser encontrada dentre as repetições de loci microssatélites, além da grande variação genômica que existe entre as espécies.

Figura 2. Tamanho das repetições dos “Best PALs”



4. CONCLUSÕES

As novas tecnologias de sequenciamento nos permitem identificar um bom número de loci potencialmente amplificáveis, mesmo que com uma pequena cobertura do genoma. Apesar do pequeno número de bPALs obtidos, estes números são suficientes para se ter uma promissora análise genética e populacional de *L. anus*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. et al. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, Santiago, v.35, n.1, p.65-74, 2008.

CALABUIG, C.; RODRIGUES, M.D.N.; MOREIRA, C.G.A. et al. Genome-wide identification and characterization of microsatellite loci in coscoroba swan (*Coscoroba coscoroba*). **Genomics and Quantitative Genetics**, v.5, n.1, p.14-19, 2012.

CASTOE, T.A.; POOLE, A.W.; KONING, A.P.J. et al. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. **PLoS ONE**, Lund, v.7, n.2, p.1-10, 2012.

DE BRITTO, A. C. P. **Rendimento corporal e composição química da viola (*Loricariichthys anus*) em duas faixas de peso capturadas na Lagoa Mangueira, RS, Brasil.** 2012. 42f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FISHBASE. **Global information of system on fishes.** Disponível em:<<http://www.fishbase.org/summary/Loricariichthys-anus.html>> Acesso em: 08 jun. 2013.

GREGORY, T.R.; NICOL, J.A.; TAMM, H.; KULLMAN, B.; KULLMAN, K. et al. Eukaryotic genome size databases. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.35, n.1, p.332–338, 2007.

LANCE, S.L.; LOVE, C.N.; NUNZIATA, S.O. et al. 32 species validation of a new Illumina paired-end approach for the development of microsatellites. **PLoS ONE**, Lund, v.8, 147 n.11, p.1-11, 2013.

LUO, W.; NIE, Z.; ZHAN, F. et al. Rapid Development of Microsatellite Markers for the Endangered Fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) Using Next Generation Sequencing and Cross-Species Amplification. **International Journal of Molecular Science**, n.13, p.14946-14955, 2012.

MELO, D.C. et al. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 220-224, 2008.

ROUCHKA, E.C. Database of exact tandem repeats in the Zebrafish genome. **BMC Genomics**, v.11, n.347, p.1-11, 2010.

SANTOS, J. **Apropriação das áreas de pesca e uso dos recursos pesqueiros da Lagoa Mangueira por pescadores artesanais.** 2012. 64f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

TAVARES, R. A. et al. Utilization of microsatellite markers to form families of *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n.1, p. 1263-1267, 2011.