

## IDENTIFICAÇÃO DE LOCI MICROSSATELITES EM DOURADO (*Salminus brasiliensis*) UTILIZANDO O SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.

HAROLD JULIÁN PEREZ GUTIERREZ<sup>1</sup>; NATALIA OSSA HERNÁNDEZ <sup>1, 2</sup>;  
FRANCINE BASTOS MAAGH<sup>2</sup>; CARLA GIOVANE ÁVILA MOREIRA <sup>2</sup>; HEDEN  
LUIZ MARQUEZ MOREIRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de engenharia Genética Animal, Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do leão s/n°, caixa postal 354, CEP:96010-900, Pelotas RS; – [hajupegu@gmail.com](mailto:hajupegu@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidad de Santa Rosa de Cabal/ Colômbia-[nattio.biologia@gmail.com](mailto:nattio.biologia@gmail.com)

<sup>3</sup> Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, – [heden.lui@gmail.com](mailto:heden.lui@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O Dourado (*Salminus brasiliensis*) pertence ao gênero *Salminus*, família Characidae, Ordem dos Characiformes e classe Actinopterygii (MOREIRA et al.,2002) é um peixe reofílico de grande porte, produz larvas nas estações chuvosas e quentes do ano, época quando os alimentos são encontrados em abundância, permitindo assim um rápido crescimento de sua prole. O interesse pela sua criação tem crescido continuamente, pois é uma espécie de alto valor na ictiofauna brasileira, não só para os pescadores esportivos, como para os pescadores profissionais. Sua pesca possui grande importância devido ao elevado valor que atinge no mercado devido à qualidade da sua carne (FLORA et al.,2010) incrementando o interesse dos produtores pela produção desta espécie. Porém, o Dourado vigora na lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul (MARQUES et al.,2002) devido à intensa degradação do seu habitat pelo excessivo esforço de pesca, construções de barragens e poluição dos rios (FLORA et al.,2010). Isso ressalta a importância de conhecer aspectos relacionados à biologia do dourado para estabelecer alternativas sobre o manejo das populações desta espécie.

Um dos aspectos mais relevantes é manter um controle genético das populações, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) recomenda a caracterização genética das populações cultivadas utilizadas em programas de melhoramento e das populações na vida selvagem, pelo que qualquer câmbio genético pode ser monitorado para a posterior gestão sustentável do cultivo de peixes com os objetivos de conservar a diversidade e minimizar a endogamia (AN et al.,2013).

As estratégias recentes no análises genéticos e metodologias de genotipificação tem dado lugar à expansão do potencial dos marcadores moleculares para resolver questões biológicas, os microssatélites são o tipo de marcador mais utilizado neste tipo de aplicações (SELKOE et al.,2006).

Os microssatélites são repetições em tandem de 1-6 nucleotídeos encontrados com alta frequência nos genomas nucleares dos táxons. Um loci microssatélite normalmente têm de 5 a 40 repetições, mas cadeias com mais repetições são possíveis. As repetições de dinucleotídeos, trinucleotídeos e tetranucleotídeos são as opções mais usadas nos estudos de genética molecular (SELKOE et al.,

2006). Estes microssatélites podem proporcionar informação sobre a diversidade genética das populações cultivadas e selvagens (RODRIGUES et al., 2009). Portanto o objetivo deste trabalho é identificar loci microssatélites no Dourado (*Salminus brasiliensis*) utilizando o sequenciamento de nova geração.

## 2. METODOLOGIA

O material biológico (nadadeira caudal) para realizar a extração de DNA foi obtido de peixes coletados de pisciculturas da região sul do país. A extração foi realizada pelo protocolo de Cloreto de sódio (NaCl), utilizando 20 mg de nadadeira colocados em tampão de lise contendo proteinase K e deixadas até digestão completa. Posteriormente, a fase orgânica foi precipitada utilizando solução salina (NaCl 5M) e centrifugada, sendo o DNA precipitado por centrifugação e etanol. A qualidade do DNA foi avaliada utilizando gel de agarose 1%, corado com Gel Green (Biotium, USA) e visualizado em transluminador de luz branca (Clare chemical, USA).

A biblioteca Illumina paired-end shotgun foi preparada seguindo o protocolo padrão do kit da biblioteca de DNA Illumina Nextera ([www.epicentre.com](http://www.epicentre.com)).

Na consideração de uma leitura como microssatélites foi necessário que as repetições apresentarem pelo menos um tamanho de 12pb para dímeros, trimeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os loci microssatélites que maior número apresentou corresponde aos trimeros (Tabela 1). Os motivos com maior número de repetições foram apresentados pelos Dímeros (Tabela 2). O sequenciamento além de gerar o número de repetições dos microssatélites, gera os possíveis cebadores (primers) para a amplificação destes microssatélites no dourado.

Tamanho do monómero	Total loci	Loci com primer.
Dímero	1715	764
Trímero	3861	2801
Tetrâmero	3233	2207
Pentâmero	485	288
Hexâmero	537	354

**Tabela 1:** Quantidade de loci microssatélites identificados.

Tamanho do monómero	Motivo	Total de Loci	Loci com primer.
Dímero	AC	906	424
	TC	679	260
Trímero	TGC	888	703
	ACC	568	464
Tetrámero	AAAT	649	453
	AATC	260	189
Pentámero	AACAC	68	19
	ATTTT	38	25
Hexámero	AACCCT	32	12
	ATAGAG	18	10

**Tabela 2:** Motivos mais repetidos dos loci microssatélites identificados.

Para continuar com o trabalho de pesquisa serão escolhidos aleatoriamente dos possíveis locis amplificáveis (PALs), os microssatélites que irão ser amplificados em indivíduos selvagens e cultivados de *Salminus maxillosus*.

Os primers identificados serão processados pelo programa Primer3 (CALABUING et al., 2012). Para evitar as ampliações inespecíficas os primers serão escolhidos segundo os critérios utilizados por Castoe *et.al*;2012; Estes critérios são, conteúdo de CG superior ao 30%, temperatura de anelamento em um intervalo de 58 a 66°C com no máximo 2°C de diferença entre primers pareados, presença de C ou G nos últimos nucleotídeos do extremo 3' (CASTOE et al., 2012).

Esta amplificação será realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase PCR. Todos os produtos serão verificados por eletroforeses em gel de Agarose 1% corado com Gel Green (Biotium, USA) e visualizado em transluminador de luz branca (Clare chemical, USA) e fotografado para registro.

#### 4. CONCLUSÕES

A identificação e caracterização de loci microssatélites em Dourado pode aportar informação importante para posteriores estudos sobre biologia das espécies, história natural, relações filogenéticas, genética de populações, ecologia molecular, filogenética entre outros. Além disso, a utilização de informação genética em programas de reprodução pode levar a estabelecer estratégias de manejo das populações cultivadas e selvagens, permitindo ter um equilíbrio com relação à produção e a conservação das espécies.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, S, H.; LEE , W, J.; SEONG, W. H.; HA, N, H.; JUNG , Y, P.; JEONG, I, M.; CHUL, M, A. Genetic differences between wild and hatchery populations of red sea cucumber (*Stichopus japonicus*) inferred from microsatellite markers: implications for production and stocking programs design. *Genes genome*, DOI 10.1007/s13258-013-0139-8, 2013.

CALABUIG, C.; RODRIGUES, M, D, N.; MOREIRA, C, G, A.; ALMEIDA, D,B.; KATZENBERGER, M.; SANTOS JÚNIOR, B.; OLIVEIRA, G, B.; MOREIRA, H, L, M. Genome-wide identification and characterization of microsatellite loci in coscoroba swan (*Coscoroba coscoroba*). *Genomics and Quantitative Genetics*. v. 5, p. 14 – 19, 2012.

CASTOE, T, A.; POOLE, A, W.; DE KONING, A, P, J.; JONES, K, L.; TOMBACK, D, F.; OYLER-MCCANCE, S, J.; FIKE, J,A.; LANCE, S,L.; STREICHER, J, W.; SMITH, E, N.; POLLOK, D, D. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS ONE*. 2012. v.7. n. 2. e30953.

EPICENTRE. Nextera™ DNA Sample Prep Kit (Illumina® -Compatible). 2011. Lit. # 307.p 1-12. Online. Disponível em: [http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/-sample-prep-kit-\(illumina--compatible\).pdf?sfvrsn=4](http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/-sample-prep-kit-(illumina--compatible).pdf?sfvrsn=4).

FLORA, M, A, D.; MASCHKE, F.; FERREIRA, C, C.; PEDRON, F. Biologia e cultivo do dourado (*salminus brasiliensis*). *Acta Veterinaria Brasilica*, v.4, n.1, p.7-14, 2010.

MARQUES, A, A, B. FONTANA, C. S. VELEZ, E. BENCKE, G. A. SCHNEIDER, M. REIS, R.E. Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Decreto no 41.672, 10 de junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA, 2002. 52p. (Publicações Avulsas FZB, 11).

MOREIRA, H, L, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R, P.; ZIMMERMANN, S.; **Fundamentos da moderna Aquicultura**. Canoas: Ed: Ulbra, 2001.

RODRIGUES, F , C.; FARIAS, P, I.; BATISTA, J, S.; GOMES, A, J. Isolation and characterization of microsatellites loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin Conservation Genet Resour, n. 1, p. 365–368, 2009.

SELKOE, K, A.; TOONEN, R, J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. v. 9, p. 15–629, 2006.