

LOCI POTENCIALMENTE AMPLIFICÁVEIS EM PEIXE-REI *ODONTESTHES HUMENSIS*

SUZANE FONSECA FREITAS¹; RAFAEL ALDRIGHI TAVARES², SÉRGIO RENATO NOGUEZ PIEDRAS², JOÃO MORATO FERNANDES² HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA²; NELSON JOSÉ LAURINO DIONELLO³

¹ Universidade Federal de Pelotas / Graduação em Zootecnia – suzane.ff@hotmail.com

² Laboratório de Engenharia Genética Animal (LEGA) - Laboratório de Ictiologia

³ Universidade Federal de Pelotas / Departamento de Zootecnia - dionello@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Originário de águas doces, marinhas, tropicais e temperadas de todo o mundo, os peixes-rei são representantes da ordem atheriniforme. Dentro desta ordem, são classificados como exemplares da subfamília atherinopsinae, onde compõe seis gêneros dispersos em dois grupos antitropicais: Atherinopsini na América do Norte (Atherinops, Atherinopsis, Colpichtys, Leuresthes) e Sorgentinini na América do Sul (Basilichthys, Odontesthes) (DYER, 2006).

O gênero *Odontesthes* detém elevada variedade de espécies, sendo amplamente distribuído em águas costeiras, marinhas e lagoas de água doce da América do Sul.

No Brasil está presente principalmente nas lagoas Mirim e Mangueira, onde foram descritas várias espécies, sendo a *O. humensis* uma das mais comumente encontradas (DYER, 2006), definindo-a como um importante recurso pesqueiro e espécie de grande potencial aquícola.

O conhecimento acerca da variabilidade genética e os padrões de estrutura das populações são prerrogativas para o desenvolvimento de estratégias para aquicultura, por meio da inserção de futuros programas de melhoramento genético, embasados no uso de marcadores moleculares.

Dentre os marcadores disponíveis atualmente, os microssatélites (SSR-Simple Sequence Repeats) são ferramentas satisfatoriamente utilizadas em estudos de estrutura de populações, conservação de espécies e gestão de recursos genéticos.

O desenvolvimento de marcadores microssatélites exigia um dispendioso esforço técnico, com procedimentos demorados e caros. Estes procedimentos incluem técnicas como a criação de bibliotecas enriquecidas para loci SSRs, clonagem, hibridização para detectar clones positivos, isolamento de plasmídeo e sequenciamento (CASTOE et al., 2012). Entretanto avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA vêm proporcionando métodos mais eficientes e de baixo custo para desenvolver marcadores moleculares para espécies que não possuem dados disponíveis, gerando os chamados *loci* potencialmente amplificáveis (PALs) (LANCE et al., 2013), uma poderosa ferramenta para estudos genéticos.

Logo, este estudo objetiva o desenvolvimento de *loci* potencialmente amplificáveis de microssatélites para *O. humensis* visando compreender a genética desta espécie.

2. METODOLOGIA

O material biológico utilizado neste estudo foi oriundo de coletas na lagoa Mangueira, situada no município de Santa Vitória do Palmar-Brasil (S 32°59'12" e O 52°42'42"). O DNA genômico total foi extraído a partir de nadadeira caudal

(200-300 mg) de *O. humensis*, com a utilização da separação orgânica pelo protocolo modificado de NaCl (BARRERO et al., 2008).

Uma única biblioteca genômica foi preparada a partir de 20 ng de DNA seguindo o protocolo padrão do Kit Illumina Nextera DNA Library (Illumina, San Diego, USA). O sequenciamento da biblioteca foi conduzida em um sequenciador GAIIX (Illumina, San Diego, USA) com leituras de 150 pares de bases. Posteriormente, as leituras pós sequenciamento foram avaliadas com o programa PAL_FINDER_v.0.02.03 (CASTOE et al., 2012), identificando microssatélites com dinucleotídeos (2mer), trinucleotídeos (3mer), tetranucleotídeos (4mer), pentanucleotídeos (5mer) e hexanucleotídeos (6mer). Determinou-se repetições simples e de pelo menos 12 pb de comprimento para 2mer, 3mer e 4mers, e pelo menos três repetições para 5mers ou 6mers.

Após a identificação, os loci SSRs foram agrupados para um subdiretório local do programa Primer3 v.2 (LANCE et al., 2013) para o desenho dos primers.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram aferidos 1.265.204 leituras, contendo aproximadamente 0,184 Gpb. O tamanho do genoma de *O. humensis* é desconhecido, embora genomas de peixes que já estão sendo sequenciados apresentam em média 1,250 Gbp (KATAGIRI et al., 2005; JIANG et al., 2013); logo usando este embasamento como parâmetro, a cobertura total foi de aproximadamente 15% do genoma.

Do total de leituras obtidas, 75.347 continham SSRs, no entanto, 34% apresentaram sequências flanqueantes bastantes adequadas para desenho de primers, produzindo 25.806 PALs, sendo 21% de 2mers, 22% de 3mers, 37% de 4mers, 13% de 5mers e 7% de 6mers (Figura. 1).

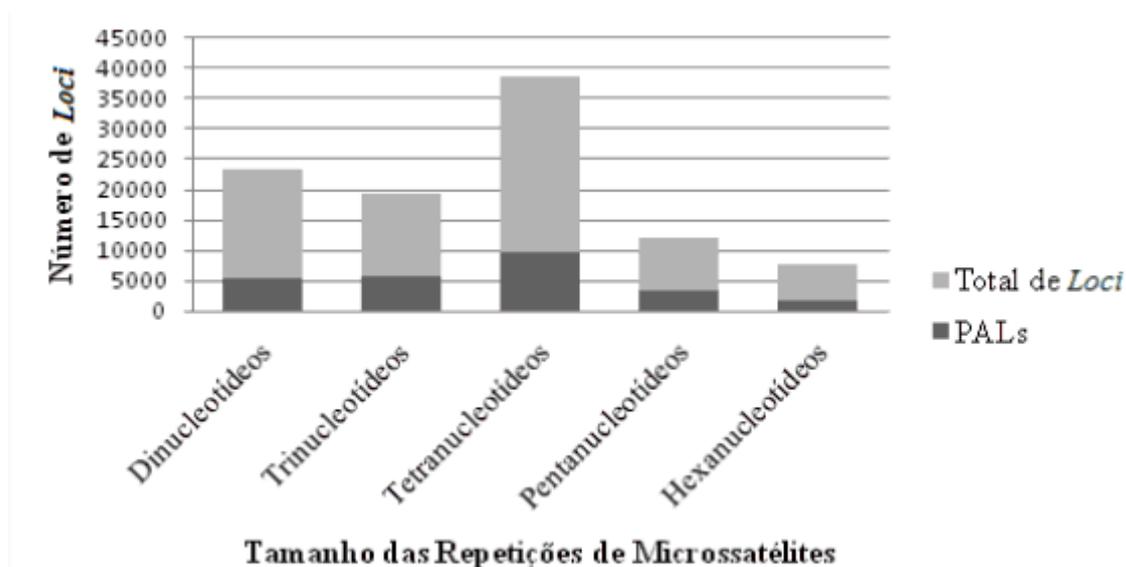


Figura 1: Relação entre o número total de loci e o número de loci potencialmente amplificáveis (PALs), identificados por tamanho das repetições de microssatélites.

Em contraponto à espécie modelo “Zebrafish” (*Danio rerio*) (116.915 SSRs) (ROUCHKA, 2010), o peixe-rei *O. humensis* apresenta números de loci microssatélites inferior, porém para obtenção dos loci SSRs, em zebrafish, foi utilizado o genoma total de aproximadamente 1,7 Gpb e para este estudo um total de 0,185 Gpb.

Em estudo de sequenciamento de Carpa Siamês (*Henichorynchus siamensis*), foram obtidas 65.954 leituras por meio da plataforma 454 GS-FLX (ROCHE, BRANFORD, USA), considerando que 1.837 de sua totalidade eram SSRs (IRANAWATI et al., 2012).

LANCE et al. (2013) sequenciaram 0,5 Gpb do genoma de “Speckled Dace” (*Rhinichthys osculus*) e “Mountain Whitefish” (*Prosopium williamsoni*), apresentando entorno de 30.000 e 26.000 PALs respectivamente.

Essas divergências podem estar atribuídas às diferentes plataformas utilizadas e as peculiaridades que a acompanham, bem como a cobertura do genoma, número de sequências e tamanho de leituras.

A repetição mais frequente encontrada foi tetranucleotídeo (Figura.1), resultado este discrepante aos estudos de LUO et al. (2012) e LANCE et al. (2013), que obtiveram maior número de dinucleotídeo em “Tarim Schizothoracin” (*Schizothorax biddulphi*), “Speckled Dace” e “Mountain Whitefish”.

Em microssatélites tetranucleotídeos, o motivo de SSR mais frequente encontrado foi ATGG, embora segundo MEGLÉCZ et al. (2012), para Chordatas em geral o motivo mais comum encontrado para tetranucleotídeo foi AGAT e em plantas AAAT, resultados distintos em ambos estudos e grupos de espécies o que sugere a vasta variação que pode ser encontrada dentre as repetições de loci microssatélites.

Referente ao total de PALs, foram selecionados os *loci* SSRs de melhor qualidade chamados de “Best PALs”(bPALs), onde os mesmos apresentaram unidades longas de repetições (4mers, 5mers e 6mers) e trechos mais longos de repetições (mais de 7 unidades de repetições observadas), apresentando maior propensão alta variabilidade populacional (CASTOE et., 2012; LANCE et al., 2013).

O número de bPALs foi de 167 (Figura. 2), valores similares ao encontrado por CASTOE et al. (2012) ao estudar aves (100 - 450) e inferiores aos resultados de LANCE et al. (2013) em peixes (4.635 – 6.631).

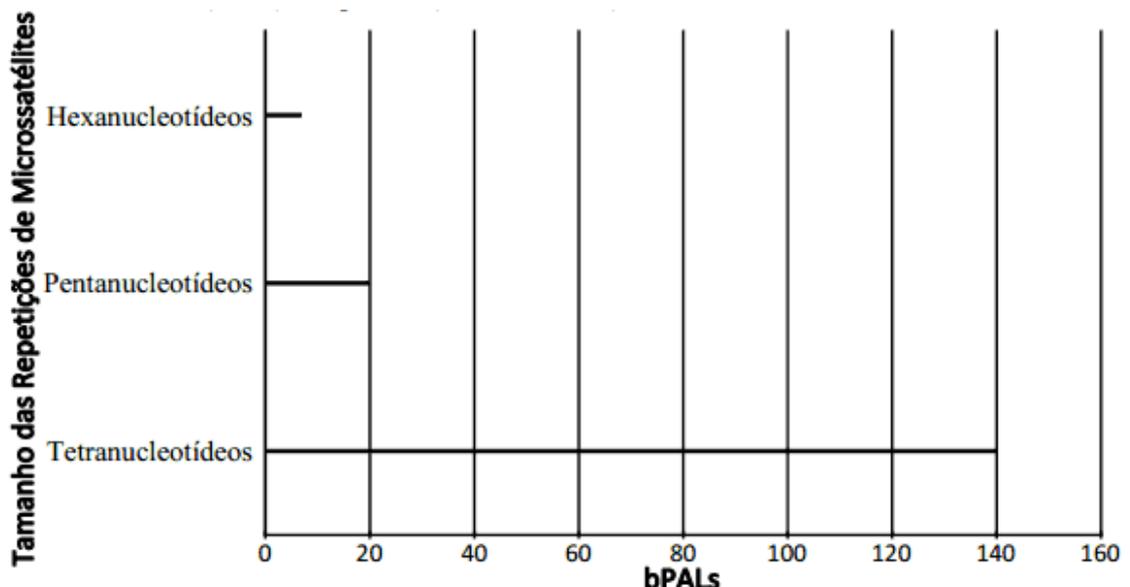


Figura 2: *Loci* de melhor qualidade (bPALs) identificados por tamanho das repetições.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que uma pequena cobertura do genoma de *O. humensis* fez-se suficiente para a identificação de um grande número de *loci*

potencialmente amplificáveis de microssatélites. Além disso, foi gerado um número ótimo de bPALs, com grande potencial para análise de variabilidade genética da espécie estudada.

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**, Chile, v.35, p.65-74, 2008.

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**, Califórnia, v.7, n.2, p.1-10, 2012.

DYER, B.S. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). **Biocell**, Mendoza, v.30, n.1, p.69-88, 2006.

IRANAWATI, F.; JUNG, H.; CHAND, V. et al. Analysis of Genome Survey Sequences and SSR Marker Development for Siamese Mud Carp, *Henicorhynchus siamensis*, Using 454 Pyrosequencing. **International Journal of Molecular Science**, Basel, n.13, p.10807-10827, 2012.

JIANG, Y.; GAO, X.; SHIKAI, L. et al. Whole genome comparative analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with four model fish species. **BMC Genomics**, London, v.14, n.780, p.1-11, 2013.

KATAGIRI, T.; KIDD, C.; TOMASINO, E. et al. A BAC-based physical map of the Nile tilapia genome. **BMC Genomics**, London, v.6, n.89, p.1-6, 2005.

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**, Califórnia, v.8, 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**, Basel, n.13, p.14946-14955, 2012.

MEGLÉCZ, E.; NÈVE, G.; BIFFIN, E.; GARDNER, M. G. Breakdown of Phylogenetic Signal: A Survey of Microsatellite Densities in 454 Shotgun Sequences from 154 Non Model Eukaryote Species. **PLoS ONE**, Califórnia, v.7, n.7, p.1-15, 2012.

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