

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A PIRANHA CAJU (*Pygocentrus nattereri*, KNER, 1858) (CHARACIFORMES: SERRASSALMIDAE)

Priscila Roberta Mendonça do NASCIMENTO¹; Carolina Fernandes da Silva SOUSA²; Marcos Prado LIMA³; Gisele Torres CLIMACO⁴; Carlos Henrique dos Anjos dos SANTOS⁵; Vera Maria Fonseca de ALMEIDA-VAL⁶

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Colaboradora FAPEAM; ³ Colaborador UFOPA; ⁴Colaboradora GCBEv/CNPq; ⁵Coorientador GCBEv/CNPq ; Orientadora INPA/CBio

1. Introdução

A piranha caju (*Pygocentrus nattereri*, Kner, 1858) pertence à Ordem Characiformes e à família Serrasalminidae (Ortí *et al.*, 2008). Essa espécie apresenta características biológicas e demográficas que indicam táticas eficientes à vida em lagos de várzea (Saint-Paul e Zuanon, 2000) do rio Solimões/Amazonas. A espécie *P. nattereri* alimenta-se exclusivamente de peixes, sendo considerada uma predadora voraz. Sua reprodução ocorre nas planícies de inundação (Magurram e Queiroz, 2003) no início da enchente, apresentando desova parcelada, com seus ovos aderentes sendo depositados sobre as plantas submersas. Sua distribuição geográfica ainda não é muito bem conhecida e há necessidade de uma melhor definição dos limites da sua ocorrência, porém Fink (1993) destaca que a espécie é bastante comum na Amazônia Central e no Pantanal Matogrossense. Portanto, a fim de obter informações sobre a biologia dessa espécie, foram desenvolvidos os marcadores microssatélites, que constituem em marcadores moleculares altamente polimórficos, que nos permitem acessar informações sobre a variabilidade genética das espécies. Os dados gerados no presente trabalho permitir-nos-ão subsidiar o manejo e a conservação desta espécie no futuro.

2. Material e Métodos

Foram coletadas 35 amostras de tecido muscular de *P. nattereri* durante as expedições do Projeto PIATAM em sete lagos localizados entre as cidades de Coari e Manaus no rio Solimões. O DNA genômico foi extraído do tecido muscular seguindo o protocolo de Sambrook *et al.* (1989). As amostras foram levadas para análise qualitativa em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com GelRed e, por fim, visualizado em transiluminador *L-PIX Image* (Loccus Biotecnologia) e fotografados. Foram feitas análises em *NanoDrop 2000* (Termo Scientific) no comprimento de onda de 260nm para quantificar o DNA e a relação de absorvância A260/A280 foi determinada para verificar a contaminação por proteínas ou compostos aromáticos. As amostras de DNA foram diluídas para 50ng/μL e estocadas a -20°C. A biblioteca enriquecida em microssatélites foi desenvolvida no ano de 2008, seguindo a metodologia descrita por Billotte *et al.*, 1999 em parceria com o Laboratório de Análise Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, no âmbito do Programa PROCAD-CAPES. Os clones foram sequenciados no analisador automático ABI3130 *xl* (Applied Biosystems) e os produtos gerados foram alinhados e a qualidade foi verificada através do programa BioEdit v.7.0.8.0 (Hall, 1999). A partir disso, foram construídos os *contigs* utilizando o programa CodonCode Aligner (www.codoncode.com/aligner/). Os *contigs* contendo os microssatélites foram salvos no formato *Fasta* e lançados no programa Oligor Explorer v 1.2 (Gene Link, Inc.) para o desenho dos *primers* específicos (*forward* e *reverse*) dos locos microssatélites para espécie. Após o desenho de 11 pares de *primers*, foram acrescentados em cada *primer forward* uma cauda M13 na região 5' de acordo com o protocolo de Schuelke (2000). Em seguida, os fragmentos de microssatélites foram amplificados via PCR em termociclador Veriti (Applied Biosystems) com as temperaturas otimizadas para cada par de *primer* que flanqueiam os locos microssatélites. Os produtos de amplificação foram verificados por eletroforese em gel agarose 2% em tampão TAE 1x corado com GelRed™. Os fragmentos amplificados foram analisados em sequenciador ABI3130 *xl* (Applied Biosystems) utilizando *primers* marcados com fluorescência (FAM) de acordo com Farias *et al.* (2003) e Schuelke (2000). O tamanho dos fragmentos foi avaliado utilizando o marcador de peso molecular GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystems). Para a estimativa do número de alelos por loco, heterozigidade observada (H_o) e esperada (H_e) foi utilizado o programa Genetix 4.5.2 (Belkhir *et al.*, 2004) e para verificar o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foi usado o programa

Cervus v.3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007). O programa GDA (Lewis e Zaykin, 2002) foi utilizado para calcular o Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos locos. O desequilíbrio de ligação foi verificado pelo software FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). Também foi utilizado o programa Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.* 2004) para verificar a presença de alelos nulos. O nível de significância foi ajustado segundo a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

3. Resultados e discussão

A concentração do DNA extraído dos 35 indivíduos variou entre 250 a 600 ng/ μ L. Na amplificação por PCR foram utilizados os 11 pares de *primers* sintetizados (Tabela 1) e todos apresentaram bom padrão de amplificação. A genotipagem dos locos gerados pelo sequenciador ABI 3130 *xl* Applied Biosystems, foi analisada pelo programa GeneMapper® (Applied Biosystems) sendo anotados os tamanhos dos alelos encontrados. A partir da anotação dos alelos pode-se perceber que dois locos PN8 e PN9 se mostraram marcadores monomórficos para a espécie *P. nattereri* para os quais foi encontrado apenas um tamanho de alelo, e para estes não foram realizados testes estatísticos. O programa Micro-Checker (van Oosterhout *et al.* 2004) mostrou a possível presença de alelos nulos para o loco PN11 com nível de significância de 5%. De acordo com o programa FSTAT v 2.9.3.2. (Goudet, 2001), o loco PN11 está fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\alpha = 0.0056$, correção de Bonferroni), porém não foi encontrado desequilíbrio de ligação. O número de alelos por loco (A) variou de 3 a 15 (média 8.2), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) variou de 0.300 a 0.824 (média 0.559) e 0.261 a 0.779 (média 0.571) respectivamente e o índice de fixação (f) variou de -0.171 a 0.323 (média 0.038). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) mostrou variação em valores de 0.238 a 0.758 (média 0.532).

Tabela 1 – Características de 11 locos microssatélites para piranha caju *Pygocentrus nattereri*

SSR locos	Motivo de repetição	N	A	Tamanho dos alelos (pb)	H_e	H_o	f	PIC	P valores* HWE
PN1	(TG) ₁₁	35	6	237-249	0.554	0.529	0.060	0.456	0.408
PN2	(ATA) ₂ (AT) ₃	35	5	245-259	0.562	0.667	-0.171	0.499	0.944
PN3	(GT) ₅ GC(GT) ₈	35	4	229-244	0.455	0.529	-0.148	0.409	0.928
PN4	(GT) ₃ CT(GT) ₂₁	35	5	214-258	0.469	0.368	0.241	0.443	0.099
PN5	(AC) ₁₂	35	14	209-229	0.779	0.794	-0.003	0.758	0.601
PN6	(GACA) ₃	35	15	152-190	0.771	0.657	0.162	0.750	0.029
PN7	(TG) ₁₇	35	10	224-248	0.759	0.824	-0.070	0.729	0.859
PN8	(TG) ₃ G(GT) ₃ A (TG) ₂	35	1	255-255	-	-	-	-	-
PN9	(GT) ₅	35	1	319-319	-	-	-	-	-
PN10	(CA) ₂₅	35	3	187-205	0.261	0.300	-0.123	0.238	1.000
PN11	(TG) ₁₀	35	12	208-286	0.529	0.367	0.323	0.506	0.003*

Número de amostras (N), Número de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), índice de endogamia (f), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), valores de P para o teste de HWE, significância ajustada usando correção de Bonferroni (P-HWE): (P: 5% \leq 0.0056)

Assim como neste trabalho, para outras espécies da família Serrasalminidae como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), foram desenvolvidos marcadores microssatélites. Santos *et al.*, (2007) desenvolveram marcadores microssatélites polimórficos para o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que também foram variáveis em três outras espécies de Serrasalminidae, incluindo a piranha caju (*Pygocentrus nattereri*), espécie aqui estudada. De acordo com Calgagotto *et al.*, (2001) oito locos polimórficos foram desenvolvidos para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), dos quais cinco locos exibiram heterozigidade superior a 60%. Adicionalmente, um alto nível de transferibilidade foi obtido para outras espécies de Serrasalmídeos, especificamente para a piranha caju (*Pygocentrus nattereri*) três locos apresentaram amplificação e polimorfismo. O desenvolvimento de novos locos microssatélites para esta espécie pode representar uma importante ferramenta em estudos de conservação em ambientes degradados e em locais onde a mesma é sobre pescada para fins de alimentação, uma vez que a mesma é importante elo da cadeia alimentar do ambiente aquático.

4. Conclusão

Os locos desenvolvidos para a espécie *P. nattereri* mostram moderada variabilidade genética em comparação com outros estudos citados no trabalho e podem ser usados para estudos futuros de estrutura, tamanho efetivo de populações, fluxo gênico e outros parâmetros que podem ser analisados. Essas informações serão importantes para estimar possíveis estratégias de manejo e conservação genética dessa espécie na natureza.

5. Referências

- Belkhir, K.P.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N.; Bonhomme, F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire du Génome et Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Billotte, N.; Lagoda, P.J.R.; Risterucci, A.M.; Baurens, F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.
- Calcagnotto, D; Russello, M.; DeSalle, R. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology* 1: 245-247.
- CodonCode Aligner, (www.codoncode.com/aligner/). Acesso em 12/6/2011.
- Farias, I.P.; Hrbek, T.; Brinkmann, H.; Sampaio, I.; Meyer, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes* 3: 128-130.
- Fink, W.L.1993. Revision of the piranha genus *Pygocentrus* (Teleostei: Characiformes). *Copeia* 3: 665-687.
- Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. (version 2.9.3.2). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> (Updated from: Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486).
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Simp Ser* 41:95-98.
- Kalinowski, S.T.; Taper, M.L.; Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099-1106.
- Lewis, P.O.; Zaykin, D. 2002. GDA User's manual. Last updated January 7, 45p.
- Magurran, A.E.; Queiroz, H.L. 2003. Parther choice in piranha shoals. *Behaviour* 140:289-299.

Ortí, G. A.; Sivasundar, K.; Dietz & M, Jégu. 2008. Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 343-351.

Rice, W.R.1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.

Saint-Paul, U.; Zuanon, J. 2000. Fish communities in central Amazonian white and blackwater floodplains. *Environmental Biology of Fishes*. 53p.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotech* 18: 233-234.

Santos, M.C.F.; Ruffino, M.L.; Farias I.P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*, 71 (Supplement A): 33 - 44.

Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.; Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.