

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATELITES PARA O ACARI BODÓ (*Pterygoplichthys pardalis*, CASTELNEAU, 1855)

Rosalina Pinheiro PEREIRA¹; Carolina Fernandes da Silva SOUZA²; Gisele Torres CLÍMACO³; Carlos Henrique dos Anjos dos SANTOS⁴; Alexandre Manuel Kirilo VERGUEIRO JUNIOR⁵; Vera Maria Fonseca de ALMEIDA-VAL⁵

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Colaboradora-FAPEAM; ³Colaboradora GCBEV/INPA/CNPq;

⁴Coorientador GCBEV/INPA/CNPq; ⁵Orientador INPA/CPEC.

1. Introdução

A bacia amazônica abriga a maior e a mais diversificada ictiofauna do planeta. Estima-se que na região neotropical existam cerca de 5.000 a 8.000 espécies de peixes, sendo que atualmente são conhecidas 4.500 espécies (Lundberg *et al.* 2000), e outras ainda serão descritas de acordo com Lévêque (2008). Dentre os peixes neotropicais podemos destacar o acari-bodó *Pterygoplichthys pardalis* (Castelneau, 1898), que é bastante utilizado pelos ribeirinhos da bacia amazônica na alimentação. Alguns aquarofilistas utilizam essa espécie para ornamentação. *P. pardalis* é uma espécie que vive no substrato e é hoje um importante organismo para estudos de contaminação de solo de rios na bacia amazônica. Contudo, pouco se conhece da biologia dessa espécie, como sua reprodução, como se realiza sua migração, seu tamanho populacional, entre outras características. Estudos genéticos inexistem para esta espécie e poderão futuramente nos fornecer informações importantes a respeito de sua biologia. O presente estudo teve o propósito de desenvolver marcadores microssatélites para o *P. pardalis*, com o intuito de respondermos questões relacionadas à biologia da espécie, já que os microssatélites são excelentes marcadores genéticos e estão amplamente distribuídos no genoma dos seres vivos (Oliveira *et al.* 2006). Portanto, dados dessa natureza poderão contribuir para estudos de conservação e manejo dessa espécie na bacia amazônica.

2. Material e Métodos

Amostras de 34 indivíduos de *P. pardalis* foram capturadas durante as expedições do Projeto PIATAM em lagos localizados no trecho do rio Solimões entre as cidades de Coari e Manaus. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e mantidas em um freezer -80°C. O DNA genômico total foi extraído do tecido muscular branco segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). A qualidade do DNA extraído foi verificada em uma eletroforese de gel de agarose a 1% (Figura 4) (m/v) utilizando o tampão TAE 1X, corado com GelRed® e analisado por meio de um transiluminador L-PIX Image (Loccus Biotecnologia).

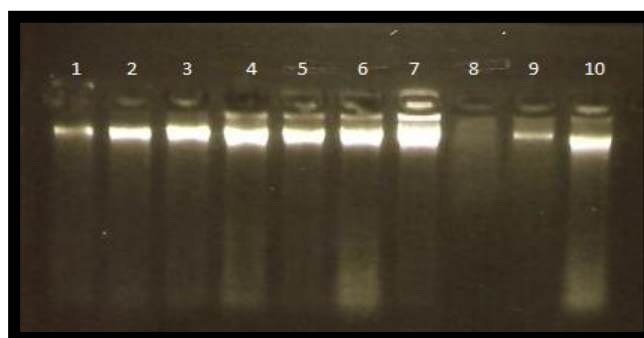


Figura 4 - Qualidade do DNA em gel de agarose (1%)

Em seguida, as amostras de DNA foram quantificadas e verificadas quanto à sua pureza utilizando um espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). A biblioteca genômica enriquecida foi desenvolvida segundo a metodologia descrita por Billotte *et al.* (1999) com algumas modificações. O Banco foi desenvolvido durante a realização do Programa PROCAD-Amazônia em parceria com INPA/UNICAMP/UFRGS. As sequências obtidas contendo os microssatélites foram alinhadas e verificadas quanto a sua qualidade por meio do programa BioEdit (Hall 1999). Em seguida, foram gerados os *contigs* utilizando o programa Codon Code Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner/>). Os *contigs* foram salvos em formato *Fasta* e utilizados no programa Oligo Explorer 1.2 (Gene Link, Inc) para desenho de 13 pares de *primers* de microssatélites para a espécie *P. pardalis*. Segundo a metodologia de (Schuelke, 2000), foi adicionada uma cauda M13 na porção 5' de cada *primer forward*. Para a determinação da temperatura de anelamento dos *primers* de microssatélites, realizou-se reação em cadeia da polimerase (PCR) de gradiente de temperatura em termociclador Veriti (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 94°C por cinco minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 45-65°C por 1 min. e 72°C por 1 min, e para extensão final 72°C por 15 min. Em seguida, realizamos uma PCR de genotipagem para amplificação dos locos microssatélites aplicando os seguintes ciclos: 94°C por 3 minutos, 20 ciclos de 94°C por 20 segundos, 45-65°C por 20 segundos (temperatura de anelamento específica para cada par de *primers*, Tabela 1), 68°C por 30 segundos, 25 ciclos de 94°C por 20 segundos, 53°C por 20 segundos, 68°C por 30 segundos e a extensão final de 72°C por 3 minutos, respectivamente. Os produtos amplificados da PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X, corados com GelRed®. Os produtos de PCR com boa qualidade de amplificação foram analisados no sequenciador de DNA automático ABI3130 *xl* (Applied Biosystems), com *primers* marcados com fluorescência *FAM*, conforme Farias *et al.* (2003) e Schuelke (2000). Os tamanhos dos alelos foram confirmados utilizando o marcador de peso molecular GeneScan™ 500 LIZ® através do programa GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems). Para a análise dos dados utilizamos como parâmetros de diversidade o número de alelos (*A*), heterozigosidade observada (*H_O*) e esperada (*H_E*), índice de endogamia (*f*) utilizando o programa Genetix 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). O programa Fstat v 2.9.3.2 (Goudet 2001) foi utilizado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para os locos e o desequilíbrio de ligação (DL) para os pares de locos, sendo o nível de significância ajustado simultaneamente pela correção de Bonferroni (Rice 1989). O programa Micro-Checker (van Oosterhout *et al.* 2004) foi utilizado para verificar a possível presença de alelos nulos e erros de genotipagem, como a retirada de grandes alelos e os picos de gaguejo/*stutter*.

3. Resultados e Discussão

As sequências de DNA utilizadas para o desenho dos doze *primers* de microssatélites eram compostas por regiões contendo dinucleotídeos, sendo que dessas apenas uma sequência foi classificada como loco simples imperfeito e o restante foi classificado como simples perfeito (ver motivo de repetição, Tabela 1). Os dinucleotídeos das sequências eram formados pelas bases nitrogenadas: GT/TG, AC/CA e AG/GA, com número de repetições variando de seis a 26. Os dados de polimorfismo foram realizados para seis locos de microssatélites para espécie *P. pardalis* (Tabela 1), sendo que os sete locos restantes estão em testes para posterior análise final do trabalho. O programa Micro-Checker (van Oosterhout *et al.* 2004) mostrou existir possível presença de alelos nulos para o loco PP01 e PP05, com nível de significância de 5%. Observou-se que os locos PP01 e PP05 desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\alpha = 0.0083$; correção de Bonferroni), contudo não constatamos desequilíbrio de ligação entre os pares de locos analisados pelo programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet 2001). A partir do programa Genetix 4.05.2 (Balkhir *et al.* 2004) obtivemos o número de alelos por locos (*A*) que variaram de dois a nove (média de 4,8), a heterozigosidade observada (*H_O*) e esperada (*H_E*) variou de 0,000~0,933 (média de 0,629) e 0,500~0,804 (média de 0,647) e o coeficiente de endocruzamento (*f*) que variou de -0,532~1,000 (média de 0,081). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foi calculado utilizando o programa Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007) e apresentou variação nos valores em torno de 0,375~0,785 (média de 0,591).

Tabela 1 – Caracterização dos locos microssatélites para o acari bodó (*P. pardalis*)

SSR Locos	Motivo de Repetição	N	A	Tamanho dos alelos (pb)	H_E	H_o	f	PIC	P valores* HWE
PP01	(GT) ₁₅	15	2	216-218	0,500	0,000	1,000	0,375	0,002*
PP02	(GT) ₅ GA(GT) ₁₈	15	5	171-179	0,702	0,867	-0,201	0,655	0,961
PP04	(GA) ₂₆	15	9	200-242	0,804	0,800	0,040	0,785	0,465
PP05	(AC) ₆	15	4	159-197	0,576	0,250	0,595	0,485	0,007*
PP06	(AC) ₂₁	15	3	153-159	0,538	0,923	-0,532	0,519	1,000
PP10	(AC) ₁₈	15	6	169-179	0,762	0,933	-0,191	0,728	0,982

Número de alelos: (N) número de indivíduos testados; (A), heterozigosidade esperada: (H_E) e observada: (H_o), índice de fixação: (f), Conteúdo de Informação de Polimeorfismo: (PIC), valores de P para o teste de HWE, significância ajustada usando correção de Bonferroni (P-HWE): (P: 5% \leq 0.0083).

4. Conclusão

Os seis locos desenvolvidos para a espécie *P. pardalis* apresentam uma moderada variabilidade genética e futuramente serão úteis para estudos sobre a variabilidade genética total. Essas informações serão importantes para contribuir com a 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.
- Codon Code Aligner. Web Page: <http://www.codoncode.com/aligner/>
Acesso em: 07/06/2010.
- 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.
- 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.
- Lévêque, C.; Oberdorff, T.; Paugy, D.; Stiassny, M.L.J.; Tedesco, P.A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 545-567.
- Lundberg, J.G.; Kottelat, M.; Smith, G.R.; Stiassny, M.L.J.; Gill, A.C. 2000. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 87: 26-62.
- Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M. I.; Vencovsky, R.; Vieira, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294-307.

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

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

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

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.