

CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES PARA O TUCUNARÉ *CICHLA MONOCULUS* (SPIX E AGASSIZ, 1831)

Priscila Roberta Mendonça do NASCIMENTO¹; Marcos Prado LIMA²; Carlos Henrique dos Anjos dos SANTOS³; Carolina Fernandes da Silva SOUSA⁴; Tatiana de CAMPOS⁵; Vera Maria Fonseca de ALMEIDA-VAL⁶

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Co-orientador Bolsista DTI/CNPq; ³Colaborador Bolsista CNPq/INPA; ⁴Colaboradora Bolsista DTI/INPA; ⁵Colaboradora Bolsista FAPESP/UNICAMP ⁶Orientadora CPEC /INPA

1. Introdução

Estudos sobre a variabilidade genética são de considerável importância quando se pensa em elaborar projetos que visam à conservação de recursos naturais (Leuzzi *et al.* 2004). Dessa forma, entender a variação em nível molecular pode nos fornecer respostas sobre as adaptações adquiridas pelos organismos para se ajustarem a mudanças ambientais, particularmente àquelas de origem antropogênica (Marques 2002).

A grande diversidade da ictiofauna neotropical, e sua importância econômica nas diversas regiões do mundo, traz-nos como desafio o acompanhamento regular dos estoques pesqueiros. Os estudos que visam à conservação desses recursos vêm, nos últimos anos, aplicando ferramentas moleculares em seus programas de conservação a fim de evitar o declínio da variabilidade genética (Ward e Grewe 1995).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados nos últimos anos podemos destacar as sequências simples repetidas (microsatélites). Dentre as principais características desse marcador estão: a co-dominância, o multi-alelismo, a distribuição uniforme no genoma e seu elevado conteúdo de informação de polimorfismo. Essas características fazem dos microsatélites uma importante ferramenta para o auxílio em estudos populacionais (Milach 1998).

O tucunaré (*Cichla monoculus*) é um peixe endêmico da bacia amazônica e pertence ao gênero *Cichla* da família Cichlidae e à Ordem Perciformes. A família Cichlidae é muito diversa e se distribui no continente africano, asiático e nas Américas do Sul e Central. As espécies são reconhecidas como detentoras de grande plasticidade fenotípica, podendo ocorrer tanto em água doce como salobra (Nelson 1994). Em todos os continentes que ocorre este grupo sofreu enorme radiação adaptativa, sendo muito especioso em todas as regiões em que ocorre no planeta.

O tucunaré (*Cichla monoculus*) foi amplamente introduzido em várias regiões do Brasil e é uma das espécies do gênero *Cichla* de grande porte, podendo alcançar 50 cm de comprimento e 9 kg de peso (Ferreira *et al.* 1998). Possui hábito diurno, assim como as demais espécies desse gênero (Novaes e Caramaschi 1999) e não realiza migrações. A espécie é muito apreciada em função da alta qualidade de sua carne, com pouca quantidade de espinhas e baixos teores de gordura. Recentemente, o tucunaré tem se destacado na pesca esportiva por apresentar comportamento brigador.

Neste contexto, devemos ficar atentos à diminuição das populações naturais e à possível extinção de espécies de peixes com valor comercial, que nos últimos anos vêm sofrendo uma diminuição do tamanho de suas populações, bem como perda da variabilidade genética, devido a degradação e/ou fragmentação dos ecossistemas naturais além da grande sobre-pesca a que são submetidas.

O objetivo principal deste trabalho foi identificar e validar locos de microsatélites para o tucunaré (*Cichla monoculus*) da Amazônia, visando sua aplicação em estudos de genética da conservação e de populações.

2. Material e métodos

Locais de Coleta: Foram utilizadas amostras de tecido muscular de 27 indivíduos de *C. monoculus* coletados em lagos de várzea no trecho entre Coari e Manaus durante as expedições do projeto PIATAM no ano de 2008. Após a coleta os tecidos foram mantidos em nitrogênio líquido no campo e transportados ao laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular no INPA em Manaus, onde foram mantidos em freezer -80 °C até o momento da extração do DNA.

Extração do DNA Genômico: O DNA foi extraído a partir de tecido muscular, de acordo com o protocolo desenvolvido por Sambrook e Russel (2001) com algumas modificações. Para confirmar a presença e a qualidade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) com tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio (0.1 µg/mL) e visualizado em transiluminador (Pharmacia Biotech) com luz ultravioleta (UV) e fotografado. Em seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro *GeneQuant II RNA/DNA Calculator* (Pharmacia Biotech) no comprimento de onda de 260 nm.

Locos Microssatélites: As sequências de DNA contendo regiões com microssatélites foram identificadas seguindo a metodologia de Construção de Biblioteca Genômica Enriquecida em Microssatélites, em parceria com o Laboratório de Análise Genética e Molecular da UNICAMP. Por meio dessa técnica, foi possível desenhar 40 pares de *primers* flanqueando regiões com microssatélites, dos quais os 15 melhores foram sintetizados e utilizados no presente estudo. Para a definição e seleção dos 15 pares de *primers* utilizamos os parâmetros adotados pelo programa de bioinformática Primer Select (DNASStar) em que a sequência dos primers deveria possuir entre 18 e 24 nucleotídeos, conteúdo de GC acima de 35%, temperatura de anelamento ente 45°C e 60°C e *primers* com extremidade 3' complementares foram descartados.

Reação de PCR e Genotipagem: Para a caracterização dos locos, as reações de PCR foram constituídas de 1 µL de tampão de PCR (10X), 2 µL de *primer* (10 pmol) (direto e reverso), 0,8 µL de dNTP mix (10mmol), 0,2 µL de Taq Polimerase (1unit), 10 ng de DNA e completadas com água estéril até um volume final de 10 µL. O programa de termociclagem consistiu de uma desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 10 seg na temperatura ótima de cada par de primer, 30 seg a 72°C e uma extensão final de 60 min a 72°C.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio 0,1 mg/ml em tampão TBE (pH 8.0) e a genotipagem das amostras foram feitas em gel de poliacrilamida desnaturante em 6% com tampão TBE, usando um marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen, CA, E.U.A.). Os fragmentos de DNA foram visualizados após a coloração com nitrato de prata de acordo com Creste *et al.* (2001).

Análise dos dados: Utilizou-se o programa GDA (*Genetics Date Analysis*) (Lewis e Zaykin 2002) para obter heterozigocidades observada e esperada, índice de endogamia (FIS) e utilizou o software CERVUS Kalinowski *et al.* (2007) para calcular o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (Cordeiro *et al.* 2003) e o software FSTAT (Goudet, 2001) para calcular o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação.

3. Resultados e discussão

Dos 14 locos microssatélites, 12 foram polimórficos e dois monomórficos. O número de alelo por loco variou entre dois (loco CMxx) a 13 (loco CMyy), com média de seis alelos por locos. No que concerne à heterozigocidade, verificamos uma variação de 0,54 a 0,94 (média de 0,66) para heterozigocidade observada, e 0,45 a 0,90 (média de 0,64) para heterozigocidade esperada.

Oito locos apresentaram excesso de heterozigotos e cinco locos carência de heterozigotos (Tabela 1). Os valores do índice de endogamia (f) e do Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) variaram entre -0,452 a 0,467 e 0,36 a 0,86, respectivamente (Tabela 1).

Três locos (CM03, CM04 e CM09) apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni ($p > 0,0041$) e nenhum dos locos apresentou-se em ligação, após o teste do Desequilíbrio de Ligação (DL).

Tabela 1 Características de 14 locos microssatélites para *Cichla monoculus*

Locus	GenBank Numero de acesso	Motivo	T (°C)	Sequências dos primers (5' - 3')	A	Tamanho do fragmento (bp)	PIC	H _o	H _E	P-HWE	Fis (f)
CM01	GU391577	(CA) ₉	57	F: TCGATGGCTAGACTGAAGAAAC R: AACCAGAGAAACCAGTGAGAGG	4	184 - 195	0.65	0.70	0.61	0.376	- 0.243
CM02	GU391578	(AC) ₄ AT(AC) ₇	54	F: GGTTAGATGAGGGGTGAGTGTG R: TCGTCCATTTTCTCTGCT	2	304 - 306	0.36	0.58	0.47	0.603	- 0.434
CM03	GU391579	(TG) ₁₁	54	F: TAGCAGTGTGATTGTATTCTTT R: GTGTTTGACCTCTCCTTTCT	11	260 - 330	0.87	0.52	0.90	0.000*	0.358
CM04	GU391580	(GT) ₁₀	56	F: CTCAGTGGCAAGGGAACA R: TGCTAAAGAATGGCTGATAAAT	13	240 - 280	0.85	0.47	0.89	0.000*	0.467
CM05	GU391581	(TG) ₄ C(GT) ₅	49	F: TCGAGCAGGACATCAACA R: TCATCATTCACTCTTTTCATC	10	240 - 262	0.70	0.64	0.70	0.211	0.189
CM06	GU391582	(GT) ₁₄	64	F: AGTGTGCATCCAATCCAATCTC R: GAAGTGAAGGCTGTAGTCAAA	9	200 - 214	0.74	0.90	0.79	0.249	- 0.202
CM07	GU391583	(TG) ₉ TT(TG) ₃	56	F: CAGCGATAGGGATGTC R: TATAGTAGATGGCGTGAGTA	3	256 - 270	0.43	0.45	0.45	0.681	0.125
CM09	GU391585	(CA) ₆ CT(CA) ₂	49	F: TTAGCCACTCTCCAAACTGT R: AGAAGCGCAGCAACCACA	4	210 - 220	0.51	0.94	0.60	0.000*	- 0.440
CM10	GU391586	(AG) ₈	60 - 45 [#]	F: GTAGCAGCACTCCACAG R: CTCTCAAGCAGCACCAAT	6	216 - 222	0.60	0.73	0.63	0.268	- 0.272
CM11 ^b	GU391587	(CT) ₇	50	F: AGGGTTGTGGATGTCTGTAG R: GTGTTTAAAAAGCTGGTATTCA	4	226 - 230	0.39	0.61	0.47	0.098	- 0.439
CM12 ^a	GU391588	(CAC) ₅	58	F: CCTTGCTATTATTGGTTGG R: GAGGCTACAGTTCACATTGG	1	248	-	-	-	-	-
CM13 ^b	GU391589	(CA) ₇	53	F: ATTGTGAGCTACTGATGG R: AGCTTGTTAATAAAATGACTG	8	220 - 234	0.61	0.80	0.65	0.080	- 0.452
CM14	GU391590	(GT) ₇	49	F: GCACGGGAAGCAGAACTATTA R: GCTGACAGGAGGCAACCATC	3	278 - 282	0.39	0.57	0.50	0.625	- 0.331
CM15 ^a	GU391591	(CT) ₄ T(AC) ₅	49	F: ATGAGAAGTGGCAAGCAGAT R: TGTGGGAAAGTAAGCAACC	1	280	-	-	-	-	-

*Nome dos locos, número de acesso no GenBank, o motivo de repetição do microssatélite, temperatura de anelamento, sequência do *primers* forward (F) e reverso (R), número total de alelos por loco(A), (PIC) conteúdo de informação de polimorfismo, (H_o) Heterozigocidade observada, (H_E) Heterozigocidade esperada, (P-HWE)valores do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e o (FIS) estimativa por locos para análise das populações.

^a locos monomórficos, ^bpresença de alelos nulos detectados por Micro-checker. Ver 2.2.3 (<http://www.microchecker.hull.ac.uk/>), # PCR touchdown com temperaturas variando entre 60 ° C a 45 ° C, afasta * significativamente de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni, P <0,0041 .

4. Conclusão

A moderada diversidade genética nas populações de *C. monoculus* se deve principalmente à uma riqueza alélica alta observada em alguns locos analisados, o que colaboraria para uma boa ocorrência de diferentes genótipos, tendo como consequência uma alta frequência de heterozigotos na população.

Estudo sobre genética da conservação em peixes de água doce tem sido realizado utilizando ferramentas moleculares, respondendo a questões biológicas e ecológicas diretamente relacionadas com a biologia das populações.

Assim, os marcadores de DNA são extremamente uteis para o desenvolvimento de planos de gestão e conservação adequados para populações naturais de peixes.

5. Apoio Financeiro

INPA, CNPq, Piatam, Petrobrás, FINEP, FAPEAM, FAPESP – Unicamp, ADAPTA, PROCAD/ CAPES

6. Referências Bibliográficas

Cordeiro GM, Taylor GO, Henry RJ (2003) Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum sp.*), a highly polyploidy species. *Plant Sci* 155:161–168

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biol Rep* 19:299– 306

Ferreira, E. J. G.; Zuanon, J. A. S.; Santos, G. M. 1998. *Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará*. Edições IBAMA, Brasília, 211p

Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>

Leuzzi, M. S. P.; Almeida, F. S.; Orsi, M. L.; Sodré, L. M. K. 2004. Analysis by RAPD of the genetics structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3): 355-362.

Lewis P, Zaykin D (2002) Genetic Data Analysis (GDA): Computer Program for the Analysis of Allelic Data (Software), version 1.1 (d12). <http://allegn.eeb.uconn.edu/gda/>

Marques, D. K. S. 2002. *Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros*. Corumbá: Embrapa Pantanal. 22p. (Documentos 36).

Milachi, S. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998. 141p.

Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the world*. 3 ed, John Wiley & Sons. 600 pp

Novaes, J. L. C.; Caramaschi, E. P. 1999. Ocorrência, distribuição e abundância de três espécies do gênero *Cichla* (Perciformes: Cichlidae) no AHE de Serra da Mesa-GO. *Anais, XII Encontro Brasileiro de Ictiologia*, p.221-226.

Sambrook, J., Russel, D. W. 2001. *Molecular cloning. a laboratory manual. I, II, III.*, 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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, 1099-1006

Ward, R. D.; Grewe, P. M. 1995. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: Carvalho, G. R., Pitcher, T. J. *Molecular geneticis in fisheries*. London: Chapman & Hall, p. 29-54.