

## **DESENVOLVIMENTO DE UM PAINEL DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ESPÉCIE-ESPECÍFICO PARA ROBALO-PEVA (*Centropomus parallelus*)**

Danilo de Assunção Vitoriano<sup>1</sup>; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf<sup>2</sup>; Letícia Rafaela de Morais<sup>3</sup>

1. Graduando em Ciências Biológicas; e-mail: danilo.vitoriano3@hotmail.com
2. Professor na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br
3. Doutoranda na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: leti.morais@yahoo.com.br

**Área de conhecimento:** Genética animal

**Palavras-chave:** Peixe; Conservação; População; Ferramenta genética

### **INTRODUÇÃO**

O Robalo-peva (*Centropomus parallelus*) é uma espécie de peixe ósseo muito apreciada no ramo gastronômico e de grande importância econômica, quando se trata da pesca esportiva quanto na pesca comercial. Distribui-se por toda costa do Atlântico, desde a Carolina do Norte (EUA) até a região sul do nosso país, já na costa do Pacífico, há relatos que o encontram do sul do México até o Peru. Este animal é conhecido pelo seu hábito eurialino e diádromo e quando trata-se da reprodução, é categorizado como hermafrodita protândrico, que nascem todos machos e com o passar dos anos se tornam fêmeas (CERQUEIRA & TSUZUKI, 2009). A importância da inserção de leis para a conservação do robalo-peva é essencial, já provemos de leis que relatam sobre os pesos mínimos e máximos e tamanhos permitidos para pesca dos robalos na região, o que permite ao estado promover esta ação contra a pesca indiscriminada da espécie. Desde a década de 1970 o uso de marcadores genéticos tem sido utilizado a fim de evidenciar a variabilidade dentro e entre populações possibilitando a compreensão dos processos que levam algumas espécies ao isolamento e adaptação de populações locais (HILSDORF & HALLERMAN, 2017). Entre esses marcadores podemos citar os microssatélites, que se tornou um dos marcadores moleculares mais populares em vários estudos genéticos devido ao seu alto polimorfismo e sua relativa facilidade de obtenção, o que justifica duas de suas principais características que o fazem de grande interesse nesses estudos. Essas regiões contendo repetições curtas são conservadas dentro de uma espécie e podem ser amplificadas por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), na qual são desenhados iniciadores nas regiões que flanqueiam um STR (LANZA, *et al.*, 2000). Tratando-se da espécie *C. parallelus*, a escassez de informações se acentua, pois grande parte dos trabalhos sobre a ecologia espacial e genética de populações de robalos é voltada para a espécie *Centropomus undecimalis*. No Brasil, informações sobre o ciclo reprodutivo e sobre a estrutura populacional desta espécie no Sudeste são insuficientes e os dados disponíveis tratam de populações costeiras. Face a importância ecológica e econômica deste peixe, desprovidos de estudos sobre genética de populações da espécie, pretende-se gerar um painel espécie-específico de marcadores microssatélites para pesquisas futuras.

### **OBJETIVO**

Desenvolver e validar um painel de iniciadores microssatélites espécie - específicos para robalo-peva, *Centropomus parallelus*, como ferramenta para futuras análises populacionais.

## METODOLOGIA

Foram utilizados fragmentos de nadadeira caudal de 30 indivíduos, coletados no período de 2019 a 2020, por pesquisadores do projeto, nas regiões de Florianópolis- SC, Cubatão- SP e Guaratuba- PR. A extração de DNA será realizada utilizando a resina Chelex 100® (SigmaAldrich®) (Walsh et al., 1991). O DNA das amostras foi verificado quanto sua qualidade, integridade e concentração em gel de agarose a 0,8% corrido em eletroforese horizontal, utilizando marcadores de peso molecular (Lambda DNA/HindIIIr- Fermentas, 1Kb DNA Ladder PlusFermentas e Low DNA Mass Ladder - Invitrogen) e no espectrofotômetro para medidas de microvolumes Nanovue™ Plus (GE Healthcare). O painel de *loci* microssatélites foi desenvolvido por meio das sequências geradas no sequenciador de nova geração Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA), o resultado foi analisado por softwares específicos que forneceram um rascunho genômico que foi submetido ao programa BatchPrimer3 para identificação das sequências que contém STR, bem como desenho dos primers para amplificação via PCR. Foram testados inicialmente 40 *loci* di, tri e tetranucleotídeos para seleção de 10 *loci* polimórficos. Os produtos de PCR foram genotipados, usando uma matriz de gel de poliacrilamida desnaturada 6,5% (KB plus 6,5% Gel Matrix, Li-Cor, Biosciences, Lincoln, NE, USA) pelo detector DNA Analyzer 4300, Li-Cor (IR2, Lincoln, NE, USA), utilizando o marcador IRDye®700 e iniciador cauda M13 universal descrito por Schuelke (2000). O tamanho dos alelos foi estimado pela interpolação da posição destes com os marcadores de peso molecular (50–350 bp DNA Sizing Standard IRDye®700), utilizando o programa SagaGT Client (LiCor Biosciences, Lincoln, NE, USA). Esses *locus* foram avaliados em programas que determinaram fatores relacionados ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, evidências de desequilíbrio de ligação entre os *locus*, diversidade alélica, coeficiente de endogamia, heterozigosidade esperada e observada e o conteúdo de informação polimórfica.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Foi gerado uma tabela com o *screening* dos SSR contendo a identificação dos *contigs* e seus respectivos *motif's* possibilitando a prospecção dos *locus* selecionando 40 iniciadores, dentre eles 19 di, 11 tri e 10 tetranucleotídeos que foram sintetizados. Todos os microssatélites apresentados foram testados a fim de identificar os mais polimórficos, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase- PCR. Após a PCR as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, e verificado a qualidade das bandas no fotodocumentador ImageQuant™ 300 Imager (GE HealthcareLife), utilizando o marcador de 50pb DNA Ladder- Sinapse. Em seguida, todos os *loci* foram amplificados nos 10 indivíduos de cada localidade e posteriormente genotipados conforme proposto nos métodos. Até o momento foram encontrados 10 *locus* classificados como polimórficos (tabela 3), sendo 3 di- 3 tri- e 4 tetra-nucleotídeos. Os resultados de PIC obtidos variou de 0,341 a 0,824, com uma média de 0,636 o que indica que os *loci* propostos são altamente informativos, exceto o *locus* CEP38 cujo PIC foi de 0,341, classificado como mediano. Já com os dados de desequilíbrio de ligação observamos que o *locus* CEP04 está em desequilíbrio de ligação com os *locus* CEP09 e CEP28, indicando que o *locus* CEP04 não deve ser utilizado em conjunto com CEP09 e CEP28 em estudos populacionais. Os marcadores microssatélites demonstram uma grande importância no ramo da genética de populações por serem altamente polimórficos em comparação a outros tipos de marcadores, tem como principal característica altos níveis de mutações, tornando-se uma ferramenta excepcional para acessar a variabilidade genética (FERGUSON *et al.*, 1995; AVISE, 2004; MELO *et al.*, 2006; ALLENDORF; LUIKART, 2007). Dado seu potencial e visto que ainda não se conhece a utilização deste marcador genético para a espécie, propomos um painel de iniciadores espécie-específicos para *Centropomus parallelus*, serão prospectados mais iniciadores a partir dos resultados obtidos com o

screening gerado no BatchPrimer3, a fim de completar um painel de 20 iniciadores polimórficos.

**Tabela 3:** Seleção dos *loci* polimórficos e suas características moleculares e estatísticas

<i>Locí</i>	Sequência de iniciadores (5' - 3')	T <sub>a</sub> (°C)	Motif	N	A	Aa	Ar	Ho	He	EHW	PIC
CEP04	*TGCTCCTCTTGCTCCTCTCTTTT CTTTGCAAGCCTTTCCCTGGT	60	TG	24	14	177-229	13,708	0,583	0,855	***	0,824
CEP09	*CGGGGTCTCAAAGTGTGTGTG ACCAACAGCATGGGTGAGCA	58	TG	24	8	158-206	7,832	0,667	0,719	NS	0,659
CEP18	*TGCTCGTCCTATTTAATGCCAGT ACAGCAGAGCACCCATCCTGA	60	CA	25	12	162-210	11,600	0,600	0,877	***	0,844
CEP26	*TCCTGTCTGGCACAAGATGC GGACTGCTTGGAGCGTCAGAA	58	AGG	24	7	139-181	6,957	0,625	0,807	NS	0,760
CEP28	*GACCGTCCTTGACCTGCCTCT GTGCACCAGCTCTCATGCAAA	60	ACA	24	6	187-211	5,999	0,625	0,764	***	0,713
CEP29	*GTGTTGTGCATCCTCGTTCA GGACGTGAAAACACATGCCAAG	60	ATA	29	3	148-190	3,000	0,655	0,602	NS	0,508
CEP31	*CCCAATTTCCCTCTTCGGATT GCAAAGGGGAAGAACATCCTTT	60	ATCC	24	6	153-193	5,875	0,542	0,582	NS	0,507
CEP36	*TCCTGAGCGAGGTCAGACAGC TTTGATGCAGTGTGGCATGGT	60	AAGA	23	4	171-173	4,000	0,304	0,745	***	0,678
CEP37	*ACGTCAGCTCGACTCCCTCAA CACATCCCTGATGGGGAGAGA	60	CCCT	24	3	142-182	2,999	0,333	0,401	NS	0,341
CEP38	*TGTGGAAGTTTAGCTAGCGCAGA TTGACTTGAGCAACGGCGATT	58	AAGG	28	5	190-222	4,643	0,464	0,612	NS	0,524

\* TGTAACGACGGCCAGT (sequência da cauda m13 inserida na região 5', T<sub>a</sub>(°C): temperatura de anelamento; N: número de amostras; A: número de alelos; Aa: tamanho do amplicon; Ar: riqueza alélica; Ho: Heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; PIC: conteúdo de informação polimórfica.

## CONCLUSÕES

No presente trabalho obtivemos um painel de 10 loci polimórficos para a espécie *C. parallelus*, com a aplicabilidade desse painel em trabalhos futuros, será possível entender a conectividade das populações amostradas e propor estratégias de melhoramento que favorecerão seu manejo sustentável bem como caracterizar esse importante recurso genético, uma vez que o robalo-peva é uma espécie com alto valor econômico e com grande potencial para a aquicultura no Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. 2007. Malden: Blackwell Publishing Google Scholar, 2007.
- CERQUEIRA, V.R.; TSUZUKI, M.Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.17-28, 2009.
- DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, n. 5, p. 504-509, 2004.

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODOHL, P.A.; MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmon. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 103-126, 1995.

HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. **Genetic resources of neotropical fishes**. 1. ed. Editora: Springer, 2017.

LANZA, M.A; GUIMARAES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Embrapa Milho e Sorgo**, Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

MELO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; RIBEIRO, L. P.; TEIXEIRA, C. S.; SOUSA, A. B.; COELHO, E. G. A.; TEIXEIRA, E. A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 87-93, 2006.