



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



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

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

1. Graduando em Ciências Biológicas; e-mail: danilo.vitoriano3@hotmail.com
2. Doutoranda de Biotecnologia - UMC; e-mail: leti.morais@yahoo.com.br;
3. Professor - UMC; e-mail: wagner@umc.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 diadromo e quando se trata 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 afim 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, pretende-se criar juntamente ao painel específico de marcadores microssatélites, um trabalho comparativo entre as populações das regiões de Santos e Registro, em São Paulo.



## OBJETIVO

Gerar um painel de marcadores microssatélites polimórficos espécie-específicos para *C. parallelus* para quantificar a divergência genética intra e interpopulacional para a espécie proposta e testar a hipótese da existência de populações distintas de robalo-peva entre as regiões alvo das amostragens.

## METODOLOGIA

Foram utilizados fragmentos de nadadeira caudal de 30 indivíduos, coletados no período de 2019 a 2020, por pesquisadores do projeto, nas regiões de Registro e Cubatão em São Paulo e Guaratuba-PR. A extração de DNA será realizado 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. A possível presença de diferentes populações genéticas será estimada por testes de atribuição, baseado em método Bayesiano, implementada no software STRUCTURE 2.3 (PRITCHARD et al., 2000). Os testes serão realizados com base no modelo de mistura (admixture model), nos quais as frequências alélicas serão correlacionadas. Similarmente, uma abordagem multivariada por análise discriminante de componentes principais (DAPC) (Jombart et al., 2010) será utilizada para designar indivíduos a seus agrupamentos genéticos por meio do pacote ADEGENET package (JOMBART, 2008; JOMBART et al., 2010). As estimativas de diferenciação populacional serão realizadas pelo estimador Dest de Jost (JOST, 2008) utilizando o programa R com o pacote DEMetics (Gerlach et al., 2010).

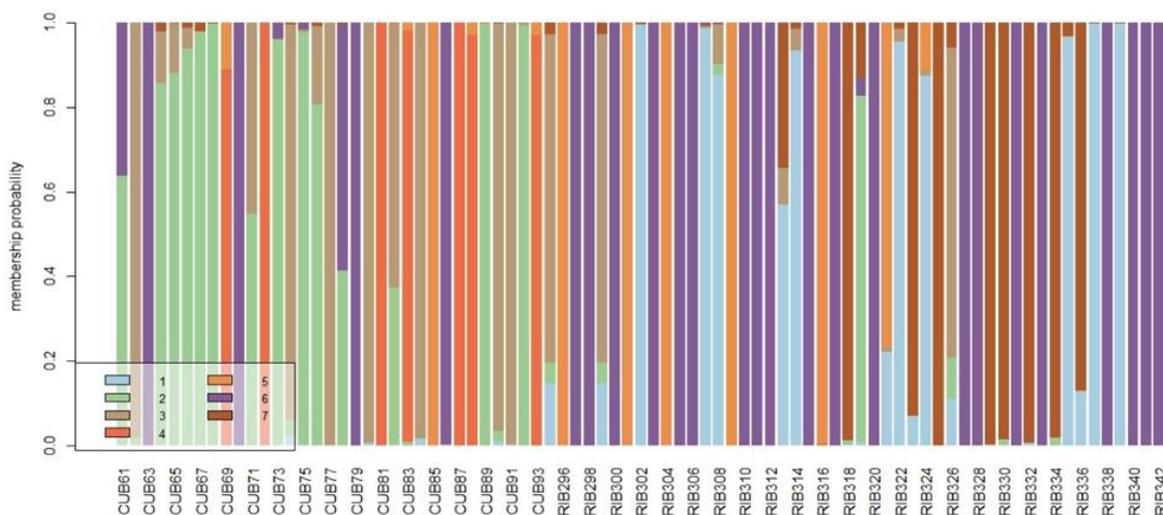
## RESULTADO E DISCUSSÃO

Foi gerado 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. Devido a pandemia do novo coronavírus ter afetado consideravelmente o objetivo do trabalho, foi possível selecionar 5 locus polimórficos para estudo populacional de Cubatão (n=34) e Registro (n=45). Os loci selecionados apresentaram alelos bem evidentes com inequívoca visualização do gel (Figura 4) e picos bem definidos (Figura 5) evidenciando a qualidade das genotipagens. A quantidade de dados perdidos variou entre 7,88% a 15%, com uma média de 12,1%, temos como objetivo reduzir o máximo possível de dados perdidos, para isso, as amostras que não amplificaram nessas análises irão passar por um novo processo de amplificação e genotipagem. O FIS médio por população variou de 0,2792 (CUB93) a 0.3853 (RIB342) (Tabela 4). A população amostrada em Cubatão apresentou o FIS positivo, exceto pelo locus CEP37 e o  $F_{ST}$  foi de 0.0743, esse índice mede o nível de diferenciação genética entre populações. Com os resultados da DAPC é possível corroborar o índice de  $F_{ST}$  discutido anteriormente, indicando que as populações estão moderadamente estruturadas. Futuras análises serão feitas após amplificação de todos os 10 locus propostos e serão reavaliados estatisticamente.

**Gráfico 3:** Análise de DAPC comparando os níveis de *cluster* entre os indivíduos estudados.



## CONCLUSÃO

No presente trabalho, utilizando um painel de 5 loci polimórficos para a espécie *C. parallelus*, foi possível prospectar a conectividade das populações amostradas, no entanto, é necessário ampliar o número de marcadores microssatélites para um melhor entendimento de como essas populações estão distribuídas. Com essa ferramenta molecular, associada as análises estatísticas, futuramente poderemos propor estratégias que favorecerão o manejo sustentável bem como caracterização desse 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

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.