

Comunicação

[Communication]

Identificação de *loci* microssatélites com potencial de amplificação na espécie de Peixe-Rei (*Odontesthes humensis*)

[Identification of microsatellite loci with amplification potential in “pejerrey” (*Odontesthes humensis*)]

R.A. Tavares¹, S.R.N. Piedras², M.D. Nunes¹, D.B. Almeida¹, C.G.A. Moreira³, J.M. Fernandes¹, S.F. Freitas², H.L.M. Moreira³, J.L.O.F. Pouey², N.J.L. Dionello²

¹Programa de pós-graduação – Universidade Federal de Pelotas – UFPel – Pelotas, RS

²Universidade Federal de Pelotas – UFPel – Pelotas, RS

³Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas – UFPel – Pelotas, RS

Com os avanços da tecnologia de sequenciamento de próxima geração, recursos genômicos estão se expandindo rapidamente, mesmo para as espécies de peixes não modelo. Entre as espécies de peixes aquícolas, muitas economicamente importantes estão sendo sequenciadas, tais como Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Lien *et al.*, 2011) e Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Guyon *et al.*, 2012). Esses recursos genéticos incluem etiquetas de sequências expressas (EST), mapas físicos, mapas de ligação genéticos e marcadores moleculares.

O marcador molecular do tipo microssatélite (SSRs-*Simple Sequence Repeats*) é uma ferramenta satisfatoriamente utilizada em estudos de estrutura de populações, conservação de espécies e gestão de recursos genéticos (Tavares *et al.*, 2011), por apresentar alto polimorfismo, codominância e herança simples. O desenvolvimento de marcadores microssatélites exigia um dispendioso esforço técnico, com procedimentos demorados e caros. Esses procedimentos incluem técnicas, como a criação de bibliotecas enriquecidas para *loci* SSRs, clonagem, hibridização para detectar clones positivos, isolamento de plasmídeo e sequenciamento (Beheregaray e Sunnucks, 2000; Barroso *et al.*, 2003; Koshimizu *et al.*, 2009). Entretanto avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA vêm proporcionando

métodos mais eficientes e de baixo custo para desenvolver marcadores moleculares para espécies que não possuem dados disponíveis, gerando os chamados *loci* potencialmente amplificáveis (PAL) (Castoe *et al.*, 2012; Lance *et al.*, 2013).

O peixe-rei é um representante da ordem atheriniformes, que inclui peixes encontrados em águas doces, marinhas, tropicais e temperadas de todo o mundo. O peixe-rei é um exemplar da subfamília atherinopsinae, que é composta por seis gêneros em dois grupos antitropicais: Atherinopsini na América do Norte (*Atherinops*, *Atherinopsis*, *Colpichtys*, *Leuresthes*) e Sargentini na América do Sul (*Basilichthys*, *Odontesthes*) (Dyer, 2006). *Odontesthes* é o gênero com a maioria das espécies, e mais amplamente distribuído, sendo encontrado em águas costeiras marinhas e lagoas de água doce da América do Sul. No Brasil, está presente principalmente nas lagoas Mirim e Mangueira, caracterizadas como um importante recurso pesqueiro, onde já foram descritas várias espécies, sendo *O. humensis* uma das mais comumente encontradas (Dyer, 2006).

O conhecimento sobre a variabilidade genética e os padrões de estrutura das populações são pré-requisitos para o desenvolvimento de estratégias para aquicultura, através de futuros programas de melhoramento genético. No entanto, estudo de variabilidade genética em *O. humensis* requer o

Recebido em 6 de março de 2014

Aceito em 13 de outubro de 2014

E-mail: rafaaldrighi@gmail.com

desenvolvimento de marcadores moleculares polimórficos.

Este estudo tem o objetivo de identificar *loci* potencialmente amplificáveis de microssatélites para a espécie de Peixe-Rei *O. humensis*, visando compreender a genética dessa espécie.

O material biológico utilizado neste estudo foi obtido de coletas na lagoa Mangueira (Santa Vitória do Palmar, Brasil – S 32°59'12" e O 52°42'42"). O DNA genômico total foi extraído a partir de nadadeira caudal (200-300 mg) de *O. humensis*, usando separação orgânica pelo protocolo modificado de sal (Barrero et al., 2008).

Uma única biblioteca genômica foi preparada a partir de 20ng de DNA, de acordo com o protocolo padrão do *kit* Illumina Nextera DNA Library (Illumina, San Diego, USA). O sequenciamento da biblioteca foi conduzido em um sequenciador GAIIx (Illumina, San Diego, USA) com leituras de 150 pares de bases. As leituras obtidas foram analisadas com o programa PAL_FINDER_v.0.02.03 (Castoe et al., 2012), identificando microssatélites com

dinucleotídeos (2mer), trinucleotídeos (3mer), tetranucleotídeos (4mer), pentanucleotídeos (5mer) e hexanucleotídeos (6mer). Essas repetições deveriam ser simples e de pelo menos 12 pb de comprimento para 2mer, 3mer e 4mers, e de pelo menos três repetições para 5mers ou 6mers. Após a identificação os *loci* SSRs foram agrupados para um subdiretório local do programa Primer3 v.2 (Lance et al., 2013) para o desenho dos *primers*.

Obtiveram-se 1.265.204 leituras, contendo aproximadamente 0,184 Gpb. O tamanho do genoma de *O. humensis* é desconhecido, embora genomas de peixes que foram pesquisados apresentam em média 1,250 Gbp (Katagiri et al., 2005; Jiang et al., 2013); sendo assim, a cobertura total foi de aproximadamente 15% do genoma.

Do total de leituras obtidas, 75.347 continham SSRs; no entanto, 34% apresentaram sequências flanqueantes bastante adequadas para desenho de *primers*, produzindo 25.806 PAL, sendo 21% de 2mers, 22% de 3mers, 37% de 4mers, 13% de 5mers e 7% de 6mers (Fig. 1).

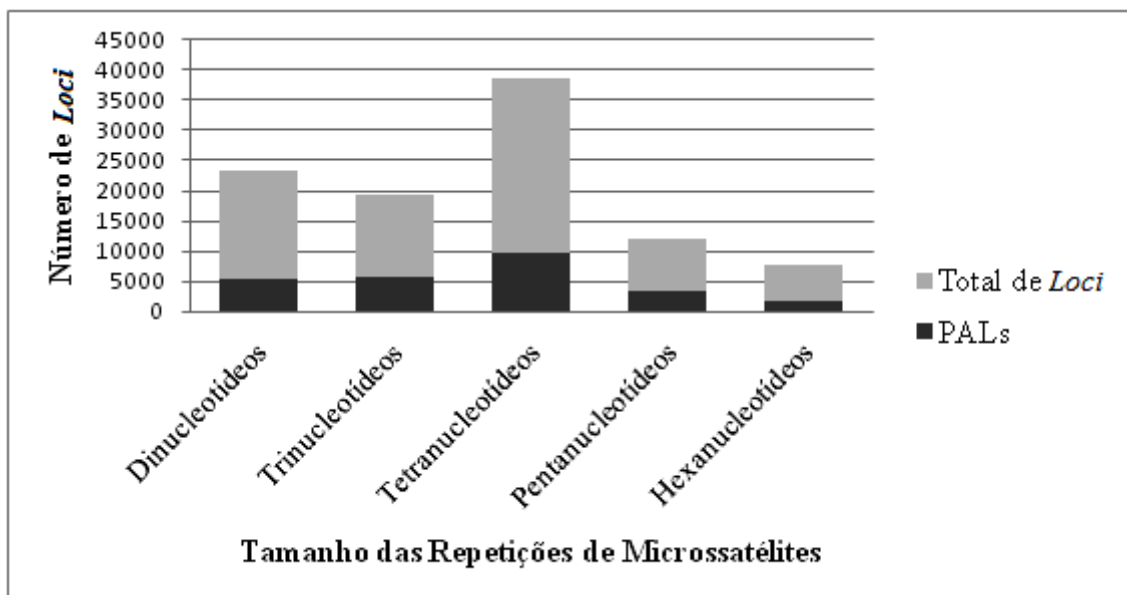


Figura 1. Comparação entre o número total de *loci* e o número de *loci* potencialmente amplificáveis (PALs), identificados por tamanho das repetições de microssatélites.

Em comparação com a espécie modelo “Zebrafish” (*Danio rerio*) (116.915 SSRs) (Rouchka, 2010), *O. humensis* apresenta

números de *loci* microssatélites inferiores, porém, para obtenção dos *loci* SSRs, em “Zebrafish”, foi utilizado o genoma total de

Identificação de loci...

aproximadamente 1,7 Gpb e para este estudo, um total de 0,185 Gpb.

Para Carpa Siamês (*Henichorynchus siamensis*), 65.954 sequências foram obtidas com a plataforma 454 GS-FLX (Roche, Branford, USA), sendo que 1.837 eram SSRs (Iranawati *et al.*, 2012). Lance *et al.* (2013) sequenciaram 0,5 Gpb do genoma de “Speckled Dace” (*Rhinichthys osculus*) e “Mountain Whitefish” (*Prosopium williamsoni*), apresentando em torno de 30.000 e 26.000 PALs, respectivamente. Essas divergências podem ser devidas às diferenças nas plataformas utilizadas e suas características peculiares, como cobertura do genoma, número de sequências e tamanho de leituras.

Beheregaray e Sunnucks (2000) identificaram 12 loci microssatélites para as espécies de peixe-rei *O. argentinensis* e *O. perugiae*, e Koshimizu *et al.* (2009) identificaram 17 loci SSRs para *O. bonariensis* e *O. hatcheri*. Ambos os estudos utilizaram a técnica de criação de bibliotecas enriquecidas para loci SSRs, clonagem, hibridização, isolamento e sequenciamento; comparando com os resultados obtidos neste estudo, a técnica utilizada por esses autores identifica um baixo número de SSRs, além de apresentar alto custo e elevado tempo de trabalho.

A repetição mais frequente encontrada foi o tetranucleotídeo (Fig. 1), sendo que Luo *et al.* (2012) obtiveram em “Tarim Schizothoracin” (*Schizothorax biddulphi*) e Lance *et al.* (2013) em “Speckled Dace” e “Mountain Whitefish” mais motivo dinucleotídeo.

Para tetranucleotídeos, o motivo de SSR mais frequente encontrado foi ATGG. Segundo Megléc *et al.* (2012), para Chordata em geral, o motivo mais comum encontrado para tetranucleotídeo foi AGAT e, em plantas AAAT, resultados distintos em ambos os estudos e grupos de espécies, o que sugere a vasta variação que pode ser encontrada dentre as repetições de loci microssatélites.

Do total de PAL, foram selecionados os “Best PALs” (bPALs), estes loci SSRs apresentam unidades longas de repetições (4mers, 5mers e 6mers) e trechos mais longos de repetições (mais de sete unidades de repetições observadas), que são mais propensos a serem variáveis nas populações de *O. humensis* (Castoe *et al.*, 2012; Lance *et al.*, 2013). O número de bPAL foi de 167 (Fig. 2), valores próximos aos encontrados por Castoe *et al.* (2012) em aves (100 - 450), e inferiores aos resultados de Lance *et al.* (2013) em peixes (4.635 - 6.631).

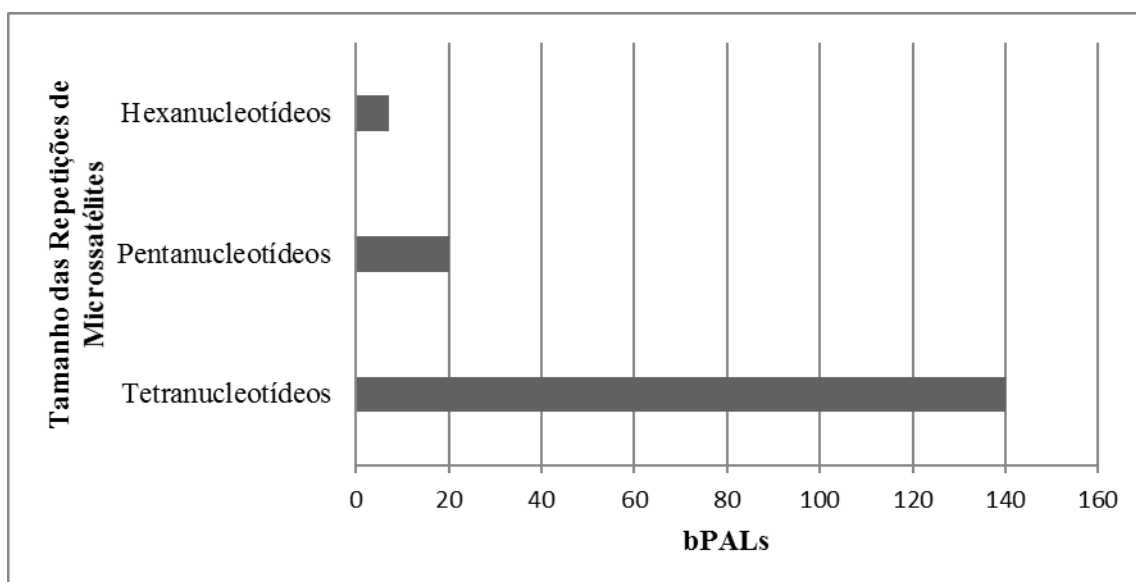


Figura 2. Loci de melhor qualidade (bPALs) identificados por tamanho das repetições de microssatélites.

Os resultados demonstram que, com uma pequena cobertura do genoma de *O. humensis*, foi possível a identificação de um grande número de *loci* potencialmente amplificáveis de microssatélites. Além disso, foi gerado um

número ótimo de bPAL, com potencial para análise de variabilidade genética dessa espécie.

Palavras-chave: peixe-rei, microssatélites, marcadores moleculares, PAL

ABSTRACT

In this work, 25,806 potentially amplifiable microsatellite loci (PAL) were identified in pejerrey, (Odontesthes humensis), with 21% of dinucleotide, 22% trinucleotide, 37% tetranucleotide, 13% pentanucleotide and 7% hexanucleotide. Of the total loci, 167 were classified as "Best PAL", more likely to be variables in populations. The results show that with a small coverage of the genome it was possible to identify a large number of microsatellite loci.

Keywords: pejerrey, microsatellite, molecular marker, PAL

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por fornecer recursos para o desenvolvimento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. *et al.* Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Cienc. Invest. Agraria*, v.35, p.65-74, 2008.

BARROSO, R.M.A.; HILSDORF, W.S.; MOREIRA, H.L.M. *et al.* Identification and characterization of microsatellites loci in Brycon opalinus (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Mol. Ecol. Notes*, v.3, p.297-298, 2003.

BEHEREGARAY, L.B.; SUNNUCKS, P. Microsatellite *loci* isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in other South American silverside fish. *Mol. Ecology*, v.9, p.629-630, 2000.

CASTOE, T.A.; POOLE, A.W.; KONING, A.P.J. *et al.* Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS ONE*, v.7, p.1-10, 2012.

DYER, B.S. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). *Biocell*, v.30, p.69-88, 2006.

GUYON, R.; RAKOTOMANGA, M.; AZZOUZI, N. *et al.* A high-resolution map of the Nile tilapia genome: a resource for studying cichlids and other percomorphs. *BMC Genomics*, v.13, p.1-17, 2012.

IRANAWATI, F.; JUNG, H.; CHAND, V. *et al.* Analysis of Genome Survey Sequences and SSR Marker Development for Siamese Mud Carp, *Henicorhynchus siamensis*, Using 454 Pyrosequencing. *Inter. J. Molecular Sci.*, n.13, p.10807-10827, 2012.

JIANG, Y.; GAO, X.; SHIKAI, L. *et al.* Whole genome comparative analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with four model fish species. *BMC Genomics*, v.14, p.1-11, 2013.

KATAGIRI, T.; KIDD, C.; TOMASINO, E. *et al.* A BAC-based physical map of the Nile tilapia genome. *BMC Genomics*, v.6, p.1-6, 2005.

KOSHIMIZU, E.; STRÜSSMANN, C.A.; TEJEDOR, E.D. *et al.* Development of polymorphic microsatellite *loci* for two Atherinopsid fishes, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) and Patagonian pejerrey (*O. hatcheri*). *Mol. Ecol. Resource*, v.9, p.1460-1466, 2009.

LANCE, S.L.; LOVE, C.N.; NUNZIATA, S.O. *et al.* 32 species validation of a new Illumina paired-end approach for the development of microsatellites. *PLoS ONE*, v.8, p.1-11, 2013.

LIEN, S.; GIDSKEHAUG, L.; MOEN, T. *et al.* A dense SNP-based linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals extended chromosome homeologies and striking differences in sex-specific recombination patterns. *BMC Genomics*, v.12, p.1-10, 2011.

Identificação de loci...

LUO, W.; NIE, Z.; ZHAN, F. *et al.* Rapid Development of Microsatellite Markers for the Endangered Fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) Using Next Generation Sequencing and Cross-Species Amplification. *International Journal of Molecular Science*, v.13, p.14946-14955, 2012.

MEGLÉCZ, E.; NÈVE, G.; BIFFIN, E.; GARDNER, M.G. Breakdown of Phylogenetic Signal: A Survey of Microsatellite Densities in 454 Shotgun Sequences from 154 Non Model Eukaryote Species. *PLoS ONE*, v.7, p.1-15, 2012.

ROUCHKA, E.C. Database of exact tandem repeats in the Zebrafish genome. *BMC Genomics*, v.11, p.1-11, 2010.

TAVARES, R.A.; NUNES, M.D.; ALMEIDA, D.B. *et al.* Utilization of microsatellite markers to form families of "pejerrey" *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1263-1267, 2011.