

A AMPLIFICAÇÃO CRUZADA E PADRONIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM *COLOSSOMA MACROPOMUM* (TAMBAQUI)

JACQUELINE SOUZA LIMA

MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES

LUCILEIDE VILELA RESENDE

FELIPE OLIVEIRA GOUVEIA

TALGE ATEX BONI

Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil; e-mail: jac.slima@gmail.com

ANA CHRISTINA SANCHES

Departamento de Zootecnia, Universidade Católica de Goiás, Campus II, Av. Engler s/n, Jardim Mariliza, Caixa Postal 86, 74605-010, Goiânia, Goiás, Brasil

RESUMO: A espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui), muito cultivada em piscicultura por todo o Brasil, já apresenta perda de variabilidade genética em alguns estoques. O objetivo deste trabalho foi testar para esta espécie a amplificação cruzada de 52 locos microsatélites desenvolvidos originalmente para outras espécies da ictiofauna. Para tanto, foram coletados indivíduos de tambaqui de piscicultura da região de Goiânia, Brasil, e a extração do DNA para amplificação foi feita a partir de tecido muscular. Os testes de amplificação cruzada foram realizados alterando as temperaturas de cada loco, buscando a padronização da amplificação. Dos 52 locos testados, 16 apresentaram resultados satisfatórios de amplificação cruzada, o que permitiu a definição dos genótipos. Esses resultados indicam que existe um grande potencial de transferibilidade de marcadores microsatélites entre espécies diferentes da ictiofauna. Esses marcadores podem ser usados em estudos genético-populacionais desta espécie nos programas de conservação, manejo e melhoramento deste recurso pesqueiro.

PALAVRAS-CHAVE: Marcadores genéticos, peixe, transferibilidade.

ABSTRACT: *Colossoma macropomum* (tambaqui) is a widely grown species in fish farms throughout Brazil, and is already showing genetic variability loss in some stocks. This study aimed at testing the cross-amplification in this species based on 52 microsatellite loci originally developed for other fish species. Tambaqui individuals were collected in fish farms in Goiânia, Brazil, and the DNA for amplification was extracted from muscle tissue. The cross-amplification tests were performed changing the temperature of each locus, searching for amplification standardization. Among the 52 tested loci, 16 showed satisfactory cross-amplification results, which allowed the definition of genotypes. These results indicate the existence of a great potential for microsatellite markers transferability among different fish species. These markers can be used in population-genetic studies of this species in conservation programs, management, and improvement of this natural resource.

KEY WORDS: Genetic markers, fish, transferability.

INTRODUÇÃO

A espécie *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é uma das maiores da família Characidae (Araújo Lima & Gouding, 1998), podendo atingir até 30 kg na natureza. É a principal espécie comercial da Amazônia, com produção de 25.000 t em 2005 (IBAMA, 2005). Esse peixe é

popularmente conhecido como tambaqui e encontra-se sob risco de sobexploração devido ao seu alto valor comercial (Villacorta-Correa & Saint-Paul, 1999). Segundo Magalhães et al. (2002), populações naturais de peixes apresentam maior diversidade genética que as artificiais, o que representa ausência de acompanhamento genético na criação desses animais.

Os marcadores microssatélites apresentam padrão de herança co-dominante e têm sido utilizados para responder questões acerca de tamanho efetivo da população, estrutura genética, taxa de migração, sistemas de acasalamento e conservação de recursos genéticos (Brondani et al., 2003; Moretzohn, 2006; Simon et al., 1999). A principal desvantagem desses marcadores é a necessidade do conhecimento prévio do genoma para o desenvolvimento de *primers* espécie-específicos. Essa fase envolve várias etapas, incluindo a construção de bibliotecas genômicas (Grattapaglia et al., 2008), o que torna o isolamento dessas regiões microssatélites trabalhoso e de alto custo (Gupta & Varshney, 2000), limitando o número de espécies a serem estudadas (Gao et al., 2005).

Alguns estudos demonstraram que existe a possibilidade de amplificação cruzada dos *primers* de regiões microssatélites originalmente desenvolvidos para outra espécie, possibilitando sua utilização em espécies próximas do ponto de vista evolutivo, sem custos adicionais para o desenvolvimento do *primer* (Katzir et al., 1996; Matsuoka et al., 2002; Plieske & Struss, 2001; Saha et al., 2006).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a amplificação cruzada de marcadores de regiões microssatélites para *C. macropomum* a partir de *primers* desenvolvidos originalmente para outras espécies de peixes da ictiofauna neotropical.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em piscicultura da região de Goiânia, Goiás, totalizando 45 alevinos. A extração do DNA total foi feita a partir de, aproximadamente, 20 mg de tecido muscular, utilizando o Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). O DNA de cada um dos indivíduos foi quantificado por comparação com Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™) em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 mg.L⁻¹). A eletroforese horizontal foi conduzida com tampão TBE 1X (Tris-base 8,9 mM.L⁻¹, ácido bórico 8,8 mM.L⁻¹ e EDTA 10 mM.L⁻¹) por 1 h a 100 V. A imagem foi capturada pelo sistema EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5) e armazenada para posterior análise. Depois de quantificado, o DNA de cada indivíduo foi diluído para a concentração final de aproximadamente 5 ng.µL⁻¹ para ser usado nas reações de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para os testes de amplificação cruzada dos *primers*, foram utilizados 52 locos de regiões microssatélites (Figura 1) desenvolvidos originalmente para sete espécies de peixes: *Prochilodus argenteus* (Par), *Prochilodus lineatus* (Pl), *Prochilodus costatus* (Pcos), *Astyanax fasciatus* (Ast), *Leporinus macrocephalus* (Lmac), *Poecilia reticulata* (Pre) e *Piaractus mesopotamicus* (Pme) (Barbosa et al., 2006; Calcagnotto et al.,

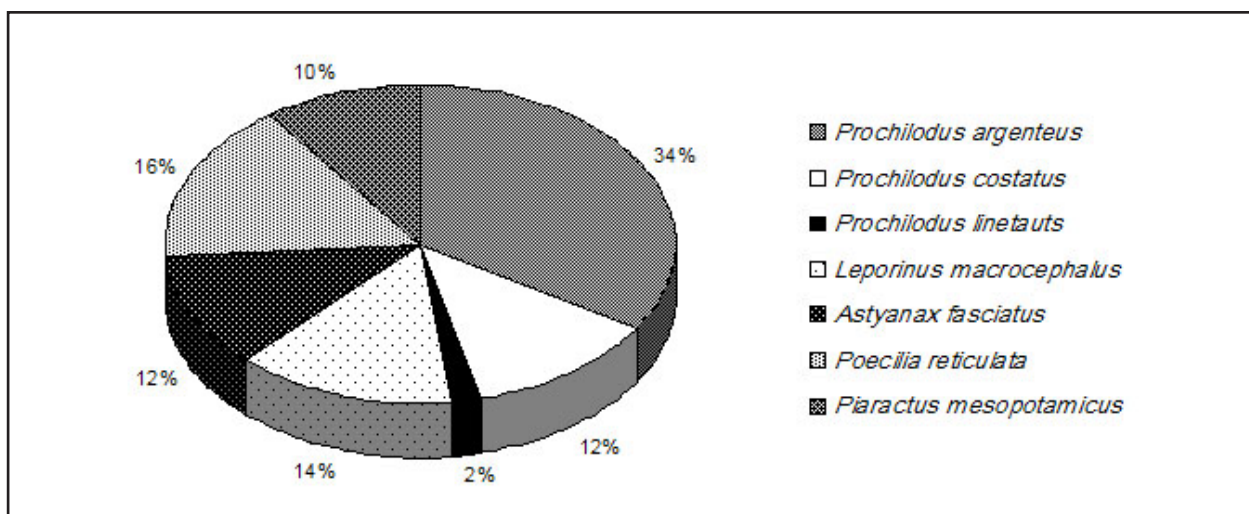


Figura 1 – Relação do número de locos microssatélites e as respectivas espécies da ictiofauna para as quais eles foram desenvolvidos.

2001; Carvalho-Costa et al., 2006; Hatanaka et al., 2006; Morelli et al., 2007; Paterson et al., 2005; Strecker, 2003). Os testes com cada um dos 52 *primers* foram feitos com amostras de DNA de três indivíduos de *C. macropomum*.

As reações de PCR foram preparadas, para cada indivíduo, utilizando-se um par de *primers*. Em cada reação foram adicionados 25 ng do DNA e 10 µL de uma mistura contendo H₂O Milli-Q autoclavada, tampão 10 x da enzima, 8 µM de *primer*, 13 µg de BSA (Bovine Serum Albumin), 25 mM de MgCl₂, 3,25 mM de dNTP's e 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase, totalizando volume final de 15 µL.

O DNA de cada indivíduo foi amplificado via PCR, em termociclador, utilizando-se o programa cujos passos estão descritos a seguir: 1) desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 min; 2) desnaturação do DNA a 94°C por

1 min; 3) anelamento dos *primers* a X°C por 1 min; 4) extensão da molécula pela enzima Taq-DNA-polimerase a 72°C por 1 min; 5) 30 ciclos seguindo dos passos 2 ao 4; 6) passo final de extensão por 7 min a 72°C, finalizando os produtos amplificados.

Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese vertical em gel desnaturante de acrilamida 6% em cuba de sequenciamento, utilizando um marcador de peso molecular 10 pb (pares de bases) (Invitrogen™). Para visualização dos alelos, os géis foram submetidos a coloração com nitrato de prata, seguindo a metodologia descrita por Creste et al. (2001). O ajuste da temperatura de anelamento (X°C) dos locos foi feito aumentando-a ou diminuindo-a para cada loco (Figura 2), até que a visualização das bandas apresentasse a melhor resolução.

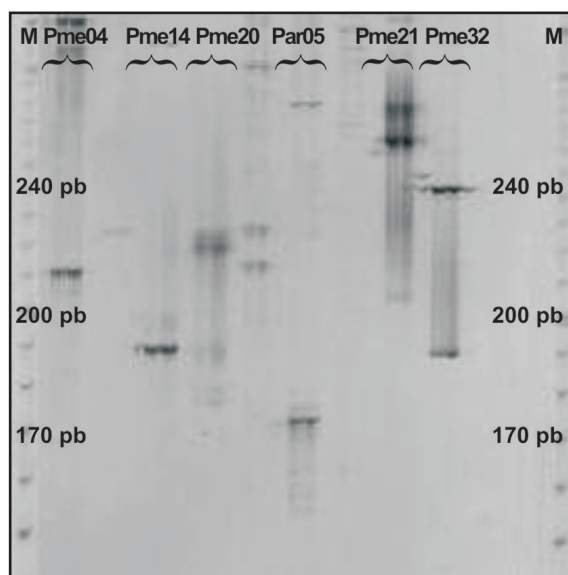


Figura 2 – Perfil eletroforético em acrilamida 6% dos testes de amplificação cruzada dos pares de *primers* Pme04, Pme14, Pme20, Par05, Pme21 e Pme32 com três indivíduos de *Colossoma macropomum*. As colunas "M" indicam o marcador de peso molecular (10 base pair ladder, Invitrogen).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 52 locos testados, 16 apresentaram resultados satisfatórios de amplificação cruzada com *C. macropomum* (Tabela 1). Todos os locos permitiram a fácil obtenção de seus genótipos em gel de acrilamida, com alelos bem definidos e segregação mendeliana simples. As temperaturas de anelamento de todos os locos transferidos variaram entre 54°C e 65°C

e a variação da amplitude dos alelos, considerando todos os locos, foi de 118 pb a 278 pb (Tabela 2).

Dos sete locos testados desenvolvidos para *P. mesopotamicus*, cinco (71%) foram transferidos com sucesso para *C. macropomum* (Figura 3). Esse alto valor de transferibilidade pode ser justificado pela maior proximidade evolutiva entre as duas espécies que pertencem a grupos taxonômicos próximos.

Tabela 1 – Relação dos locos transferidos para *Colossoma macropomum*, respectivas espécies para as quais foram desenvolvidos originalmente, motivo de repetição, sequência e referências.

Loco	Espécie	Motivo de repetição	Sequência (5'-3')	Referência
Par3	<i>Prochilodus argenteus</i>	(GT) ₄ GC(GA) ₄ ·(CCT) ₂ (CT) ₂	F: ATGGGTTCAGCCTTTGTGAC R: CTGTCATTGGAAAGCAGATGC	Hatanaka et al. (2006)
Par5	<i>Prochilodus argenteus</i>	(AT) ₃ ·(AT) ₃ ·(GT) ₂	F: GTGCAAGACCACCTCAGAGC R: ATGGAGTGGACACAGTGAGTG	Hatanaka et al. (2006)
Par10	<i>Prochilodus argenteus</i>	(TC) ₁₁	F: TGATACGGTCAGCCTTTGCAG R: CTCGTGGCCAGATGCTAGA	Barbosa et al. (2006)
Par26	<i>Prochilodus argenteus</i>	(GA) ₃ (CAGA) ₉	F: AGGTATGCAATGTTCACTC R: CTCCTCIATCTGCCCTTCTTC	Barbosa et al. (2006)
Par31	<i>Prochilodus argenteus</i>	(GAGT) ₄ (GA) ₅ (GGGA) ₃ (GA) ₄	F: GAGATGTTCCCTACCTTTTGTG R: TAGCCTCTCATTGTCTAGTIG	Barbosa et al. (2006)
Par35	<i>Prochilodus argenteus</i>	(GA) ₃ (GTGA) ₆ (GAAA) ₂ (GA) ₆	F: AGCCAGAGGAGACCTGAACA R: CCTCCCTCCTCCAGATCITT	Barbosa et al. (2006)
Par54	<i>Prochilodus argenteus</i>	(GT) ₄₄	F: GCTGTTGTTGTAGAGTGAAG R: AGAATCTGTTCTCACCAAG	Barbosa et al. (2006)
Pcos14	<i>Prochilodus argenteus</i>	(TC) ₄₉	F: CGTGAATGTGCTTTATATGC R: AATGCCAATTTCTGATTAAGG	Carvalho-Costa et al. (2006)

Continua

Continuação

Tabela 1 – Relação dos locos transferidos para *Colossoma macropomum*, respectivas espécies para as quais foram desenvolvidos originalmente, motivo de repetição, sequência e referências.

Loco	Espécie	Motivo de repetição	Sequência (5'-3')	Referência
Pcos18	<i>Prochilodus costatus</i>	(GT) ₂₀	F: TCTCTTCTCACACACCTTCC R: TGATTACCAGCAACAGTTTG	Carvalho-Costa et al. (2006)
Lmac6	<i>Leporinus macrocephalus</i>	(CA) ₁₇	F: CTCTACTTCACCTTTTACAGCAG R: CCCGAGCCCGCTCACACTTC	Morelli et al. (2007)
Ast1	<i>Astyanax fasciatus</i>	(GT) ₁₅ TT(GT) ₃ (G) ₅ (TG) ₄	F: CCCAGAAAGCCCTCATCGATAACA R: ATCGGACAAAGCAGAGTGCATTTA	Strecker (2003)
Pme4	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	(GT) ₁₄	F: CATGCTGCTGCAGATTAGAC R: CGCTTGCAATTTAACGCAGT	Calcagnotto et al. (2001)
Pme14	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	(CTG) ₇	F: ACCGTTATGCCCTACCCCTTC R: GCGTCTAGACAGAACTCATGG	Calcagnotto et al. (2001)
Pme20	<i>P. mesopotamicus</i>	(GT) ₁₅	F: CAGAGCITTGAGGAAACACGA R: CCCATCAGTTACGGGTCAAT	Calcagnotto et al. (2001)
Pme21	<i>P. mesopotamicus</i>	(GT) ₁₅	F: ATAATGCTGGGTCAGTGGT R: GGACAGCTGGTCTCAAGCTC	Calcagnotto et al. (2001)
Pme14	<i>P. mesopotamicus</i>	(CTG) ₇	F: ACCGTTATGCCCTACCCCTTC R: GCGTCTAGACAGAACTCATGG	Calcagnotto et al. (2001)

F = Forward: sentido 5' → 3';

R = Reverse: sentido 3' → 5'.

Tabela 2 – Relação dos locos transferidos para *Colossoma macropomum* e suas respectivas temperaturas de anelamento padronizadas (Ta °C), número de alelos (NA) e amplitude de variação do tamanho do alelo (AVA) em pares de bases (pb).

Loco	Ta (°C)	NA	AVA (pb)
Par3	58	1	260
Par5	65	1	172
Par10	56	1	220
Par26	58	2	268-278
Par31	58	3	225-230
Par35	62	1	210
Par54	56	1	166
Pcos14	60	2	120-126
Pcos18	60	2	182-200
Lmac6	54	3	118-130
Ast1	60	1	118
Pme4	56	3	190-212
Pme14	63	3	190-202
Pme20	63	3	218-222
Pme21	65	2	260-275
Pme32	65	2	240-250

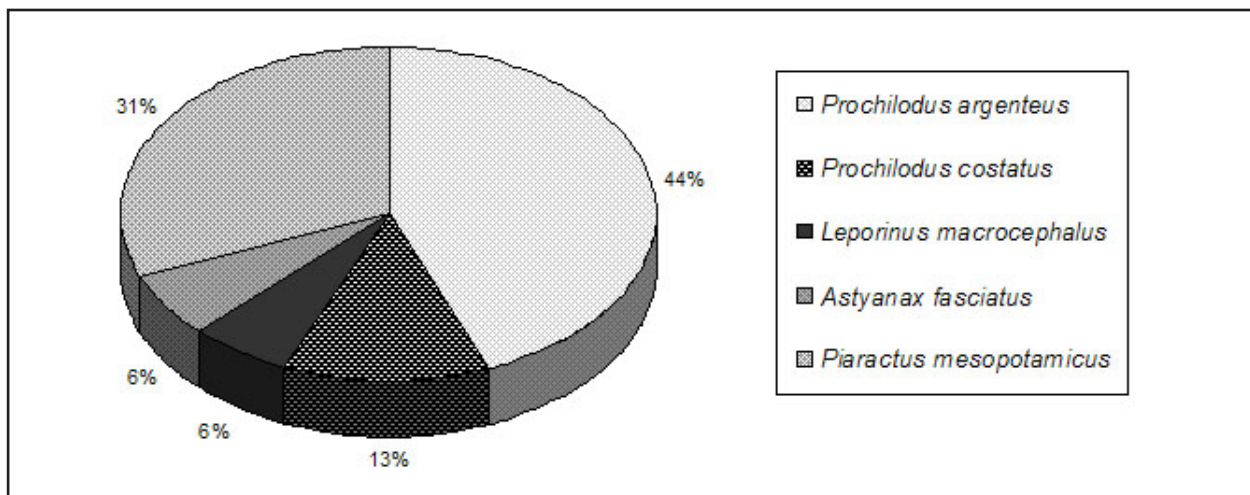


Figura 3 – Relação com o número de locos microsatélites transferidos com sucesso para *Colossoma macropomum* e as respectivas espécies cujos primers foram desenvolvidos.

Além disso, ambas possuem o mesmo número de cromossomos, o que permite a formação de híbridos viáveis (Saracura & Castagnolli 1990). Dos primers testados para *P. argenteus*, *P. costatus*, *L. macrocephalus* e *A. fasciatus*, 41%, 33%, 14% e 16%, respectivamente, foram transferidos com sucesso para *C. macropomum*. Para cada um dos locos transferidos com sucesso, foi preparada uma escada alé-

lica para a confirmação do tamanho de cada alelo, conforme ilustrado na Figura 4.

Conforme Calcagnotto & Toledo-Filho (2000), atualmente já se observa perda da variabilidade genética em algumas fazendas de piscicultura que produzem *C. macropomum*, o que indica ausência de monitoramento genético na criação dessa espécie, podendo levar à endogamia, que pode ser prejudicial

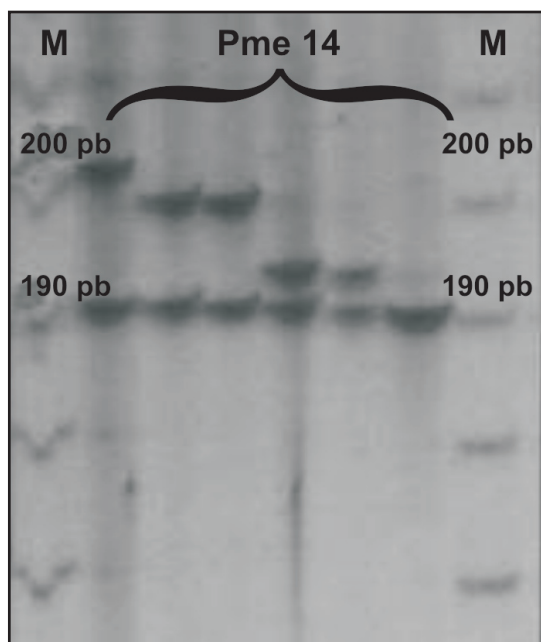


Figura 4 – Perfil eletroforético em gel de acrilamida 6% corado com nitrato de prata de seis indivíduos de *Colossoma macropomum* contendo escada alélica do primer Pme14. As colunas “M” indicam o marcador de peso molecular (10 base pair ladder, Invitrogen).

para algumas espécies. Dessa forma, o acompanhamento regular da composição genética dos estoques pesqueiros torna-se necessário e os marcadores microssatélites podem ser poderosa ferramenta para gerar essas informações. Assim, os resultados do presente trabalho disponibilizam locos microssatélites robustos que podem auxiliar futuros estudos genético-populacionais desta espécie.

Carreras-Carbonell et al. (2007) analisaram a amplificação cruzada de 12 locos desenvolvidos para a espécie *Serranus cabrilla* aplicada a outras oito espécies da família Serranidae. Houve sucesso de transferibilidade para todas as espécies avaliadas e o número de locos transferidos, por espécie, variou entre 12 e cinco. Resultados similares foram encontrados por Liao et al. (2007), com espécies de peixes da subfamília Gobioninae, evidenciando que existe grande potencial de transferibilidade de marcadores microssatélites entre diversas espécies da ictiofauna.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/MCT), a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade

Católica de Goiás, o Systema Naturae Consultoria Ambiental Ltda. e o CNPq pelas bolsas concedidas a Telles M. P. C. e Boni T. A.

REFERÊNCIAS

- Araújo, L. C. & M. Gouding.** 1998. Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mimirauá/CNPq, Brasília, DF, 186 p.
- Barbosa, A. C. D. R., T. C. Corrêa, F. Galzerani, P. M. Galetti-Jr. & T. Hatakana.** 2006. Thirteen polymorphic microsatellite loci in Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). Mol. Ecol. Notes 6: 936-938.
- Brondani, C., P. H. N. Rangel, T. C. O. Borba & R. P. V. Brondani.** 2003. Transferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza* species. Hereditas 138: 187-192.
- Calcagnotto, D., M. Russello & R. DeSalle.** 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. Mol. Ecol. Notes 1: 245-247.

- Calcagnotto, D. & S. A. Toledo-Filho.** 2000. Loss of genetic variability at the transferin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genet. Mol. Biol.* 23: 127-130.
- Carreras-Carbonell, J., E. MacPherson & M. Pascual.** 2007. Utility of pairwise mtDNA genetic distances for predicting cross species microsatellite amplification and polymorphism success in fishes. *Conserv. Genet.* 9: 181-190.
- Carvalho-Costa, L. F., T. Hatakana & P. M. Galetti-Jr.** 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Mol. Ecol. Notes* 6: 818-819.
- Creste, S., A. Tulmann Neto & A. Figueira.** 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 299-306.
- Gao, L. Z., C. H. Zhang & J. Z. Jia.** 2005. Cross-species transferability of rice microsatellites in its wild relatives and the potential for conservation genetic studies. *Genet. Resour. Crop Evol.* 52: 931-940.
- Grattapaglia, D., R. P. V. Brondani & C. Brondani.** 2008. Manual prático para desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas. Embrapa, Brasília, DF.
- Gupta, P. K. & R. K. Varshney.** 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Hatanaka, T., F. Henrique-Silva & P. M. Galetti-Jr.** 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genética* 126: 153-159.
- IBAMA.** Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. 2005. Produção brasileira de aquicultura continental. Brasília, DF.
- Katzir, N., Y. Danin-Poleg, G. Tzuri, Z. Karchi, U. Lavi & P. B. Cregan.** 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1282-1290.
- Liao, X., D. Wang, X. Yu, W. Li, L. Cheng, J. Wang & J. Tong.** 2007. Characterization of novel microsatellite loci in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) and amplification in closely related species in Gobioninae. *Conserv. Genet.* 8: 1003-1007.
- Magalhães, A. L. B., R. F. Andrade, T. F. Raton & M. F. G. Brito.** 2002. Ocorrência da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Pisces: Salmonidae) no alto rio Aiuruóca e tributários, bacia do rio Grande, Minas Gerais, Brasil. *Bol. Museu Biol. Mello Leitão* 14: 35-42.
- Matsuoka, Y., S. E. Mitchell & S. Kresovich, M. Goodman & J. Doebley.** 2002. Microsatellites in Zea-variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 104: 436-450.
- Morelli, K. A., E. Revaldaves, C. Oliveira & F. Foresti.** 2007. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes* 7: 32-34.
- Moretzohn, M. C.** 2006. Desenvolvimento e mapeamento de marcadores microssatélites e identificação de QTLs ligados à produtividade e à resistência à mancha preta em *Arachis* sp. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Paterson, I. G., E. Crispo, M. T. Kinnison, A. P. Hendry & P. Bentzen.** 2005. Characterization of tetranucleotide microsatellite markers in guppy (*Poecilia reticulata*). *Mol. Ecol. Notes* 5: 269-271.
- Plieske, J. & D. Struss.** 2001. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica* L. development in *Brassica napus* and abundance in Brassicaceae species. *Theor. Appl. Genet.* 102: 689-694.
- Saha, C. M., J. D. Cooper, M. A. Rouf Mian, K. Chekhovskiy & G. D. May Theor.** 2006. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. *Appl. Genet.* 113: 1449-1458.

- Saracura, V. F. & N. Casagnolli.** 1990. Comparação do desempenho entre os alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e híbridos de pacu e tambaqui (*Colossoma macropomum*). Ciênc. Zootéc. 5: 17-19.
- Simon, J. C., S. Baumann, P. Sunnucks, P. D. N. Hebert, J. S. Pierre Gallic & C. A. Dedryver.** 1999. Reproductive mode and population genetic structure of the cereal aphid *Sitobion avenae* studied using phenotypic and microsatellite markers. Mol. Ecol. 8: 531-545.
- Strecker, U.** 2003. Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish *Astyanax fasciatus*. Mol. Ecol. Notes 3: 150-151.
- Villacorta-Correa, M. A. & U. Saint-Paul.** 1999. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: characidae) in central Amazon, Brazil. Rev. Bras. Biol. 59: 637-652.

Data de recebimento: 11/II/2009

Data de aceite: 18/VII/2009