

IDENTIFICAÇÃO DE *LOC*/MICROSSATÉLITES NO DNA MITOCONDRIAL DE TILÁPIAS

ALMEIDA, Diones Bender¹²; COSTA, Marco André Paldês da¹²; **BASSINI, Liane Ney**²; **MOREIRA, Carla Giovani Ávila**²; **DODE, Maria Eduarda Bicca**²; **MOREIRA, Heden Luiz Marques**³

¹Aluno de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPel. Endereço para correspondência: diones_almeida@yahoo.com.br

²Laboratório de Engenharia Genética Animal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, S/Nº.; 96010-900 - Pelotas, RS

³Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética /UFPel, chefe do laboratório LEGA/CENBIOT/UFPel, e orientador.

1 INTRODUÇÃO

O genoma mitocondrial, pelas suas características e particularidades, tem se mostrado uma importante ferramenta na detecção de variabilidade genética em peixes, além de permitirem inferências sobre as relações evolutivas entre populações que são de grande utilidade para estudos filogeográficos.

Entre as classes de marcadores moleculares disponíveis atualmente, os marcadores microssatélites (SSR) destacam-se por combinarem uma série de atributos, que os tornam uma classe altamente informativa e de fácil utilização para a análise genética. Somado a isso, apresenta também um alto nível de polimorfismo em seus locos, o que proporciona sua utilização em diversos propósitos de estudo populacional, permitindo analisar espécies proximoamente relacionadas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A identificação de SSRs em regiões transcritas pode ser feita através de ferramentas de bioinformática para uma busca de dados em bancos de ESTs disponíveis para análise. Na literatura recente, está descrito um grande número de relatos sobre a utilização desse tipo de marcador e para as mais diversas aplicações. Apesar da disponibilidade de um grande volume de seqüências genômicas em bancos de dados, a maioria das espécies de animais carece desse tipo de informação. O objetivo desse trabalho foi reunir e descrever, de modo acessível e prático, *loci* SSR do DNA mitocondrial de tilápias.

2 METODOLOGIA

Tomando como base a abordagem *in silico* para identificar *loci* SSRs, as seqüências completas do DNA mitocondrial de cinco espécies do gênero *Oreochromis* (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis aureus*, *Oreochromis sp.KM* e *Oreochromis sp. red tilápia*) foram obtidas no *website* do *EMBL Nucleotide Sequence Database* (Nº de Acesso: GU238433, AY597335, GU370125, AP009126 e HM067614, respectivamente), em abril de 2010.

As seqüências repetitivas foram caracterizadas pelo programa SSRLocator (Maia et al., 2008) programado para localizar trechos com pelo menos 12 nucleotídeos de comprimento, sendo: monômeros com 12 repetições, dímeros com 6 repetições, trímeros com 4 repetições, tetrâmeros com 3 repetições, pentâmero com 3 repetições, e hexâmeros com 2 repetições. Esse programa também pode classificar esses trechos repetitivos em: *loci* perfeitos (distantes por intervalo igual ou

superior a 100 nucleotídeos), *loci* compostos (dois a cinco microssatélites separados por intervalos superiores a 5 nucleotídeos e inferiores a 100 nucleotídeos) e *loci* imperfeitos (interrompidos por até 5 nucleotídeos) (Varshney et al., 2002). Os resultados foram armazenados em arquivos de formato texto simples e arquivos fasta para posterior interpretação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela 1 apresenta os *loci* microssatélites identificados, com suas respectivas posições iniciais e notações no DNA mitocondrial de ambas as espécies. Dentre as 5 espécies de tilápias, a que apresentou o maior número de *loci* (11) foi a *Oreochromis sp.KM* e a que apresentou o menor número de *loci* (7) foi a *Oreochromis mossambicus*.

Nessas espécies foi observado que em algumas repetições, uma única alteração de base, foi suficiente para provocar a produção de proteínas ligeiramente diferentes, como foi o caso na *O. sp* em que a repetição (CTC)₄ codifica para o gene *COX1* e na *O. sp.KM* a repetição (CTT)₄ codifica para o gene *ND5*. Esse tipo de alteração pode ser devido à alta taxa evolutiva presente nessas regiões de DNA mitocondriais, chegando a ser superior a 10 vezes do que um gene de cópia única nuclear. Um fator evolutivo que pode ter ocorrido seria uma mutação pontual, em que afeta uma única posição no gene causando mudanças na proteína por ela codificada. Esse tipo de mutação é gerada muitas vezes por erros na duplicação do DNA na hora de transcrever o DNA para RNA.

Isso torna a molécula de DNA mitocondrial muito atrativa para estudos populacionais e evolutivos pelo fato de apresentar herança citoplasmática, de modo que ela não segue os padrões mendelianos de segregação e não sofre recombinação (Arias & Infante-Malachias, 2001).

Essas variações no DNA mitocondrial de diferentes espécies de peixes tem sido identificada em vários estudos populacionais (Karaiskou et al., 2003), porém não orientadas por sequências repetitivas. Portanto, a disponibilidade e abundância de sequências de genes mitocondriais no *GenBank* é um aspecto crucial para uma identificação mais rápida e precisa de *loci* microssatélites.

Tabela 1 - Descrição de *loci* microssatélite (≥ 12 nt) identificados no DNA mitocondrial de cinco espécies de tilápia (*O. niloticus*, *O. mossambicus*, *O. aureus*, *O. sp* e *O. sp.KM*)

<i>O. niloticus</i>	PI	<i>O. mossambicus</i>	PI	<i>O. aureus</i>	PI	<i>O. sp</i>	PI	<i>O. sp.KM</i>	PI	Not
(AAAAGA)2	1975	(AAAAGA)2	1969	(AAAAGA)2	1967	(AAAAGA)2	1971	(AAAAGA)2	1971	rRNA 16S
(CCTCAC)2	2714			(CCTCAC)2	2706					rRNA 16S
								(CCTAAT)2	2890	ND1
								(TCCTCT)2	3078	ND1
								(CCCTCG)2	3762	ND1
								(CCCTAG)2	4336	ND2
				(CCCTTG)2	4332	(CCCTTG)2	4336			ND2
		(GCCCTC)2	4343							ND2
				(CCTC)3	5782					COX1
				(TCC)4	5796					COX1
								(TTC)4	5798	COX1
(TTCTCC)2	5803	(TTCTCC)2	5807			(CTC)4	5802			COX1
								(TATTCT)2	6204	COX1
(TTCTCC)2	8975	(GAAATC)2	7413			(GAAATC)2	7400	(GAAATC)2	7398	COX2
(AGTTAC)2	9255	(TTCTCC)2	8976							COX3
		(AGTTAC)2	9256			(AGTTAC)2	9252	(AGTTAC)2	9250	COX3
(CCTTCC)2	9907			(CCTTCC)2	9900	(CTTCCC)2	9905			ND3
				(TGTTCT)2	9963					ND3
		(TCC)4	14788					(CTT)4	13777	ND5
(TCTTCC)2	15496			(TCTTCC)2	15489	(TCC)4	14770			CYTb
						(TCTTCC)2	15493			CYTb
(AATTTT)2	16376							(ACCCCT)2	15649	tRNA ^{Pro}
										tRNA ^{Thr}
						(AAATTT)2	16377			tRNA ^{Pro}

PI: Posição inicial; Not: Notação do gene; rRNA 16S: RNA ribossômico subunidade 16S; ND1: NADH desidrogenase subunidade 1; ND2: NADH desidrogenase subunidade 2; COX1: citocromo c oxidase subunidade 1; COX2: citocromo c oxidase subunidade 2; COX3: citocromo c oxidase subunidade 3; ND3: NADH desidrogenase subunidade 3; ND5: NADH desidrogenase subunidade 5; CYTB: citocromo B; tRNA-Pro: RNA transportador para prolina; tRNA-Thr: RNA transportador para treonina.

4 CONCLUSÕES

Foram identificados no DNA mitocondrial do gênero *Oreochromis*, diversos *loci* microssatélites passíveis de serem utilizados em programas de melhoramento genético.

5 AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

6 REFERÊNCIAS

Arias, M. C; Infante-Malachias, M. E. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA - In: MATIOLI, S. R. (Ed.). Biologia molecular e evolução. Ribeirão Preto: Holos. p. 143-152, 2001.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genética. Embrapa. 2.ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, Brasil, 1998.

Karaiskou, N.; Apostolidis, A.; Triantafyllidis, A.; Kouvatsi, A.; Triantaphyllidis, C. Genetic identification and phylogeny of three species of the genus *Trachurus* based on mtDNA analysis. *Marine Biotechnology* 5:493–504, 2003.

Maia, L. C.; Palmieri, D. A.; de Souza, V. Q.; Kopp, M. M.; de Carvalho, F. I.; Costa de Oliveira, A. SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation. *International Journal of Plant Genomics*, p. 412-696, 2008.

Varshney, R.K.; Thiel, T.; Stein, N.; Langridge, P.; Graner, A. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7: 537-46, 2002.