

# Isolamento e caracterização de regiões microssatélites em *Hypostomus gymnorhyncus*

Resende, LV<sup>1,3</sup>; Brondani, R<sup>2</sup>; Melo, DB<sup>1</sup>; Telles, MPC<sup>1</sup>; Borba, TCO<sup>2</sup>; Soares, TN<sup>1</sup>; Silva-Jr., NJ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética & Biodiversidade, Universidade Católica de Goiás

<sup>2</sup>Embrapa Arroz e Feijão

<sup>3</sup>Systema Naturae - Consultoria Ambiental LTDA  
mpctelles@pq.cnpq.br

**Palavras-chave:** ictiofauna, microssatélites, peixe, transferibilidade, PCR

As regiões microssatélites são multi-alélicas, codominantes e evoluem através de processos mutacionais decorrentes dos escorregões da DNA polimerase (*slippage*) ou de *crossing-over* desigual. Apesar de suas altas taxas evolutivas, os microssatélites são conservativos em suas regiões flangeadoras e podem persistir por um longo período sem modificações. Os marcadores microssatélites constituem a classe de marcadores moleculares mais polimórficos conhecidas atualmente. As diversas aplicações, tais como mapeamento genético, investigação forense, análise populacional, estudos ecológicos, paternidade e biologia da conservação, dependem, portanto do desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para estas regiões genômicas serem amplificadas através da PCR. Neste contexto, o trabalho tem por objetivo desenvolver *primers* para *Hypostomus gymnorhyncus*, além de testar a amplificação cruzada de 46 iniciadores desenvolvidos originalmente para outras espécies da ictiofauna. Para os testes de amplificação desses *primers* e da amplificação cruzada dos outros 46 *primers*, foram montadas reações de PCR utilizando três indivíduos, com uma amplitude de variação na temperatura de anelamento do *primers* entre 45 a 68°C. Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 6% e visualizados por coloração com nitrato de prata. Para o desenvolvimento dos *primers* o DNA foi extraído, a partir de tecido muscular, de um único indivíduo. Esse DNA primeiramente sofreu fragmentação com a utilização do sonicador, para a seleção de fragmentos de tamanho entre 1 a 2Kb, depois foi feito o tratamento das extremidades dos fragmentos de DNA, seguida da ligação dos fragmentos de DNA com o vetor, transformação em células competentes, de acordo com as especificações do *pMOSBlue Blunt Ended Cloning Kit*, fornecido pela Amersham Biosciences. Posteriormente foram selecionados as colônias positivas, que foram colocadas para crescer, em seguida, o DNA foi extraído, produzindo um total de 1536 clones. Desses, apenas 668 apresentaram qualidade para serem montadas as reações de PCR com o Kit *DYEnamic ET Termintor* (GE Healthcare), para serem submetidos ao processo de seqüenciamento no seqüenciador automático ABI 3100. As seqüências foram depositadas no Sistema Genoma BioFoco, no qual foi realizada uma busca por regiões microssatélites. Essa busca possibilitou o isolamento e desenho de 24 *primers* flangeadores de regiões microssatélites no genoma de *Hypostomus gymnorhyncus* (Hg\_E01 a Hg\_E24), compostas por motivos com dois a seis nucleotídeos. Do total de locos desenvolvidos 15 produziram alelos individualizáveis, com amplitude de variação no tamanho entre 161 e 494 nucleotídeos. Os locos foram padronizados em quatro grupos com relação às temperaturas de anelamento: 1º) 56°C (Hg\_E05, Hg\_E07, Hg\_E09, Hg\_E16, Hg\_E17); 2º) 64°C (Hg\_E04, Hg\_E18, Hg\_E24); 3º) 66°C (Hg\_E02, Hg\_E19) e 4º) 68°C (Hg\_E08, Hg\_E11, Hg\_E12, Hg\_E14, Hg\_E22). Os testes de amplificação cruzada produziram resultados satisfatórios para 13 locos, disponibilizando, assim um total de 28 locos para a realização de análises genético-populacionais em *Hypostomus gymnorhyncus*.

Apoio financeiro: *Systema Naturae Consultoria Ambiental* Ltda, PROPE/UCG.