

AVALIAÇÃO DE LOCOS SSR (Single Sequence Repeats) DESENVOLVIDOS PARA *Oreochromis niloticus* E *Tropheus moorii* EM ALGUNS CICLÍDIOS NEOTROPICAIS

Heden Luiz Marques Moreira
Carla Giovane Ávila Moreira
Danilo P. Streit
Ricardo Pereira Ribeiro
Lauro Vargas
Fabiana Cavichiolo
Jayme Aparecido Povh
Odir Antônio Dellagostin
Bernardo Erdtamann

MOREIRA¹, H.L.M.; MOREIRA², C.G.A.; STREIT³, D.P.; RIBEIRO¹, R.P.; VARGAS¹, L.; CAVICHIOLO³, F.; POVH³, J.A.; DELLAGOSTIN⁴, O.A.; ERDTMANN⁵, B. Avaliação de locos SSR (single sequence repeats) desenvolvidos para *Oreochromis niloticus* e *Tropheus moorii* em alguns ciclídeos neotropicais. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 6(1): p. 49-51, 2003.

RESUMO: “Primers” de locos SSR (Single Sequence Repeats) desenvolvidos a partir de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (UNH104, UNH108 e UNH160) e de *Tropheus moorii* (*TmoM27*) foram testados em alguns ciclídeos brasileiros. Destes microssatélites avaliados, somente o *TmoM27* apresentou amplificação para os gêneros *Geophagus* e *Crenicichla* (*Cichlidae*). Esse loco foi monomórfico em *Crenicichla iguassuensis* e nos morfotipos *Crenicichla* sp1 e sp2, com um tamanho estimado da ordem de 346 pb. Pelo menos nesse segmento de DNA não há diferenciação entre *C. iguassuensis* e as supostas sp1 e sp2. A espécie *Geophagus brasiliensis* apresentou, contudo, dois alelos com tamanhos de 346 e 358 pb. O menor alelo de *G. brasiliensis* correspondia ao alelo encontrado nas populações de *Crenicichla*, contudo sua identidade de bases não foi estabelecida. Observou-se equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco *TmoM27*, tanto em *G. brasiliensis* como em *Oreochromis niloticus*. O loco *TmoM27* apresentou o mesmo nível de polimorfismo obtido por outros pesquisadores que analisaram este microssatélite nas espécies de *Crenicichla saxatilis* e *Oreochromis niloticus*. O locus *TmoM27* pode ser usado para análise da heterozigosidade em *Geophagus brasiliensis*. Os locos UNH 104, UNH108 e UNH160 não tem aplicação em estudos de estrutura de populações para *Crenicichla* e *Geophagus*, pois nenhum produto de amplificação foi obtido nestas espécies.

PALAVRAS-CHAVES: SSR, *Geophagus*, *Crenicichla*, *TmoM27*

AVALIATION OF SSR (SINGLE SEQUENCE REPEATS) LOCUS DEVELOPED FROM *Oreochromis niloticus* AND *Tropheus moorii* IN SOME NEOTROPICAL CICLHIDS

MOREIRA, H.L.M.; MOREIRA, C.G.A.; STREIT, D.P.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.D; CAVICHIOLO, F.; POVH, J.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; ERDTMANN, B. Avaluation of SSR (single sequence repeats) locus developed from *Oreochromis niloticus* and *Tropheus moorii* in some neotropical cichlids. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 6(1): p. 49-51, 2003.

ABSTRACT: Heterolog primers of SSR (Single Tandem Repeats) developed from tilapia (*Oreochromis niloticus*)(UNH104, UNH108 e UNH160) and *Tropheus moorii* (*TmoM27*), were evaluated in some neotropical cichlids. Only *TmoM27* showed loudness for *Geophagus* and *Crenicichla* genus (*Cichlidae*). *TmoM27* was monomorphic in *Crenicichla iguassuensis* and morph types *Crenicichla* sp1 and sp2; its size was estimated in 346 pb. There was not difference on this locus among *C. iguassuensis* and the supposed sp1 and sp2. However, *Geophagus brasiliensis* showed two alleles, with 346 and 358 pb, respectively. The shorter *G. brasiliensis* allele corresponded to allele found in *Crenicichla*, but its basis identify wasn't established. Was detected equilibrium of Hardy-Weinberg for *TmoM27*, either *G. brasiliensis* or *Oreochromis niloticus*. The *TmoM27* locus presented the same polymorphism level obtained by other researchers that analyzed this microsatellite in *Crenicichla saxatilis* e *Oreochromis niloticus*. The *TmoM27* locus can be used for analysis of the heterozygosity in *Geophagus brasiliensis*. The UNH 104, UNH108 and UNH160 loci doesn't have application in studies of structure of populations for *Crenicichla* e *Geophagus*, because no amplification product was obtained in these species.

KEY WORDS: *Crenicichla*, *Geophagus*, SSR, *TmoM27*

¹ Professor do Departamento de zootecnia, UEM. Maringá - PR, Brasil.

² Aluno de pós-graduação em Agronomia da UEM.

³ Aluno de Programa de Pós Graduação em Zootecnia da UEM.

⁴ Professor do Departamento de Microbiologia, UFPel

⁵ Professor do Instituto de Biologia, UFRGS

EVALUACIÓN DE LOCOS SSR (Single Sequence Repeats) DESARROLLADOS PARA *Oreochromis niloticus* E *Tropheus moorii* EN ALGUNOS CICLÍDEOS NEOTROPICALES

MOREIRA, H.L.M.; MOREIRA, C.G.A.; STREIT, D.P.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.D; CAVICHILO, F.; POVH, J.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; ERDTMANN, B. Evaluación de locos SSR (single sequence repeats) desarrollados para *Oreochromis niloticus* e *Tropheus moorii* en algunos ciclídeos neotropicales. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 6(1): p. 49-51, 2003.

RESUMEN: “Primers” de locos SSR (“Single Sequence Repeats”) desarrollados a partir de tilapia (*Oreochromis niloticus*) (UNH104, UNH108 e UNH160) e de *Tropheus moorii* (TmoM27), fueron investigados en algunos ciclídeos brasileños. De los microsatélites evaluados, solamente el TmoM27 amplificó en los géneros *Geophagus* e *Crenicichla* (*Cichlidae*). Ese loco fue monomórfico en *Crenicichla iguassuensis* y en los morfotipos *Crenicichla* sp1 e sp2, con un tamaño aproximado de 346 pb. Por lo menos en este segmento de ADN no hay diferencia entre *C. iguassuensis* y las posibles sp1 y sp2. Por otro lado, en la especie *Geophagus brasiliensis* se identificaron dos alelos con tamaños de 346 y 358 pb respectivamente. El alelo de *G. brasiliensis* correspondía al alelo encontrado en las poblaciones de *Crenicichla*, entretanto su identidad de bases no fue establecida. Se identificó equilibrio de Hardy-Weinberg para el loco TmoM27, tanto en *G. brasiliensis* como en *Oreochromis niloticus*. El locus TmoM27 presentó el mismo nivel de polimorfismo obtenido por otros investigadores que examinaron este microsatélite en las especies *Crenicichla saxatilis* y *Oreochromis niloticus*. El locus TmoM27 puede usarse para analizar la heterosigosidad en *Geophagus brasiliensis*. Los locus UNH 104, UNH 108 y UNH 160 no se aplican en estudios de estructura de poblaciones para *Crenicichla* e *Geophagus*, pues no se obtuvo ningún producto de amplificación en estas especies.

PALABRAS CLAVE: *Crenicichla*, *Geophagus*, SSR, TmoM27

Introdução

O estudo da variabilidade genética de espécies nativas é importante quando se pretende utilizá-las em programas de cultivo intensivo. O uso de peixes nativos deveria ser preferido em função de sua adaptação ao meio e pela disponibilidade da espécie-fonte para variabilidade genética. Outro aspecto a ser levantado é a questão de competição entre espécies exóticas e nativas. As espécies exóticas, ao invadirem acidentalmente o ambiente natural, podem deslocar ou até eliminar espécies nativas, causando um prejuízo à biodiversidade. Embora não existam relatos de deslocamentos ou eliminação de espécies nativas, tem se verificado a presença de tilápias em rios e lagos brasileiros (GITAÍ *et al.*, 1998). Os ciclídios da América do Sul compreendem cerca de 50 gêneros e englobam mais de 400 espécies. Uma análise filogenética abrangendo todos os táxons sul-americanos desta família não foi ainda obtida (KULLANDER, 1997). Uma análise envolvendo um grande número de caracteres morfológicos sugere, contudo, o estabelecimento de um grupo monofilético neotropical com quatro linhas evolutivas, a saber: heroinos, ciclasominos, geophaginos e creniciclídeos. Além de caracteres morfológicos, caracteres comportamentais têm sido usados para inferências filogenéticas (SANTOS & REIS, 1997). No entanto, outras ferramentas, entre elas marcadores moleculares do tipo microsatélites, podem ser utilizadas para estimar as relações filogenéticas entre ciclídios neotropicais. Um dos empecilhos para o uso de microsatélites é, entretanto, a necessidade de isolar e caracterizar estes marcadores a partir de técnicas de clonagem e sequenciamento, se estes não estiverem disponíveis nas espécies de interesse (ANGER & BERNATCHEZ, 1996). Uma maneira de superar esse problema é utilizar microsatélites desenvolvidos para outras espécies, gêneros ou mesmo para níveis taxonômicos mais elevados.

RICO *et al.* (1996) avaliaram a retenção de seqüências flanqueantes entre as três principais superclasses e a maioria das superordens de peixes, e constataram que a taxa de

substituição de bases nas seqüências nuclear e mitocondrial é menor em organismos aquáticos do que em terrestres. Este estudo de RICO *et al.* (1996) sugeriu que “primers” heterólogos seriam uma fonte de marcadores polimórficos entre espécies de peixes, mas também indicou os cuidados que deveriam ser tomados nas comparações de variabilidade entre espécies.

O objetivo deste estudo foi testar os “primers” dos locos microsatélites (UNH104, UNH108 e UNH160), desenvolvidos a partir da espécie *Oreochromis niloticus* (LEE & KOCHER, 1996) e o TmoM27, desenvolvido a partir de *Tropheus moorii* (ZARDOYA *et al.*, 1996), em alguns ciclídios neotropicais do Brasil.

Material e Métodos

Três amostras de peixes do gênero *Crenicichla* foram obtidos junto ao Nupélia (Núcleo de Pesquisa e Liminologia Aquática – Universidade Estadual de Maringá). Estas amostras foram caracterizadas, baseadas em aspectos morfológicos, como sendo *C. Iguassuensis*, sp.1 e sp.2 por RENESTO *et al.* (1998). Uma amostra de *Geophagus brasiliensis* foi obtida na estação de piscicultura de Viamão (RS). Uma amostra de DNA genômico foi extraída de nadadeira caudal para *G. brasiliensis* e de tecido muscular para as amostras do gênero *Crenicichla*. O método de extração foi o descrito por BARDAKCI & SKIBINSKI (1994) e o DNA ressuspendido em TE (10 mM Tris-HCl¹, 1 mM EDTA¹, pH 7,2). Todas as reações de PCR foram conduzidas em 25 mL contendo 50-100 ng do DNA alvo, 0,2 mM de cada primer¹, 0,2 mM de dNTP², 10 mM Tris¹ (pH 9,0), 1,5 mM MgCl₂¹, 50 mM KCl¹ e uma unidade da enzima Taq polimerase¹. As temperaturas de anelamento para os locos UNH104, UNH108, UNH160 e TmoM27 estão descritas em MOREIRA (1999). As seguintes condições para a amplificação por PCR foram: um ciclo de desnaturação a 95° C por 5 minutos; 30-35 ciclos de 1 minuto em 94° C, 1 minuto na temperatura de anelamento, 1 minuto em 72° e um ciclo final de extensão em 72° C por 5 minutos

¹ Gibco BRL – Life Technologies

² Amersham Pharmacia

(MOREIRA, 1999). Alíquotas dos produtos amplificadas foram corridas em um gel de poli-acrilamidas contendo 7M¹ de uréia. Os produtos foram corados com nitrato de prata (Silver Sequence TM DNA Staining)³. Para uma avaliação acurada, todos os géis foram carregados com uma reação de seqüenciamento do plasmídeo pGEM3ZF+ (Promega)³.

Resultados e Discussão

Dos quatro microssatélites testados, somente o *TmoM27* apresentou amplificação para os gêneros *Geophagus* e *Crenicichla* (Cichlidae). Esse loco foi monomórfico em *Crenicichla iguassuensis* e nos morfotipos *Crenicichla* sp1 e sp2, com um tamanho estimado da ordem de 346 pb. Pelo menos nesse segmento de DNA não há diferenciação entre *C. iguassuensis* e as supostas *C. sp1* e *C. sp2*. RENESTO *et al.* (1998), analisando com locos enzimáticos esses mesmos exemplares, também não encontraram suporte para caracterizar amostras de populações como espécies distintas. A amplificação do loco *TmoM27* foi monomórfica nos espécimes do gênero *Crenicichla*. Por outro lado, a espécie *Geophagus brasiliensis* apresentou dois alelos com tamanhos de 346 e 358 pb. O alelo de menor tamanho amplificado em *G. brasiliensis* correspondia ao alelo encontrado nas populações de *Crenicichla*, contudo sua identidade de seqüência não foi estabelecida. O alelo de maior tamanho amplificado em *G. brasiliensis* correspondia ao de menor tamanho amplificado em *O. niloticus*. Os alelos do loco *TmoM27* em *G. brasiliensis* encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Resultados semelhantes, em relação ao número de alelos (repetições), para o loco *TmoM27* foram obtidos por ZARDOYA *et al.* (1996) quando analisaram *Crenicichla saxatilis* e *Oreochromis niloticus*. A não amplificação dos locos UNH 104, UNH108 e UNH160, provavelmente pode estar relacionada a mutações no sítios de "anelamento" dos primers. Estas mutações podem ser resultados da divergência genética ocorrida ao longo da especiação. Os níveis de polimorfismo obtidos por RICO *et al.* (1996) foram geralmente maiores em espécies fontes. Estas espécies fontes foram as espécies utilizadas para identificar os locos de microssatélites e para desenhar os primers. RICO *et al.* (1996) não encontraram, entretanto, diferença significativa quando foram realizadas comparações pareadas entre números de alelos obtidos nas espécies fontes e não-fontes. Os resultados com relação ao loco *TmoM27* para *O. niloticus* e *Crenicichla* concordam com o obtido por RICO *et al.* (1996), pois os níveis de polimorfismos obtidos em *O. niloticus* e *Crenicichla* foram menores que os encontrados em *Tropheus moorii*, a espécie fonte para identificação deste loco de microssatélites.

Conclusão

O locus *TmoM27* pode ser usado para análise da heterozigosidade em *Geophagus brasiliensis*. Os locos UNH 104, UNH108 e UNH160 não tem aplicação em estudos de estrutura de populações para *Crenicichla* e *Geophagus*, pois nenhum produto de amplificação foi obtido nestas espécies.

Referências

- ANGER, B.; BERNATCHEZ, L. Usefull of heterologous microsatellites obtained from brook charr, *Salvelinus fontinalis* Mitchell, in other *Salvelinus* species. *Molecular Ecology*, Leicester v.5, no 4, p.317-319, apr. 1996.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD techniques in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, Nottingham, v. 37, no. 2, p. 117-123, feb. 1994.
- GITAÍ, D.L.G.; SILVA, L.A.F.; ANDRADE, T.G. Análise da variabilidade genética em tilápias (*Oreochromis niloticus*) através da técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44, 1998, Águas de Lindóia. *Anais... Águas de Lindóia*: SBG, 1998. p. 365.
- KULLANDER, S.O. A phylogeny and classification of the South American Cichlidae. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHYLOGENY, 1, 1997, Porto Alegre. *Anais... Porto Alegre*: Museu de Ciências e Tecnologia (PUCRS), 1997. p.41.
- LEE, W.J.; KOCHER, T.D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*, London, v. 49, no.1, p.169-171, jan. 1996.
- MOREIRA, H.L.M. *Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do nilo (Oreochromis niloticus) estimadas por microssatélite*. Porto Alegre, 1999. 112 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) –Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- RENESTO, E. *et al.* Análise genética entre três morfotipos do gênero *Crenicichla* (Perciformes, cichlidae) na bacia do Rio Iguaçu. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44, 1998, Águas de Lindóia. *Anais... Águas de Lindóia*: SBG, 1998. p. 365.
- RICO, C.; RICO, I.; HEWIT, G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceeding of Royal Society of London B*, Londres, v.263, no. 4, p. 549-557, apr. 1996.
- SANTOS, W.L.A.; REIS, R.E. Behavioral characteres of *Gymnogeophagus* species (Perciformes: Cichlidae) and their phylogenetic content. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHYLOGENY, 1, 1997, Porto Alegre. *Abstracts... Porto Alegre*: PUCRS, 1997. p. 92.
- ZARDOYA, R. *et al.* A. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceeding of Royal Society of London B*, Londres, v. 263, no. 4, p. 1589-1598, apr. 1996.

Recebido para publicação em 19/10/2001.

Received for publication on 19 October 2001.

Recibido para publicación en 19/10/2001.

Aceito para publicação em 11/11/2002.

Accepted for publication on 11 November 2002.

Accepto para publicación en 11/11/2002.

³ Promega