

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ZEBRAFISH DA PRIMEIRA GERAÇÃO DE UM PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO

Gabriela Hernandes Granzoto (PIBIC/Fundação Araucária/Uem), Jaísa Casetta, Vanessa Lewandowski, Paula Gabriele Lima Flores, Ricardo Pereira Ribeiro (Orientador), e-mail: rpribeiro@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias / Maringá, PR.

ÁREA: ~~ÁREA E SUBÁREA DO CONHECIMENTO: CIÊNCIAS AGRÁRIAS, ZOOTECNIA ZOOTECNIA. SUB-ÁREA: GENÉTICA E MELHORAMENTO DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS~~

Formatado: Fonte: (Padrão) Arial

Palavras-chave: *Danio rerio*, marcadores moleculares, microssatélites

Resumo:

O Zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo laboratorial bem estabelecido muito utilizado pela facilidade de manejo e protocolos já determinados. O objetivo do seguinte trabalho foi caracterizar geneticamente a primeira geração de um programa de melhoramento genético de Zebrafish, através de marcadores microssatélites. As amostras passaram por um protocolo de extração, quantificação da concentração de DNA, amplificação e foram submetidas a eletroforese. O tamanho dos alelos foi calculado utilizando-se DNA ladder (Invitrogen) de 100pb. ~~A análise estatística foi realizada e a frequência alélica, os alelos não efetivos, a heterozigozidade observada e esperada, os valores de diferenciação genética (Fst) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram determinados. Os dados foram analisados estatisticamente e a frequência alélica, alelos não efetivos, heterozigozidade observada e esperada, valores de diferenciação genética (Fst) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram determinados.~~ Foram encontrados 24 alelos que variam de 125 pb a 251 pb. A heterozigozidade esperada teve uma maior média que a heterozigozidade observada, indicando uma baixa presença de heterozigotos. O primer que apresentou maior número de Fst foi o Z-4188, com 0,277. Os primers Z-5395, Z-4425 e Z-4003 mostram equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto os outros apresentaram um desequilíbrio.

Introdução

O Zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe de pequeno porte de origem indiana muito estudado por ser considerado um modelo laboratorial bem estabelecido, de fácil manejo e métodos laboratoriais já estabelecidos (Briggs, 2002). Um recurso muito efetivo para a caracterização genética de animais são os marcadores microssatélites, estes possuem pequenas

sequências de nucleotídeos que podem ser encontradas pelo código genético do indivíduo, dando a possibilidade de monitorar a paternidade, polimorfismo e identificação genética dos indivíduos (Menezes et al., 2006).

Segundo Mather (2001), para um programa de melhoramento genético, é necessário a caracterização genética da população a ser estudada e melhorada. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar geneticamente a primeira geração de um programa de melhoramento genético de Zebrafish através de marcadores moleculares microssatélites, visando a padronização dos animais para fins de pesquisa.

Materiais e métodos

Foram coletadas 0,5cm² da nadadeira caudal de 120 peixes de 60 famílias do programa de melhoramento genético e armazenadas em álcool etílico 70%. A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de extração contendo NaCl conforme metodologia descrita por (Lopera-Barrero et al., 2008). Em seguida, foi mensurado a concentração total de DNA em um espectofotômetro PICODROP®, com amostras padronizadas em concentração de 10ng/μL. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1% corado com SYBR safe™ DNA gel Stain (Invitrogen, Carlsbad Ca, USA), com a eletroforese conduzida em tampão TBE 0,5X por duas horas à 70V. O gel foi visualizado em aparelho transluminador com luz ultravioleta, e a imagem fotografada com o programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

Após a extração, as amostras de DNA foram amplificadas utilizando-se os primers designados como Z-160, Z-4188, Z-5395, Z-4425, Z-4003 e Z-5649. Foram preparadas um volume final de reação de 15μL, utilizando-se 1X da solução tampão Tris-KCl, 2,0mM de MgCl₂, 0,8μM de cada primer (Forward e Reverse), 0,4 mM de dNTP, uma unidade de Platinum Taq DNA Polimerase e 20ng de DNA. A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Austin, TX, USA), onde as amostras finais foram submetidas à um processo de desnaturação, anelamento e extensão. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (acrilamida: bisacrilamida – 29:1) desnaturante (6M de uréia) e conduzida em tampão TBE 0,5X com 180V e 250mA por sete horas. Para visualização dos alelos microssatélites, foi utilizada a coloração com nitrato de prata. O tamanho dos alelos foi calculado utilizando-se DNA ladder (Invitrogen) de 100pb. Foi realizada análise estatística de frequência alélica, o número de alelos, a heterozigosidade observada e esperada, valores de diferenciação genética (F_{st}) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada locus utilizado o programa GenAEx 6.5.

Resultados e Discussão

Os 6 loci amplificados, produziram um total de 24 alelos variando de três (Z-160 e Z-5649) a cinco alelos (Z-4188 e Z-4003) por locus (figura 1).

Os tamanhos dos alelos variaram de 125 pb (Z-4425) a 251 pb (Z-4003). A constituição genética de uma população é explicada pela especificação e a proporção dos diferentes alelos em cada locus.

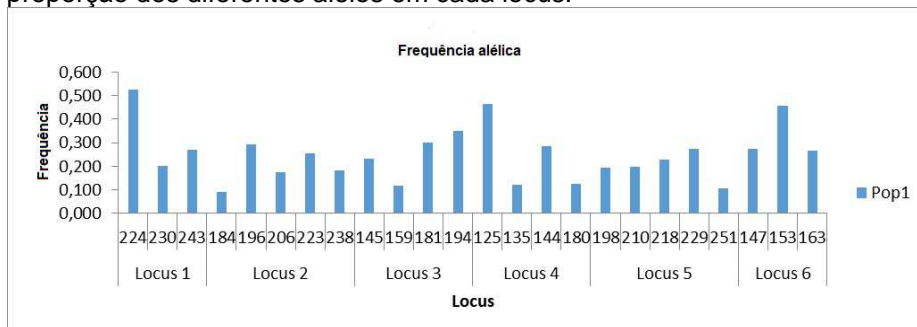


Figura 1: frequência alélica identificada e pares de bases para os diferentes locus amostrados.

Os 6 primers detectaram um valor médio de 4 alelos por loci (tabela 1), e média de 3,5138 alelos não efetivos, que são aqueles que não modificam o genótipo. Isso mostra que há uma baixa frequência de alelos recessivos dentro da população.

Tabela 1- Número de alelos por *locus* (N_a), Número de alelos não efetivos por *locus* (N_e), heterozigose observada (H_o), heterozigose esperada (H_e), valores de diferenciação genética (F_{st}), valores de qui-quadrado para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para a primeira geração de Zebrafish (*Danio rerio*).

Primer	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{st}	Valores de qui-quadrado Hardy-Weinberg
Z-160	3	2,557	0,557	0,609	0,085	12,903
Z-4188	5	4,457	0,561	0,776	0,277	55,490
Z-5395	4	3,570	0,675	0,720	0,062	4,175
Z-4425	4	3,032	0,621	0,670	0,074	8,450
Z-4003	5	4,661	0,739	0,785	0,060	17,271
Z-5649	3	2,806	0,500	0,644	0,223	15,122
Valor médio	4	3,513	0,608	0,700	0,130	

Os valores médios da heterozigosidade esperada (H_e) foram maiores que a média da heterozigosidade observada (H_o), indicando uma baixa presença de heterozigotos. Porém pode-se constatar uma baixa consanguinidade dentro da população (Rojas et al., 2011), ou seja, existe uma baixa endogamia dentro do estoque da primeira geração do melhoramento genético de Zebrafish. Esta endogamia é necessária para a padronização dos animais para fins de pesquisa. Os valores de diferenciação genética (F_{st}) mostra a probabilidade que dois alelos aleatórios sejam semelhantes em sua descendência, ou seja, que o grau de

endocruzamento dentro da população é baixo, mostrando que os alelos entre as populações são parecidos, pois quanto mais próximo de 0, maior a semelhança genética. O primer que apresentou maior número de F_{st} foi o Z-4188, com 0,277. Para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, usa-se o teste de qui-quadrado que mostra se há diferença significativa entre os valores observados e os esperados. Os primers Z-5395, Z-4425 e Z-4003 não apresentaram valores significativos, ou seja, mostram equilíbrio. Já os primers Z-160 e Z-5649, demonstraram significância num nível de $P < 0.0100$ e o primer Z-4188, $P < 0.001$, mostrando um desequilíbrio.

Conclusões

Com a metodologia aplicada no trabalho, foi possível caracterizar geneticamente a primeira geração do programa de melhoramento genético de Zebrafish através de marcadores moleculares microssatélites. Com esses dados, será possível a determinação da variabilidade genética, com a finalidade de selecionar os animais para os próximos acasalamentos do programa de melhoramento genético.

Agradecimentos

Agradecimento à Fundação Araucária pela bolsa concedida para realização deste projeto.

Referências

BRIGGS, J.P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol**, v. 282, n. 1, R3–R9, 2002.

LOPERA-BARRERO, N.M., POVH, J.A., RIBEIRO, R.P., GOMES, P.C., JACOMETO, C.B., DA SILVA, T.L. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: Modified salt (NaCl) extraction. **Cienc. e Investig. Agrar**, v. 35, n.1, p. 65–74, 2008.

MATHER, P.B. Overview of fish genetics research at queensland university of technology. In: GUPTA, M. V.; ACOSTA, B. O. **Fish Genetics Research in Member Countries and Institutions of the International Network on Genetics in Aquaculture**. Penang: ICLARM – The World Fish Center, 2001. p. 133–139.

MENEZES, M.P.C., MARTINEZ, A.M., RIBEIRO, M.N., PIMENTA FILHO, E.C., BERMEJO, J.V.D. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Rev. Bras. Zootec**, v. 35, p. 1336–1341, 2006.

27º Encontro Anual de Iniciação Científica
7º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



2 e 3 de outubro de 2018

ROJAS, S., CLEMENT C., YUYAMA .K., NAGAO, E. O. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh) do INPA usando marcadores microssatélites (EST-SSR). **Cienc. y Tecnol. Agorpecuaria**, v. 12, p. 51–64. 2001.

