

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

Gabriela Hernandez Granzoto (PIBIC/CNPq/Uem), Jaísa Casetta, Simoni Siemer, Bruno da Silva Pires, Ricardo Pereira Ribeiro (Orientador), e-mail: rpribeiro@uem.br.

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

ÁREA E SUBÁREA DO CONHECIMENTO: ZOOTECNIA, GENÉTICA E MELHORAMENTO DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

Palavras-chave: *Danio rerio*, microssatélites, variabilidade genética

Resumo:

Um programa de melhoramento genético utiliza como ferramenta, o estudo da variabilidade genética dos animais inclusos nele. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar a segunda geração de zebrafish de um programa de melhoramento genético e comparar com a variabilidade genética da primeira geração do mesmo programa. O DNA foi extraído com um protocolo de NaCl e, posteriormente, amplificado com a utilização de 6 primers microssatélites. Foram realizadas análises de frequência alélica, número de alelos, heterozigosidade observada e esperada, valores de diferenciação genética (F_{st}) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada locus utilizado o programa GenAlEx 6.5. Foram observados 24 alelos com os 6 primers. Foi encontrado o valor de 3.319 alelos não efetivos e um valor médio de 0,170 de F_{st} . A média da heterozigosidade esperada (H_e) foi maior que a média da heterozigosidade observada (H_o). Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, os primers Z-160 e Z-4188 estavam equilíbrio de Hardy-Weinberg. É possível observar que o programa está sendo efetivo e que há diferenças entre as duas gerações, sendo possível planejar os acasalamentos da próxima geração.

Introdução

A variabilidade genética é um índice a ser medido num programa de melhoramento genético, pois tem grande importância na identificação de reprodutores, visando animais com melhor desenvolvimento, tamanho e conversão alimentar (Melo et. al, 2006). Dessa forma, os marcadores microssatélites são uma ferramenta essencial nesse processo, caracterizando os coeficientes de endogamia e endocruzamentos da população, possibilitando a avaliação de futuros acasalamentos (Moreira, et. al, 2007).

O zebrafish é um peixe de pequeno porte, oriundo da Ásia, com destaque no meio acadêmico como modelo laboratorial, por sua facilidade de manejo, baixo custo de produção e genoma totalmente sequenciado. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar geneticamente a segunda geração do Programa de

Melhoramento Genético de Zebrafish, do grupo Peixegen, da Universidade Estadual de Maringá e compara-la com os valores encontrados da primeira geração.

Materiais e métodos

Coleta do material genético e extração de DNA

Foram coletadas 0,5cm² da nadadeira caudal de 120 peixes de 60 famílias da segunda geração 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).

Quantificação do material genético

Foi mensurado a concentração total de DNA em um espectrofotômetro 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).

Amplificação

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 150V e 250mA por oito horas. Foi utilizada a coloração com nitrato de prata, para visualização dos alelos microsatélites e o tamanho deles foi calculado utilizando-se DNA ladder (Invitrogen) de 100pb.

Análises

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 GenAIEx 6.5.

Resultados e Discussão

Os tamanhos dos alelos variaram de 125 pb, no primer Z-4425 a 251 pb, no primer Z-4003 (Figura 1). Foi observado um total de 24 alelos variando de três nos primers Z-160 e Z-5649, a cinco alelos nos primers Z-4188 e Z-4003, resultando num valor médio de 4 alelos por locus (Tabela 1).

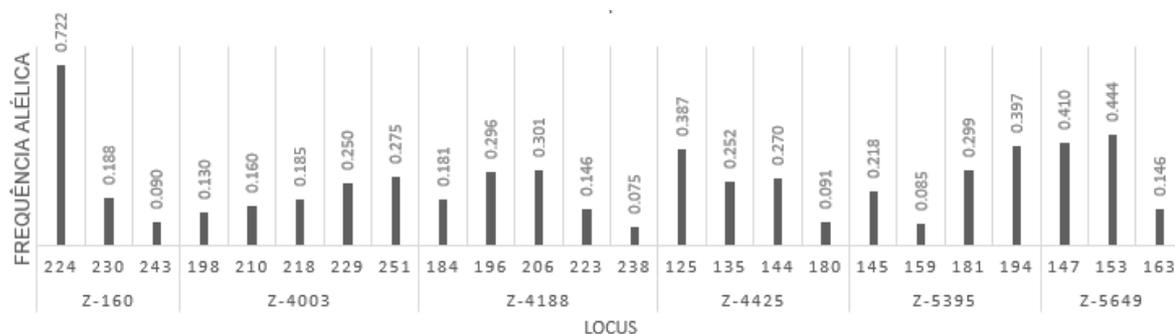


Figura 1: frequência alélica e pares de bases para os diferentes primers analisados.

Foram observados 3.319 alelos não efetivos na segunda geração do programa de melhoramento genético. Sendo que, o valor encontrado na primeira geração foi de 3,5138 (Granzoto et. al, 2018). Esses alelos são caracterizados por não modificar o genótipo. Portanto, da primeira para segunda geração esse valor teve uma queda, ou seja, menor número de alelos recessivos dentro da segunda geração, diminuindo a homozigose.

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 (χ^2) para a segunda geração de zebrafish do programa de melhoramento genético.

Primer	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{st}	χ^2
Z-160	3	1.770	0.385	0.435	0.116	4.645
Z-4003	5	4.654	0.550	0.785	0.299	52.373
Z-4188	5	4.196	0.726	0.762	0.047	13.949
Z-4425	4	3.398	0.617	0.706	0.125	14.805
Z-5395	4	3.309	0.530	0.698	0.241	30.428
Z-5649	3	2.587	0.494	0.613	0.194	10.511
Valor médio	4	3.319	0.550	0.666	0.170	

O valor de F_{st} na primeira geração foi de 0,130 (Granzoto et. al, 2018), e 0,170 na segunda geração. O F_{st} indica a probabilidade de dois alelos serem análogos em sua descendência, sendo que, quanto mais próximo de 0, maior a semelhança genética entre os indivíduos. Dessa forma, é possível observar que na primeira geração existia uma maior semelhança genética do que há na segunda geração.

Os valores de heterozigosidade esperada (H_e) foram maiores que a média da heterozigosidade observada (H_o), indicando uma baixa presença de heterozigotos, mostrando que há uma endogamia dentro da população (Rojas, 2001), a qual é necessária e vantajosa dentro do programa, a fim de padronizar os animais.

Em relação aos valores de qui-quadrado para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, os primers Z-160 e Z-4188 não apresentaram valores significativos,

estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto os primers Z-4425 e Z-5649 demonstraram nível de significância de $P < 0.05$ e os primers Z-4003 e Z-5395, $P < 0.001$, demonstrando um desequilíbrio.

Conclusões

É possível observar que o programa de melhoramento genético está sendo efetivo e já é possível observar várias diferenças dos resultados obtidos, principalmente em relação aos valores de *F_{st}*. Essas diferenças são pequenas, porém trata-se de uma geração seguida de outra. Além disso, com os dados obtidos, será possível planejar a próxima geração e dar continuidade ao programa.

Agradecimentos

Agradecimento ao CNPq pela bolsa concedida para realização deste projeto.

Referências

- GRANZOTO, G. H., CASSETTA, J., LEWANDOWSKI, V., FLORES, P. G. L., RIBEIRO, R. P. Caracterização genética de zebrafish da primeira geração de um programa de melhoramento genético. **27º Encontro Anual de Iniciação Científica**. 2018.
- 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.
- MELO, D. C., OLIVEIRA, D. A. A., RIBEIRO, L. P., TEIXEIRA, C. S., SOUSA, A. B., COELHO, E. G. A., CREPALDI, D. V., TEIXEIRA, E. A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 58, n.1, 87-93, 2006.
- MOREIRA, A. A., HILSDORF, A. W. S., DA SILVA, J. V., & DE SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.
- 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. Agropecuaria**, v. 12, p. 51–64. 2001.