

Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites do genoma de *Hypsiboas albopunctatus* (Anura, Hylidae) do cerrado goiano

Hugo Henrique Pádua de OLIVEIRA^{1,2*}; Aparecido Divino da CRUZ^{1,2}; Daniela de Melo e SILVA²

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Campus Samambaia, Instituto de Ciências Biológicas 4. Goiânia, GO.

² Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas Replicon. Rua 235, n. 40, Departamento de Biologia, Bloco L, Área IV. Setor Universitário. Goiânia, GO.

* correspondência: hugohenrique3000@yahoo.com.br

Palavras-chave: DNA, Microssatélites, Cerrado, *Hypsiboas albopunctatus*.

1. Introdução

Para avaliar a diversidade genética de uma população, têm sido utilizados marcadores informativos a base de caracteres morfológicos e marcadores oriundos de regiões expressas ou não do DNA chamados de marcadores moleculares. Nesse contexto destacam-se os marcadores microssatélites, também conhecidos como marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) ou STR (Short Tandem Repeats). Tais marcadores se caracterizam por possuírem uma sequência motivo que varia de 1 a 6 nucleotídeos e que se repete em tandem, com número variável de repetições em diferentes indivíduos, sendo esta variação a responsável pelo alto polimorfismo deste marcador nas populações (Hancock, 1999).

O cerrado brasileiro é atualmente considerado uma das áreas de maior biodiversidade existente (Myers 2000). Contudo, a partir da década de 50, grande parte de seu território foi destruído, sendo a sua destruição a principal ameaça para a população de anfíbios que nele habita (Silvano & Segalla, 2005). Entretanto, algumas espécies parecem apresentar resistência a alterações no ambiente, podendo mesmo assim, ampliar sua distribuição geográfica em decorrência das ações antrópicas (Pedralli *et al.*, 2001). Dotado desta característica, esta a espécie *Hypsiboas albopunctatus*, um anuro da família Hylidae que se comporta como generalista no uso de habitats (Brandão & Araújo, 1998), mas, mesmo sendo uma espécie de ampla distribuição, aspectos relacionados à sua ecologia têm sido pouco estudados (Araujo, *et al.* 2007).

A partir da análise de alelos presentes em diferentes *locus* de microssatélites, é possível verificar se há algum padrão genotípico específico para as diferentes

populações, o que permite identificá-las utilizando-se estas seqüências, além de avaliar o nível de diversidade genética. Para tanto, é necessário a construção de marcadores moleculares que possuam a diversidade necessária para a avaliação da estruturação genética da espécie. Outra forma de realizar tal estudo é através da utilização de primers heterólogos, ou seja, primers desenvolvidos para outras espécies, mas que possam ser utilizados em espécies geneticamente relacionadas (Beebee & Rowe, 2004).

Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar *locus* microssatélites do genoma de *Hypsiboas albopunctatus* através da construção de bibliotecas enriquecidas, além de avaliar a transferibilidade de primers pré-selecionados por teste de transferibilidade interespecífica com espécies relacionadas.

2. Material e Métodos

Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites

Para a construção da biblioteca genômica foi utilizado o protocolo descrito por Kijas *et al.* (1994) com modificações. O DNA genômico de um espécime de *H. albopunctatus* foi digerido pela enzima de restrição *RsaI* (GT \uparrow AC/ CA \uparrow TG) visando obter fragmentos entre 700 e 1200 pb. Após a digestão, com o objetivo de garantir que todos os fragmentos tivessem uma terminação comum e conhecida, estes fragmentos foram ligados a oligonucleotídeos adaptadores ou *linkers*.

Os fragmentos contendo as seqüências de DNA microssatélites foram enriquecidos e selecionados através de hibridização com a sonda de DNA (GT)₈ e (CT)₈. Os fragmentos ricos em repetições foram inseridos no vetor de clonagem TOPO TA (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. Esse vetor foi utilizado para transformar, através de transformação química, bactérias *Escherichia coli*, que foram posteriormente cultivadas em meio de cultura sólido LB (25 g/L), contendo ampicilina (50 mg/ml), 30 μ L de IPTG e 30 μ L de X-gal, em placas de petri, visando selecionar apenas os clones positivos.

Após a determinação das colônias positivas em placas contendo X-gal, as mesmas foram armazenadas em meio LB líquido com ampicilina em freezer a -20°C, aguardando o seqüenciamento dos insertos.

Teste de Transferibilidade

Para o teste de transferibilidade, uma triagem de 16 *locus* STR desenvolvidos para a espécie *Hypsiboas raniceps* foi realizada em amostras de espécimes de *H. albopunctatus* coletados em cerrado goiano. Para a avaliação destes *locus*, foram utilizados três indivíduos por população, de pelo menos cinco populações, que foram coletados na estação chuvosa. PCRs em diferentes concentrações foram realizadas buscando otimizar o protocolo para os primers heterólogos, e em seguida, testadas em géis de agarose á 3% avaliando a exatidão e robustez da amplificação.

3. Resultados e Discussão

Até o presente momento, apenas 92 colônias positivas foram obtidos através do enriquecimento por sondas CT₈/GT₈. Este resultado demonstra a ineficiência do método de clonagem por transformação química. Para a determinação do sucesso das sondas utilizadas, ainda é necessário o seqüenciamento dos insertos obtidos para que através de análise por ferramentas de bioinformática se faça a busca das regiões microssatélites.

Com relação ao teste de transferibilidade de *primers*, o protocolo sugerido pelo autor Arruda *et al.* (2010) não se mostrou eficaz para a amplificação em espécimes de *H. albopunctatus*.

As amplificações por PCR foram otimizadas para o volume final de 25µl com 70ng de DNA template. A concentração final para a otimização da reação foi realizada com Tampão de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,3mM de cada DNTP (Invitrogen), 2,5 pmol de cada primer, 1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Assim, depois de realizado estes ajuste nas condições de amplificação por PCR, obteve-se uma amplificação satisfatória com o protocolo de termociclagem apresentado conforme a tabela 01.

Tabela 01. Protocolo de termociclagem otimizado para espécie *Hypsiboas albopunctatus*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação	94	30s	
Anelamento	X	60s	40
Extensão	72	1	
Extensão final	72	5	1
Armazenamento	4	∞	∞

X: temperatura de anelamento específica para cada primer

As concentrações ótimas dos reagentes para a PCR de todos os locos foram idênticas com exceção das temperaturas de anelamento dos primers (tabela 02). Após a análise dos 16 primers desenvolvidos para a espécie *H. raniceps*, seis foram considerados adequados para a utilização na espécie *H. albopunctatus* devido à qualidade dos produtos apresentados, permitindo assim, seu uso em estudos futuros (tabela 02).

Tabela 02. Primers transferidos com sucesso da espécie *Hypsiboas raniceps* para a espécie *Hypsiboas albopunctatus*.

Locus	Primer (5' → 3')	Temperatura de anelamento
Hranil1	F: GCACTCATGCAGACACA R: CTGCTGCAGGATACTAAAGGAC	61° C
Hranil2	F: GAGCGGTGCCAGGTTAGTAGT R: CAAGGTAGGCGTGTGTGTTGT	67° C
Hranil4	F: GAGCACACCATTATCACACAGAC R: CAGCTTGTCAGCATAGAGATTGTC	64° C
Hranil6	F: CTTGGGACTCCTTATGCTGTTG R: AGGGTGACAGAAGGTGGAATC	53° C
Hranil10	F: TCCTCTCTTTCTGTGTCTCTTTT R: GTCAGTCATGTCACAGCGTTT	53° C
Hranil16	F: AGTAACCTCTGTCACCCAGCAC R: CAGATATGGGGTATGCCTGGT	67° C

F, primer forward; R, primer reverse

4. Conclusões

Assim como para outras espécies, foi possível amplificar regiões microssatélites na espécie *H. albopunctatus* com o uso de primers heterólogos. A conservação de regiões que flanqueiam os microssatélites em espécies relacionadas permite a transferência destes marcadores com grande economia de tempo e custo de trabalho. Contudo ainda se mostra importante a construção de marcadores específicos para a espécie em estudo, tendo em vista algumas das dificuldades encontradas através dos métodos de transferência de primers heterólogos, tais como a não amplificação e amplificação inespecífica, sendo que ambos os casos ocorreram no presente trabalho não permitindo a utilização de outros marcadores já descritos.

5. Referências bibliográficas

ARAÚJO, F. R. R. C; BOCCHIGLIERI, A; HOLMES, R. M. Ecological aspects of the *Hypsiboas albopunctatus* (Anura, Hylidae) in central Brazil. *Neotropical Biology and Conservation*. 2007, vol. 2(3): pp.165-169.

BEEBEE, T. J; ROWE G. An introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press. 2004.

BRANDÃO, R. A; ARAÚJO, A.F. B.A herpetofauna da Estação Ecológica de Águas Emendadas. In: MARINHO-FILHO, J; RODRIGUEZ, F. H. G & GUIMARÃES, M. M, (orgs.), A fauna da Estação Ecológica de Águas Emendadas. História natural e ecológica em um fragmento de Cerrado do Brasil Central. 1998, Brasília, GDF/IEMA/IBAMA, pp. 9-21.

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D. B. & SCHÖLTTERER, C. (ed.) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, 1999.

KIJAS, J. M. H; FOWLER, J. C. S; GARBETT, C. A; THOMAS M. R. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques*. 1994. vol16, pp.656–662

MYERS, N; MITTERMEIER R.A; MITTERMEIER, C. G; DA FONSECA , G. A. B; KENT, J. Biodiversity hotpots for conservation priorities. *Nature*. 2000, vol.403 (24). pp. 853-858

PEDRALLI, G.; NETO, A. S. G; TEIXEIRA, M. C. B. Diversidade de anfíbios na região de Ouro Preto. *Ciência hoje*. 2001, vol. 30, pp.70-73.

SILVANO, D. L; SEGALLA, M. V. Conservação de anfíbios no Brasil. *Megadiversidade*. 2005, vol1(1), pp.79-86