

Construção de marcadores genéticos do tipo microssatélites para análises moleculares do lagarto *Salvator merianae*

Gustavo Henrique Silva Santos ¹, Laura Verrastro Vinas ²

Instituto de Biociências – Departamento de Zoologia,
UFRGS
santosghs@gmail.com



pro:pesq
Pró-Reitoria de Pesquisa - UFRGS

Introdução

O lagarto *Salvator merianae* (lagarto-de-papo-amarelo) possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em diversos países da América do Sul, como Brasil, Argentina, Uruguai e Bolívia, sendo a espécie com maior distribuição do seu gênero (Figura 1). Apesar de ser relativamente comum, a carência de estudos moleculares para a espécie ainda é uma realidade. Atualmente, sabe-se que é um animal forrageiro ativo, terrestre e com uma sazonalidade de atividade, hibernando entre os meses de abril a julho, e tendo o pico de atividade nos meses de novembro e dezembro. São necessários mais estudos sobre a sua fisiologia, comportamento, atividade entre outros.



Foto de Arthur Schramm de Oliveira

Figura 1: Indivíduo jovem-adulto de *Salvator merianae*

Uma das técnicas mais utilizadas para a identificação individual, a investigação de vínculo familiar e o mapeamento genético em diversos organismos, incluindo humanos, animais e plantas é a detecção de polimorfismos de marcadores microssatélites, também chamados de sequências curtas repetidas em tandem STRs (short tandem repeats), ou sequências simples repetidas SSR (simple sequence repeats). Adicionalmente, estudos com locos microssatélites de DNA são amplamente utilizados para determinação de paternidade, principalmente em desovas comunitárias, sendo possível definir qual o sucesso reprodutivo dos machos. Dessa forma, o objetivo do estudo é utilizar os dezenove conjuntos de primers específicos previamente construídos para a amplificação e genotipagem dos indivíduos coletados na Estação Experimental da UFRGS (EEA-UFRGS), e a partir disso a seleção dos marcadores mais informativos a fim de investigar futuramente as relações de parentesco entre os adultos e os jovens de cada ninho da EEA-UFRGS, buscando identificar quais machos colaboraram para cada ninho.

Material e Métodos

As amostras de tecido foram obtidas de três populações distintas. Através de parceria com a Universidade de Brasília (UnB) foi obtida uma população do estado de Goiás; outra população, constituída de animais atropelados na planície costeira do RS foi obtida junto ao Departamento de Ecologia da UFRGS. A terceira população é constituída de amostras próprias coletadas na EEA-UFRGS. O DNA dos indivíduos de *S. merianae* foi extraído a partir de músculo usando o protocolo CTAB. Uma biblioteca enriquecida com repetições de microssatélite foi feita em parceria com o Laboratório de Evolução Molecular da UFRGS. Os primers foram sintetizados por demanda comercial e os protocolos para a amplificação das regiões ricas nestes SSR foram otimizados, estabelecendo-se a temperatura de anelamento, o número de ciclos e as concentrações ideais para cada componente da reação.

As sequências foram amplificadas através da técnica de PCR ("Polimerase Chain Reaction"), em termocicladores automáticos. As reações de PCR foram verificadas através de eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, corado com GelRed. Os protocolos estão sendo otimizados com duas fluorescências (FAM e NED) para genotipagem em empresa terceirizada. Foram obtidos 135 clones positivos para repetições de dinucleotídeos e 228 clones positivos para repetições de trinucleotídeos.

Para esses clones, o inserto foi amplificado por PCR usando primers do vetor, purificado enzimaticamente e sequenciado na empresa terceirizada. As sequências foram analisadas com o Programa Chromas e 28 clones apresentaram sequências contendo repetições do tipo microssatélites, sendo 18 para repetições de dinucleotídeos e 10 para repetições de trinucleotídeos. Esses clones contêm marcadores potencialmente úteis para a confecção da biblioteca final de microssatélites a ser estabelecida para essa espécie.

Dos 19 primers confeccionados foram otimizados nove, dos quais seis foram sequenciados para 15 indivíduos das três populações. As sequências foram analisadas no programa Peak Scanner (Figura 2).

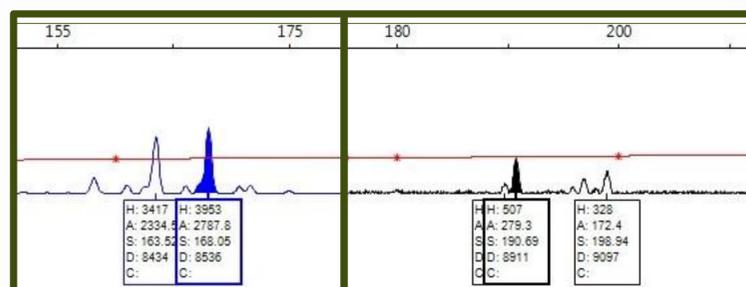


Figura 2: Alelos de dois indivíduos e primers diferentes observados no Peak Scanner.

Resultados e Discussão

Dos seis primers analisados, um mostrou-se monomórfico, quatro mostraram variações alélicas informativas e um terá de ser repetido pois seu resultado foi inconclusivo.

Os primers com variação apresentaram os alelos mostrados na tabela 1. Foram identificados diversos alelos para cada um dos locos nas diferentes populações testadas.

Tabela 1 – Dados demonstrando o número e faixa de alelos encontrados nas amostras.

Primer	Número de Alelos	Faixa alélica
Sm_25	2	-----
Sm_33	9	Faixa 189 a 217
Sm_34	6	Faixa 186 a 199
Sm_141	7	Faixa de 228 a 246

Perspectivas

As próximas etapas do projeto constituirão na otimização dos primers específicos restantes para as fluorescências (NED, FAM e HEX), na amplificação e genotipagem dos mesmos em amostras das populações estudadas e em amostras de um grupo externo (*Cnemidophorus*) para seleção dos marcadores mais informativos e, finalmente, na análise dos ninhos a serem amostrados na EEA-UFRGS para avaliação da estrutura genética de relação de parentesco presente nessa população.

Agradecimentos:

Renata Cardoso Vieira e Nelson Jurandi Rosa Fagundes