

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

## DESENHO DE PRIMERS PARA ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE MITOCONDRIAL MT-ATP SUBUNIDADE 6 (ATP6) EM PEIXE-REI.

Gabrielle Silveira WAISHAUP<sup>\*1</sup>, Rafael Aldrighi TAVARES<sup>1</sup>.

\*autor para correspondência: gwaishaupt@gmail.com

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

**Abstract:** The objective of this work was to construct primers aiming at identifying the polymorphism of the mitochondrial ATP6 gene in the different "peixe-rei" species of the genus *Odontesthes*. The construction of the primers was carried out through the assembled contig of a DNA library of the *Odontesthes humensis* species, against the mitochondrial ATP6 gene of the species *Odontesthes* sp. The design of the primers was carried out with the aid of the Primer3 program, and it was established that the primers should have a size between 20 and 30 base pairs, annealing temperature between 50°C and 60°C with a maximum difference of 3°C and a concentration of guanine and cytosine between 40% and 60%. The primer pair was shown to be effective in detecting mitochondrial MT-ATP subunit 6 (ATP6) gene polymorphism in different kingfish species of the genus *Odontesthes*, making it a tool for the analysis of genetic diversity.

**Palavras-chave:** *Odontesthes*, dna, mitocôndria, piscicultura

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

## Introdução

O peixe-rei (*Odontesthes humensis*) habita as águas doces, comum na região Sul do país, Uruguai e Argentina. No estado do Rio Grande do Sul, tem relevância na pesca artesanal e grande aceitação pela população devido a ótima qualidade de sua carne. Além disso, a alta taxa reprodutiva e amplo espectro alimentar sugerem grande potencial para cultivo, mas seus níveis de produção ainda são baixos (Tavares et al., 2014).

Neste aspecto, é de grande importância a pesquisa filogenética para o estudo da evolução e caracterização genética da espécie. As mitocôndrias são estruturas celulares de grande interesse neste estudo, pois possui genoma compacto com estrutura e organização simples, é de herança exclusiva materna e presente em organismos em número haplóide, o que impede (ou torna raros) os eventos de recombinação, sendo capaz de diferir populações geográficas com eficiência pela identificação dos haplótipos ou clones de DNA Mitochondrial (mtDNA) (Churikov et al., 2001).

O gene mitocondrial (MT)-ATP6 é responsável por fornecer informações para produção da proteína MT-ATP 6, essencial para a função mitocondrial normal, pois forma uma parte de uma enzima chamada ATP sintase. O gene possui uma região codificante que poderia ser facilmente identificada e por apresentar uma baixa taxa de substituição do que a região controle, baseado geralmente em conhecimentos de mtDNA de peixes (Lenaz et al., 2004).

O seguinte trabalho teve como objetivo a construção de *primers* visando a identificação do polimorfismo do gene mitocondrial ATP6 nas diferentes espécies de peixe-rei do gênero *Odontesthes*.

## Material e Métodos

A construção dos *primers* foi realizada através da *contig* montada de uma

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

biblioteca de DNA, da espécie *Odontesthes humensis*, contra o gene mitocondrial ATP6 da espécie *Odontesthes sp.*

A biblioteca de DNA foi gerada por um sequenciador GAIIx (Illumina) no modo *paired-end*, obtendo sequências com 150 pares de bases (pb). A montagem por referência foi feita com o programa Bowtie2 e a obtenção da *contig* com o programa Samtoll.

O desenho dos *primers* foi realizado com o auxílio do programa Primer3, sendo estabelecido que os *primers* deveriam apresentar um tamanho entre 20 e 30 pares de bases, temperatura de anelamento entre 50°C e 60°C com diferença de no máximo 3°C e concentração de guanina e citosina entre 40% e 60%.

### Resultados e Discussão

A *contig* gerada pelo alinhamento dos *reads* do sequenciamento contra o gene referência, foi de 684 pares de base, apresentando 43 sítios de polimorfismo. Helbert et al. (2003) relatam que os estudos de regiões de genes mitocondriais com alto polimorfismo permitem identificar espécies e diagnosticar novas espécies, auxiliando a desvendar a diversidade genética em um ambiente.

De acordo com Markoulatos et al. (2002) a validação de uma reação de PCR, principalmente quando se trata de um par de *primer*, requer planejamento estratégico. Foram construídos cinco pares de *primers*, sendo selecionado o par que apresentou maior produto (585 pb) da PCR e que amplificou o fragmento que contivesse o maior número de polimorfismo, neste caso 38 polimorfismo de um total de 43 da *contig* (Figura 1). O par de *primer* selecionado também apresentou características favoráveis para a amplificação do gene mitocondrial ATP6 nas espécies de peixe-rei: *Odontesthes humensis*, *Odontesthes bonariensis* e *Odontesthes sp.*

Promoção e Realização:



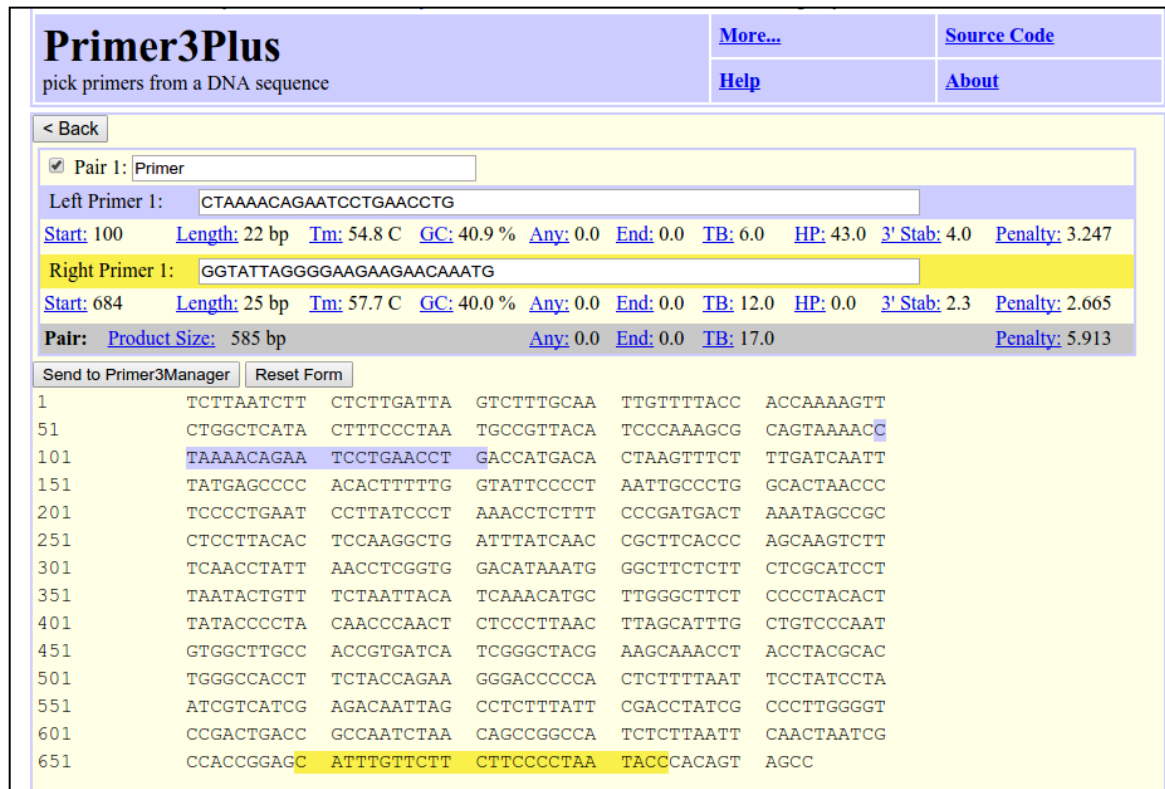
Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL



**Primer3Plus**  
pick primers from a DNA sequence

[More...](#) [Source Code](#)  
[Help](#) [About](#)

< Back

Pair 1: Primer

Left Primer 1:   
Start: 100 Length: 22 bp Tm: 54.8 C GC: 40.9 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 6.0 HP: 43.0 3' Stab: 4.0 Penalty: 3.247

Right Primer 1:   
Start: 684 Length: 25 bp Tm: 57.7 C GC: 40.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 12.0 HP: 0.0 3' Stab: 2.3 Penalty: 2.665

Pair: Product Size: 585 bp Any: 0.0 End: 0.0 TB: 17.0 Penalty: 5.913

1	TCTTAATCTT	CTCTTGATTA	GTCTTTGCAA	TTGTTTTACC	ACCAAAAAGTT
51	CTGGCTCATA	CTTTCCTAA	TGCCGTACA	TCCCAAAGCG	CAGTAAAAC
101	TAAAACAGAA	TCCTGAACCT	GACCATGACA	CTAAGTTTCT	TTGATCAATT
151	TATGAGCCCC	ACACTTTTGT	GTATTCCCCT	AATTGCCTG	GCACTAACCC
201	TCCCTGAAT	CCTTATCCCT	AAACCTCTTT	CCCAGTACT	AAATAGCCGC
251	CTCCTTACAC	TCCAAGGCTG	ATTTATCAAC	CGCTTACCC	AGCAAGTCTT
301	TCAACCTATT	AACCTCGGTG	GACATAAATG	GGCTTCTCT	CTCGCATCCT
351	TAACTACTGT	TCTAATTACA	TCAAACATGC	TTGGGCTTCT	CCCTTACACT
401	TATACCCTTA	CAACCAACT	CTCCCTAAC	TTAGCATTTG	CTGTCCCAAT
451	GTGGCTTGCC	ACCGTGATCA	TGGGCTACG	AAGCAAACCT	ACCTACGCAC
501	TGGGCCACCT	TCTACCAGAA	GGGACCCCA	CTCTTTAAT	TCCTATCCTA
551	ATCGTCATCG	AGACAATTAG	CCTCTTTATT	CGACCTATCG	CCCTTGGGGT
601	CCGACTGACC	GCCAACTAA	CAGCCGGCCA	TCTCTTAAT	CAACTAATCG
651	CCACCGGAGC	ATTTGTTCTT	CTTCCCCTAA	TACCACAGT	AGCC

Figura 1- Par de *primer* selecionado.

## Conclusão

O par de *primer* desenhado demonstrou-se eficaz para detectar o polimorfismo do gene mitocondrial MT-ATP subunidade 6 (ATP6) em diferentes espécies de peixe-rei do gênero *Odontesthes*, tornando uma ferramenta para análise da diversidade genética.

## Referências

- CHURIKOV, D.M.; MATSOUKA, X., LUAN; A.K.; GRAY A. K.; GHARRETT A. J. 200. Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon genus *Oncorhynchus*. *Molecular Ecology* 10: 2329- 2339.
- HELBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal*



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

of London 270:317-322.

LENAZ, G.; BARACCA, A.; CARELLI, V.; D'AURELIO, M.; SGARBI, G.; SOLAINI, G. 2004. Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. *Biochim et Biophys Acta* 1658:89-94.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a protical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16:47-51.

TAVARES, R. A.; PIEDRAS, S.R.N.; NUNES, M. D.; ALMEIDA, D. B.; MOREIRA, C. G. A.; FERNADES, S. F.; FREITAS, S. F.; MOREIRA, H. L. M.; POUHEY, J. L. O. F.; DIONELLO, N. J. L. 2014. Identification of microsatellite loci with amplification potential in "pejerrey" (*Odontesthes humensis*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 66:1941-1945.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:

