

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

Gustavo Henrique Silva Santos, Nelson Jurandi Rosa Fagundes
Instituto de Biociências - Departamento de Genética, UFRGS
santosghs@gmail.com



pro.pesq
Pró-Reitoria de Pesquisa - UFRGS

Introdução

O gênero *Salvator* (Teiidae) é constituído pelas espécies de lagartos com maior tamanho corporal nas Américas, podendo atingir até 50 cm de comprimento rostro-cloacal. Possuindo uma ampla distribuição geográfica que passa por diversos países da América do Sul, como Brasil, Argentina, Uruguai e Bolívia, o lagarto *Salvator merianae* (lagarto-de-papo-amarelo) (Figura 1) é a espécie de maior distribuição do seu gênero. Isso faz com que seja um animal comum e conhecido e, apesar disso, diversos aspectos ecológicos e comportamentais ainda são desconhecidos para populações dessa espécie, que também sofre uma carência de estudos moleculares.



Foto de Arthur Schramm de Oliveira

Figura 1: Indivíduos jovem-adultos de *Salvator merianae*

Os microssatélites, também conhecidos como repetições de sequências simples (SSR) se caracterizam por subunidades repetitivas justapostas, geralmente localizados no genoma nuclear. São marcadores não-codificantes em sua maioria e normalmente caracterizados por um elevado grau de polimorfismo. Nos últimos anos, locos de microssatélites têm sido utilizados em diferentes tipos de análise, como por exemplo, estudos de parentesco, genética forense, estrutura genética das populações, entre outras. Por serem marcadores altamente variáveis e possuírem uma alta taxa de evolução, os microssatélites possibilitam uma melhor resolução da estrutura genética da população quando comparados com outros marcadores. Este estudo objetiva a utilização de dezoito conjuntos de primers específicos previamente construídos para a amplificação e genotipagem de indivíduos coletados, e a partir disso a seleção dos marcadores mais informativos para confecção de uma biblioteca de microssatélites para a espécie.

Material e Métodos

As amostras de tecido foram obtidas de três populações distintas. Através de parceria com a Universidade de Brasília (UnB) foram obtidas amostras de uma população do estado de Goiás, outra população, constituída de animais atropelados na planície costeira do RS, na rodovia RS-122, foi obtida junto ao Departamento de Ecologia da UFRGS. A terceira população é constituída de amostras próprias coletadas na EEA-UFRGS, em Eldorado do Sul. 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. O protocolo para amplificação de locos selecionados contendo regiões de SSR foi otimizado, estabelecendo-se a melhor temperatura de anelamento e número de ciclos para cada loco individual. As reações de PCR foram verificadas através de eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, corado com GelRed. Foram utilizadas três fluorescências distintas (FAM, VIC e NED), que foram lidas após genotipagem por eletroforese capilar realizada por uma empresa terceirizada. Os cromatogramas foram analisados com o programa Peak Scanner.

A partir dos dados obtidos foram realizadas análises através de estatísticas gerais de genética de populações (estimativas de heterozigosidade, teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, estatísticas-F) com os programas MSA, FSTAT, Arlequin e Genepop web.

Resultados

Até o momento dez marcadores foram otimizados para 56 indivíduos das três populações, destes um é monomórfico para todas as amostras. Para os nove marcadores polimórficos, o número médio de alelos por loco até o momento é de 14,3 alelos (variando de 7 a 24).

Os resultados dos dados estatísticos para genética de populações estão apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente, comparando os locos com menos de 10% de dados faltantes e populações.

Tabela 1 – Características genéticas e sumário de estatísticas-F para 6 locos de microssatélite em 3 populações de *S. merianae*.

| Locus | Nº de Alelos | Ho | He | F _{IT} | F _{ST} | F _{IS} |
|--------|--------------|-------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Sm_07 | 16 | 0,745 | 0,872 | 0,213 | 0,044 | 0,177 |
| Sm_17 | 17 | 0,677 | 0,822 | 0,215 | 0,021 | 0,198 |
| Sm_91 | 13 | 0,672 | 0,847 | 0,268 | 0,059 | 0,222 |
| Sm_98 | 7 | 0,311 | 0,473 | 0,528 | 0,148 | 0,446 |
| Sm_102 | 16 | 0,687 | 0,841 | 0,215 | 0,041 | 0,181 |
| Sm_203 | 24 | 0,751 | 0,908 | 0,212 | 0,049 | 0,171 |
| Média | 15,5 | 0,640 | 0,794 | 0,275* | 0,060* | 0,232* |

Abreviações: Ho, heterozigosidade observada; He, heterozigosidade esperada; F_{IT}, coeficiente de endogamia geral; F_{ST}, estatística de diferenciação populacional; F_{IS}, coeficiente de endogamia.

Tabela 2 – Diversidade genética nas populações de *S. merianae*.

| População | Ap | RS | Ho | He | F _{IS} | G-W |
|----------------------|----|-------|-------|-------|-----------------|-------|
| Eldorado do Sul – RS | 5 | 6,868 | 0,562 | 0,762 | 0,260*** | 0,337 |
| Goiás - GO | 12 | 8,237 | 0,784 | 0,859 | 0,203*** | 0,363 |
| Rodovia RS-122 | 15 | 7,310 | 0,573 | 0,746 | 0,338*** | 0,434 |

Abreviações: Ap, alelos privados; RS, riqueza alélica; Ho, heterozigosidade observada; He, heterozigosidade esperada; F_{IS}, coeficiente de endogamia; G-W, índice de Garza-Williamson. ***P<0,001.

Uma análise comparando as populações par a par foi realizada para calcular a distância entre essas populações utilizando os valores de F_{ST} e está demonstrada na tabela 3.

Tabela 3 – Valores de F_{ST} par a par, entre as populações.

| População | EEA-UFRGS | Goiás | Projeto Atropelados | F _{ST} Médio |
|---------------------|-----------|---------|---------------------|-----------------------|
| EEA-UFRGS | 0,0000 | 0,09805 | 0,08644 | - |
| Goiás | - | 0,0000 | 0,04211 | - |
| Projeto Atropelados | - | - | 0,0000 | - |
| | | | | 0,0686 |

Foi calculado o F_{ST} médio com Amova no Arlequin e a variação interpopulacional foi aproximadamente 7%.

Discussão

A partir dos resultados analisados nota-se uma diferença maior entre a população de Brasília e as demais. Além disso, essa população parece ser mais variável mais variável. O F_{IS} encontrado para os locos indica ocorrência de endocruzamento em todas as subpopulações analisadas.

Os dados apresentados ainda são preliminares e o andamento do estudo poderá esclarecer melhor as relações entre os diferentes locos e populações. Contudo, os marcadores já otimizados mostram-se potencialmente úteis para a confecção da biblioteca final de microssatélites a ser estabelecida para essa espécie.

Perspectivas

As próximas etapas do projeto constituirão na otimização dos oito marcadores restantes e da genotipagem dos indivíduos restantes no banco de amostras para todos os marcadores, assim como refazer alguns indivíduos para ver se o F_{IS} alto pode ser problema de genotipagem.

Agradecimentos:
Renata Cardoso Vieira