

DESENHO DE PRIMERS E ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA EM PEPINO DO MAR

(Primers drawing and structure study genetics in pepino sea cucumbers)

Francisco Yan Tavares REIS^{1*}; Vanessa Alves PEREIRA¹; José Pedro Vieira Arruda JÚNIOR²; Rodrigo MAGGIONI³; Yasmim Maia FERREIRA¹; Carminda Sandra Brito Salmito VANDERLEY⁴

¹Universidade Estadual do Ceará (FAVET/UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP:60.740-000; ²Universidade Federal do Ceará (UFC), Centro de Ciências;

³Instituto de Ciências do Mar (UFC); ⁴Centro de Ciências da Saúde (UECE).

*E-mail: yan.reis@aluno.uece.br

RESUMO

Os pepinos do mar são equinodermatas muito importantes tanto ecologicamente quanto economicamente. A exploração desse animal, principalmente de espécimes de *Holothuria grisea*, tem aumentado devido à recente descoberta de moléculas bioativas de interesse para a indústria farmacêutica. O objetivo desse trabalho foi identificar microssatélites que podem ser interessantes para o manejo reprodutivo e populacional dessa espécie. Para isso foi utilizado sequenciamento de nova geração seguido de identificação pelo software SSR pipeline. Foram identificados 3 microssatélites para loci diferentes, sendo um com possível aplicação na diferenciação sexual entre espécimes, além de variabilidade genética populacional bem conservada.

Palavras-chave: Microssatélites, sequenciamento nova geração, genética populacional.

SUMMARY

Sea cucumbers are very important echinodermata both ecologically and economically. The exploitation of this animal, mainly of *Holothuria grisea* specimens, has increased due to the recent discovery of bioactive molecules of interest for the pharmaceutical industry. The objective of this work was to identify microsatellites that may be interesting for the reproductive and population management of this species. For this, new generation sequencing was used followed by identification by the SSR pipeline software. Three microsatellites were identified for different loci, one with possible application in the sexual differentiation between specimens, in addition to well conserved population genetic variability.

Key words: Microsatellites, sequencing new generation, population genetics.

INTRODUÇÃO

Os pepinos do mar são equinodermatas, invertebrados marinhos, bentônicos que possuem simetria penta-radial. Além disso, são chamados de holotúrias, tem corpo delgado, cilíndrico, podem realizar tanto reprodução assexuada como sexuada e se alimentam de detritos do fundo do mar (DOLMATOV, 2014).

*Endereço para correspondência:

yan.reis@aluno.uece.br

Ecologicamente, as holotúrias possuem grande importância, já que elas são responsáveis pela realização de um processo chamado bioturbação, que consiste no revolvimento do substrato marinho (CONAND, 2006).

Esses animais são muito utilizados tanto na culinária oriental, como na medicina tradicional oriental, sendo, portanto, muito explorados pelo povo dessa região. Já no Brasil, onde a espécie de pepino do mar mais abundante é *H. grisea*, apesar da presença de grandes comunidades orientais, a maioria dos pepinos do mar não são utilizados para o consumo, mas são a principal moeda de troca para algumas comunidades (JÚNIOR *et al.*, 2017).

Outra importância econômica muito notória que *H. grisea* possui é o seu potencial como produtor de moléculas bioativas com função hemolítica, antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (MOURÃO, 2004; SUN *et al.*, 2008; MOURA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2014).

Dessa forma, todo esse apelo comercial em torno de *H. grisea* tem levado a superexploração desses animais causando diminuição dos seus estoques naturais. Assim, é interessante que esses animais sejam produzidos em cativeiro tanto com o objetivo de repovoar áreas afetadas, como com o objetivo de suprir a demanda do mercado oriental. No entanto, pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva dessa espécie e, portanto, o estudo da sua estrutura genética pode vir a contribuir para o desenvolvimento da técnica de reprodução assistida em *H. grisea*. Portanto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver microssatélites para uso futuro em estudos sobre a genética reprodutiva de *H. grisea*.

METODOLOGIA

O estudo foi autorizado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Ministério do Meio Ambiente - 22742-1. Para o desenvolvimento dos microssatélites, 32 espécimes de *H. grisea* adultos com peso total acima de 90 g foram coletados na praia de Bitupitá (Barroquinha, Ceará, Brasil). Os animais foram anestesiados e dissecados para inspeção das gônadas e identificação do sexo, já que não existe dimorfismo sexual para essa espécie. As amostras de DNA genômico foram isoladas do tecido muscular com o Kit Genômico Wizard[®] SV (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro microvolumétrico Nanodrop[®] e mantidas a -20 °C até o processamento.

Posteriormente, amostras de um macho e uma fêmea foram selecionadas para sequenciamento de próxima geração. O DNA dessas duas amostras foi reextraído usando o mesmo Kit especificado anteriormente e quantificado usando o fluorômetro QUBIT 2.0 (Life Technologies). Estas amostras foram então submetidas separadamente à preparação de bibliotecas genômicas com o Kit Nextera DNA Library Prep (Illumina) de acordo com as recomendações do fabricante. Logo depois, as amostras foram submetidas ao sequenciamento de pares de bases no sistema Illumina MiSeq[®] FastQC. Para a identificação dos microssatélites, utilizou-se o SSR_pipeline (MILLER *et al.*, 2013).

*Endereço para correspondência:

yan.reis@aluno.uece.br

Em seguida, o software BatchPrimer3 (FRANK *et al.*, 2008) foi utilizado para projetar os primers. Após projetados os primers foram testados. De um total de 50 loci selecionados, 15 pares de primers, para amplificação de microssatélites, foram projetados e testados. Destes, três primers para loci diferentes foram selecionados e adicionados de uma cauda fluorescente. Após PCR (Reação em cadeia da polimerase) utilizando estes primers, os produtos amplificados seguiram para um processo de genotipagem por eletroforese capilar no sequenciador automatizado ABI3500 (Applied Biosystems, CA, EUA). Uma identificação de produtos e serviços foi realizada pelo programa GeneMapper Versão 4.0 (Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA).

O software GENEPOP v 4.2 (RAYMOND e ROUSSET, 1995) e GenAlex v.5.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2006) foram usados para calcular as frequências alélicas, assim como, as heterozigosidades esperadas (H_e) e observadas (H_o); número de alelos (N_a) e número de alelos efetivos (N_e); equilíbrio de Hardy-Weinberg; desequilíbrio de conexão; e os índices de Wright.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três loci analisados demonstraram uma frequência similar de distribuição entre machos e fêmeas ($p < 0,05$). No entanto, no locus Hgr15607, foi observada uma diferença significativa entre as frequências alélicas de machos e fêmeas ($p < 0,05$). As frequências genotípicas registradas para machos e fêmeas não mostraram diferenças significativas para o locus Hgr15607, assim como para qualquer um dos outros loci estudados.

As estimativas de diversidade genética da população total estão representadas na Tab. 1. A H_o variou de 0,156 no locus Hgr15607 a 0,625 no locus Hgr18815, enquanto que a H_e variou de 0,488 no locus Hgr15607 a 0,774 no locus Hgr18815. Após a correção de Bonferroni, apenas o loco Hgr15607 apresentou proporções significativamente diferentes daquelas esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tab. 1). A falta de equilíbrio de Hardy-Weinberg pode estar relacionada com a presença de seleção, inbreeding, efeito Wahlund, cross-breeding seletivo e/ou pela presença de alelos nulos (BOHONAK, 1999; ROMANA-EGUIA *et al.*, 2005; KORDICHEVA *et al.*, 2010).

Tabela 1: Dados de variabilidade genética de *H. grisea* para três loci microssatélites.

	Hgr18815	Hgr15607	Hgr15269	Média
N	32	32	24	29,3
Ho	0,625	0,156	0,417	0,399
He	0,774	0,488	0,531	0,597
Na	8	7	3	6
Ne	4,423	1,954	2,133	2,836
HWE	0,041	0,000	0,028	0
FIS	0,186	0,666	0,216	0,356

*Endereço para correspondência:
yan.reis@aluno.uece.br

N = número de indivíduos genotipados; Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada; Na = Número de alelos detectados; Ne = Número de alelos efetivos; HWE = probabilidade associada ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor em negrito indica significância após correção de Bonferroni); FIS = índice de inbreeding de Wright.

Foi identificada a presença de alelos nulos no locus Hgr15607 desses espécimes de *H. grisea*. Causas comuns para a presença de alelos nulos são amplificação diferencial dos alelos, especialmente aqueles com tamanhos muito diferentes (WATTIER *et al.*, 1998); mutação nas sequências de anelamento dos primers; herança ligada ao sexo, onde, em organismos diploides, o sexo heterogêneo carrega apenas um alelo se o marcador estiver localizado em um cromossomo sexual (DAKIN e AVISE, 2004). No entanto, a presença de alelos nulos no locus Hgr15607 da população de *H. grisea* relatada neste trabalho, pode ter sido influenciada pelas diferenças significativas entre as frequências alélicas de machos e fêmeas. Nenhum dos sexos mostrou evidência de homozigose para este marcador, por isso é improvável que Hgr15607 esteja localizado em um cromossomo sexual. No entanto, ainda existe a possibilidade de o marcador Hgr15607 estar ligado à determinação do sexo em *H. grisea*.

CONCLUSÕES

Aqui apresentamos um conjunto de marcadores altamente polimórficos para o estudo populacional de *H. grisea*. Esses marcadores serão úteis para elaborar estratégias de conservação e pesca, bem como orientar e monitorar a produção desses animais em cativeiro. Diferenças genéticas sugerem que o locus Hgr15607 pode estar ligado à determinação do sexo nesses animais.

REFERÊNCIAS

- BOHONAK, A.J. Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review Of Biology Journal*, v.74, n.1, p.21-45, 1999.
- CONAND, C. Sea cucumber biology: taxonomy; distribution; biology; conservation status. p. 33–50 In: Bruckner A.W. (ed). *Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae*. NOAA Technical Memorandum, p.244, 2006.
- DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Nature Publishing Group*, v.93, p.504-509, 2004.
- DOLMATOV, I.Y. Asexual Reproduction in Holothurians. *The Scientific World Journal*, v.2014, Article ID 527234, 13p., 2014.
- FRANK, M.Y.; NAXIN, H.; YONG, Q.G.; MING-CHENG, L.; YAQIN, M.; DAVE, H.; GERARD, R.L.; JAN, D.; OLIN, D.A. BatchPrimer: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*, v.9, p.253-259, 2008.

*Endereço para correspondência:
yan.reis@aluno.uece.br

JÚNIOR, J.S.; PONTE, I.; COE, C.M.; FARIAS, W.R.L.; FEITOSA, C.V.; HAMEL, J.F.; MERCIER, A. Sea cucumber fisheries in Northeast Brazil. SPC Beche-de-mer Information Bulletin, n. 7, p.43-47, 2017.

KORDICHEVA, S.Y.; RUBTSOVA, G.A.; SHITOVA, M.A.; SHAIKHAEV, G.O.; AFANASIEV, K.I.; ZHIVOTOVSKY, L.A. A search for null alleles at the microsatellite locus of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Russian Journal of Genetics, v.46, n.8, p.1019–1022, 2010.

MELO, A.A.; CARNEIRO, F.R.; SILVA, W.M.; MOURA, R.M.; SILVA, G.C.; SOUSA, O. V.; SABOYA, J.P.S.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *Holothuria grisea* binds to bacterial cells. International Journal of Biological Macromolecules, v.64, p.435–442, 2014.

MILLER, M.P.; KNAUS, B.J.; MULLINS, T.D.; HAIG, S.M. Pipeline—Computer software for the identification of microsatellite sequences from paired-end Illumina High-Throughput DNA sequence data (ver. 1.1, February 2014): U.S. Geological Survey, 2013.

MOURA, R.M.; ARAGÃO, K.; MELO, A.A.; CARNEIRO, R.F.; OSÓRIO, C.B.H.; LUZ, P.B.; QUEIROZ, A.F.S.; SANTOS, E.A.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S. *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. Fundamental & Clinical Pharmacology, v.27, n.6, p.656–668, 2013.

MOURÃO, P.A.S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. Current Pharmaceutical Design, v.10, p.967-981, 2004.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, v.6, p.288-295, 2006.

RAYMOND, M.; ROUSSET F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Heredity, v.86, p.248-249, 1995.

ROMANA-EGUIA, M.R.R.; IKEDA, M.; BASIAO, Z.U.; TANIGUCHI, N. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. Aquaculture Research, v.36, n.1, p.69–78, 2005.

SUN, G.Q.; LI, L.; YI, Y.H.; YUANA, W.H.; LIUA, B.S.; WENGA, Y.Y.; ZHANGA, S.L.; SUNA, P.; WANGA, Z.L. Two New Cytotoxic Nonsulfated Pentasaccharide Holostane ($\frac{1}{4}$ 20-Hydroxylanostan-18-oic Acid g-Lactone) Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria grisea*. Helvetica Chimica Acta, v.91, p.1453-1460, 2008.

WATTIER, R.; ENGEL, C.R.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VALERO, M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). Molecular Ecology, v.7, p.1569–1573, 1998.