

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
ANIMAL**

**AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE LOCOS DE  
MICROSSATÉLITES EM CRUSTACEA DECAPODA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Tális de Oliveira Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

# **AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE LOCOS DE MICROSSATÉLITES EM CRUSTACEA DECAPODA**

**por**

**Tális de Oliveira Silva**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, RS, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biodiversidade Animal**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2008**

**Universidade Federal de Santa Maria-RS**  
**Centro de Ciências Naturais e Exatas**  
**Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Animal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE LOCOS DE MICROSSATÉLITES EM  
CRUSTACEA DECAPODA**

elaborada por  
**Tális de Oliveira Silva**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Biodiversidade Animal**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Claudia Paiva Nunes, Dr. (PUC-RS)**

**Karine Delevati Colpo, Dr. (URI-Santiago)**

Santa Maria, 29 de abril de 2008

## **Agradecimentos**

Este trabalho é fruto de muita dedicação, esforço e persistência, que não são exclusividades meus. Muitos familiares e amigos dividiram comigo esta longa jornada me dando apoio e força, direta ou indiretamente, aos quais quero aqui deixar minha gratidão.

Agradeço aos meus pais Zanete e Francisco e aos meus dois irmãos que, mesmo longe, me apoiaram e acreditavam neste trabalho.

À minha Orientadora Prof. Marlise e Prof Sandro pela dedicação, paciência e amizade e à oportunidade de participar de um mestrado.

À todos os meus colegas de laboratório do DIVERGE e LACRUST e colegas de mestrado pelos momentos de descontração e pelo aprendizado.

À infra-estrutura cedida pelo professor Elgion Loreto e Prof. Lenira Sepel e ao pessoal do laboratório LABDROS pelo apoio prestado.

Ao meu amigo e companheiro de todas as horas Marcel Patric de Sousa Schuster, por toda paciência e pelo apoio que recebi dele, mesmo não conhecendo nada sobre microssatélites.

À PPG Biodiversidade Animal pela oportunidade de desenvolver meu projeto e pela infraestrutura proporcionada.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal

Universidade Federal de Santa Maria

### AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE LOCOS DE MICROSSATÉLITES EM CRUSTACEA DECAPODA

Aeglidae Dana (1852) são “caranguejos” que pertencem a Infraordem Anomura e são exclusivos de água doce. O gênero *Aegla* é constituído por aproximadamente 63 espécies, sendo restrito ao sul da América do Sul. O emprego de marcadores moleculares altamente sensíveis pode auxiliar no entendimento de aspectos evolutivos e da diversidade do gênero. Os microssatélites são excelentes marcadores moleculares que podem revelar detalhes da estrutura genética de uma população. Entretanto, o isolamento de microssatélites é uma técnica cara e trabalhosa. A utilização de locos de microssatélites previamente desenvolvidos para espécies próximas é uma alternativa ao isolamento. Quanto mais próxima a relação filogenética entre duas espécies, maior a probabilidade de conservação das seqüências e de amplificação cruzada utilizando *primers* heterólogos. O objetivo deste estudo foi testar a amplificação cruzada de locos de microssatélites desenvolvidos para duas espécies de Aeglidae em outros crustáceos e verificar o seu potencial para aplicação em estudos de genética de populações. *Primers* desenvolvidos para locos de microssatélite previamente isolados de *Aegla longirostri* (AlCA 135 e AlCA 138) e *Aegla uruguayana* (Au05) foram testados em outras sete espécies da família Aeglidae, *Aegla camargoi*, *Aegla leptodactyla*, *Aegla plana*, *Aegla platensis*, *Aegla spinipalma*, *Aegla violacea*, *Aegla sp.n.* e também em *Emerita brasiliensis* (Anomura: Hippidae), *Pachycheles laevidactylus* (Anomura: Porcellanidae) e *Trichodactylus panoplus* (Brachyura: Trichodactylidae). O DNA foi extraído utilizando o método tradicional de fenol-clorofórmio. As amostras de DNA foram submetidas a uma Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com os *primers* citados. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% a 100V por 24 horas. Os géis foram corados com nitrato de prata e os padrões de banda foram analisados. Observou-se transferência dos marcadores microssatélites somente dentro do gênero *Aegla*, e o loco AlCA135 foi o que apresentou maior índice de sucesso na amplificação cruzada. Não foi observada amplificação cruzada entre famílias dentro da infraordem Anomura e nem entre as infraordens Anomura e Brachyura, indicando que esses locos de microssatélites não se encontram conservados em espécies distantemente relacionadas. Entretanto, os locos avaliados apresentam potencial de utilização dentro da família Aeglidae e novos testes, otimizando as condições de PCR, poderão melhorar os índices de sucesso de amplificação cruzada.

**Palavras Chave:** Aeglidae, amplificação cruzada, caranguejo de água doce, marcador molecular.

## ABSTRACT

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal

Universidade Federal de Santa Maria

### CROSS-AMPLIFICATION OF MICROSATELLITE LOCI IN CRUSTACEA DECAPODA

Aeglidae Dana (1852) are anomuran “crabs” which occur exclusively in freshwater. The genus *Aegla* consists of 63 species and subspecies restricted to the southern South America. Highly sensitive molecular markers can help to elucidate some evolutionary features of the genus. Microsatellite markers are excellent molecular markers because they can reveal fine details of the genetic structure of a population. However, microsatellite isolation employs a laborious and expensive methodology. An alternative approach to the isolation procedure is the utilization of microsatellite markers previously developed for close species. The closer the phylogenetic relationship between two species, the more probable is the conservation of the loci and the successful cross-amplification. The present study aimed to test the cross-amplification of microsatellite loci developed for two species of the family Aeglidae in other decapod crustaceans and to verify their potential for application in further studies on population genetics. Primers developed for microsatellite loci previously isolated from *Aegla longirostri* (AICA135 and AICA138) and *Aegla uruguayana* (Au05) were tested in seven species of the family Aeglidae, *Aegla camargoi*, *Aegla leptodactyla*, *Aegla plana*, *Aegla platensis*, *Aegla spinipalma*, *Aegla violacea* and *Aegla sp.n.*, besides in *Emerita brasiliensis* (Anomura: Hippidae), *Pachycheles laevidactylus* (Anomura: Porcellanidae) and *Trichodactylus panoplus* (Brachyura: Trichodactylidae). DNA was extracted using traditional procedures. DNA samples were submitted to the Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primers cited. The PCR products were electrophoresed in 6% polyacrylamide gels, at 100V for 24 hours. The gels were silver-stained and the band patterns were analyzed. The microsatellite markers could be transferred only within the genus *Aegla*, and the locus AICA135 presented the greatest rate of success in cross-species transfer. Cross-amplification between families within the infra-order Anomura, as well as between the infra-order Anomura and Brachyura was not possible, indicating that these microsatellite loci are not conserved in distantly related species. Notwithstanding, the evaluated loci present potential for utilization within the family Aeglidae and new tests, using optimized PCR conditions, should improve the success rate in cross-amplification.

**Key words:** Aeglidae, cross-amplification, freshwater crab, molecular marker.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
1.1 FAMILIA AEGLIDAE .....	8
1.1.1 DISTRIBUIÇÃO.....	9
1.1.2 DISTRIBUIÇÃO.....	9
1.1.3 ORIGEM DO GÊNERO .....	9
1.2 MICROSSATÉLITES.....	13
1.2.1 ORIGEM DOS MICROSSATÉLITES NOS GENOMAS .....	14
1.2.2 MECANISMOS MUTACIONAIS DOS MICROSSATÉLITES.....	16
1.2.3 DISTRIBUIÇÃO E FREQUÊNCIA DE MICROSSATÉLITES NOS GENOMAS .....	17
1.2.4 IMPORTÂNCIA FUNCIONAL DOS MICROSSATÉLITES NOS GENOMAS.....	17
1.2.5 APLICAÇÕES DOS MICROSSATÉLITES .....	20
1.2.6 ISOLAMENTO DE MICROSSATÉLITES.....	20
1.2.7 CONSERVAÇÃO DE LOCOS DE MICROSSATÉLITES E POTENCIAL DE AMPLIFICAÇÃO CRUZADA ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES .....	21
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 AMOSTRAGEM.....	24
3.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS .....	25
<b>4 ARTIGO</b>	
<b>4.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>4.5 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>42</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Família Aeglidae

Os membros da família Aeglidae Dana (1852) são “caranguejos de água doce” amplamente distribuídos na América do Sul meridional e estão entre os grupos de Crustacea Decapoda mais bem sucedidos que se tem notícia. Pertencem à Infraordem Anomura, e são exclusivos de água doce (Pérez-Losada *et al*, 2004).

Classificação:

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea

Classe Malacostraca

Subclasse Eumalacostraca

Superordem Eucarida

Ordem Decapoda

Subordem Pleocyemata

Infraordem Anomura

Superfamília Galattheoidea

Família Aeglidae

Gênero *Aegla*

O gênero *Aegla* foi considerado monotípico durante trinta e um anos, desde a descrição da primeira espécie do gênero no Chile (“*Galathea*” *laevis*) por Latreille em 1818, até o encontro de uma segunda espécie (“*Aeglea*” *denticulata*), também chilena, por Nicolet em 1849. Ainda em 1898, Ortmann achava que a espécie de *Aegla* que Von Ihering lhe mandara do Rio Grande do Sul, portanto do outro lado da América do Sul, era a mesma espécie chilena *Aegla laevis* (Bond-Buckup & Buckup, 1994).

Quarenta e duas espécies e subespécies do gênero *Aegla* haviam sido descritas até 1994 e o conhecimento da distribuição de muitas espécies restringia-se às localidades-tipo. Bond-Buckup & Buckup (1994) revisaram o gênero e ampliaram o número para 63 espécies e subespécies. No Brasil 35 espécies são conhecidas, sendo que uma está presente no Rio de

Janeiro, dez em São Paulo, sete no Paraná e a maioria, 22 espécies, no Rio Grande do Sul. (Bond-Buckup, 2003)

O sul do Brasil apresenta as seguintes espécies endêmicas: *Aegla platensis*, *Aegla prado*, *Aegla uruguayana*, *Aegla odebrechti*, *Aegla jarai*, *Aegla spinosa*, *Aegla franciscana*, *Aegla inconspicua*, *Aegla serrana*, *Aegla ligulata*, *Aegla plana*, *Aegla camargoi*, *Aegla grisella*, *Aegla spinipalma*, *Aegla longirostri*, *Aegla itacolomiensis*, *Aegla inermis*, *Aegla violacea*, *Aegla obstipa*, *Aegla leptodactyla*, *Aegla singularis* e *Aegla rossiana* (Bond-Buckup & Buckup 1994).

### 1.1.2 Distribuição

Na região neotropical, segundo um estudo recente (Bueno *et al.*, 2007), o gênero *Aegla* tem como limite norte de ocorrência a bacia do Rio Grande, na divisa entre os estados de São Paulo e Minas Gerais (20° 18'47''S - 47° 16'37''W) e ao sul ocorre até a ilha de Madre de Dios, Província de Ultima Esperanza, Chile ( 50° 01' 10'' S – 75° 18' 45'' W) (Jara & López, 1981.)

### 1.1.3 Origem do Gênero

Estimada em mais de 15.000 espécies, a ordem Decapoda possui a maior riqueza de espécies entre os crustáceos. Os animais desta ordem já serviram de modelos para estudos de diversas naturezas no meio científico (estudos fisiológicos, ecológicos, comportamentais, morfológicos, etc), porém, os aspectos sobre a sua evolução são imprecisos. Porter *et al.* (2005), em um amplo trabalho sobre a filogenia deste grupo, com base em dados moleculares, revelaram que sua origem ocorreu há ~ 437 milhões de anos e que a radiação dentro do táxon ocorreu rapidamente, há cerca de 325 milhões de anos. A filogenia obtida deste trabalho revela que as sete infraordens são monofiléticas, assim como as duas subordens do táxon. Este estudo, assim como alguns outros realizados com bases morfológicas, confirma a ligação entre as infraordens Anomura e Brachyura, utilizadas neste trabalho, como grupos irmãos, e

da mesma maneira posiciona os Caridea como um grupo basal, quando comparado com as duas infraordens citadas anteriormente.

Ainda segundo Porter *et al.* (2005), os Anomura teriam surgido há mais de 300 milhões de anos. Hoje este grupo distribui-se por vários tipos de ambientes, como os marinhos, estuarinos, terrestres e de águas continentais. Neste último caso, são representados pela família Aeglidae.

Schmitt (1942) acreditava que a origem dos eglídeos poderia ter sido na América do Sul, levando em consideração o grande número de espécies encontradas neste local. Entretanto, a origem mais aceita do gênero refere-se ao Oceano Pacífico, sustentada por alguns trabalhos como Feldmann (1984) e Pérez-Losada (2002). Em seu estudo, Feldmann (1984) descreveu a espécie fóssil *Haumuriaegla glaessneri* encontrada em sedimentos marinhos da Nova Zelândia, datados do Haumurian, Cretáceo superior. Posteriormente Feldmann *et al.* (1986), descreveram o que veio a ser o exemplar fóssil mais antigo deste grupo, *Protaegla miniscula*, registrado em sedimentos do início do Cretáceo (~150 milhões de anos).

Pérez-Losada *et al.* (2002), em um estudo de relações filogenéticas entre anomuros da família Aeglidae, reforçam a origem pacífica dos eglídeos, através da análise de seqüências mitocondriais de espécies de *Aegla* chilenas. Estes resultados sugerem que a invasão da água doce teria ocorrido há ~75 milhões de anos durante a segunda transgressão marinha do Pacífico. Este estudo também dá suporte à hipótese de que a maioria das espécies de *Aegla* apresenta áreas de ocorrência restritas, habitando apenas uma bacia ou geralmente bacias de drenagens adjacentes. As filogenias obtidas mostram uma clara separação de *Aegla papudo* das demais espécies de *Aegla*, e caracterizam a espécie como mais primitiva entre os eglídeos. Entretanto, mais estudos são necessários para a caracterização destas espécies bem como a caracterização das espécies dentro do grande grupo (Pérez-Losada *et al.*, 2002).

Em um estudo de paleobiogeografia, Feldmann (1986), sugere que a dispersão do grupo tenha ocorrido próximo ao Oligoceno. Após a separação da Antártida, Nova Zelândia e América do Sul, as últimas talvez tenham experimentado eventos similares em relação a condições costeiras e climáticas.

Ainda a respeito da dispersão deste grupo, acredita-se que a mudança do ambiente marinho para a água doce tenha sido influenciada por forças ecológicas, ambientais, bem como trocas ambientais associadas com a deriva continental (Feldmann, 1984; Feldmann 1986).

A existência de um único gênero vivo em águas doces continentais, em apenas um continente, com algumas dezenas de espécies que se diferenciam evolutivamente de outras

1.400 espécies da infraordem Anomura (Kaestner, 1980) de vida exclusivamente marinha, lacunar ou estuarina representa um desafio para a pesquisa de âmbito genético e filogenético deste grupo. A aplicação de marcadores moleculares altamente sensíveis, como os microssatélites, em estudos populacionais de Aeglidae poderá fornecer informações detalhadas sobre a estrutura genética das espécies deste grupo, fornecendo subsídios para o entendimento dos processos que levaram a grande diversificação do gênero *Aegla* (figura 1), assim como para identificar as espécies que devem ser priorizadas para conservação.

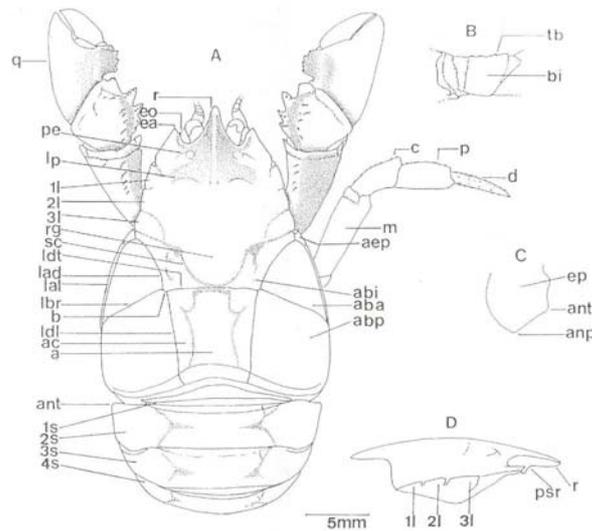


Figura 1 - Vista esquemática de um representante do gênero *Aegla*. A- Vista dorsal da carapaça, do quelípodo e do 2º pereiópodo; B-Vista lateral da base-ísquio do quelípodo; C- Vista lateral do epímero 2; D- Vista lateral da porção anterior da carapaça ( a:auréola; aba: área branquial anterior, abi: área branquial interior; abp: área branquial posterior; ac: área cardíaca; aep: epibranquial ; anp: ângulo posterior da margem ventral do epímero 2; ant: ângulo anterior da margem ventral do epímero 2; b: barra; bi: base-ísquio do quelípodo; c: carpo; d: dátilo (dedo móvel); df: dedo fixo; ea: espinho antero-lateral ; eo- espinho orbital; ep- epímero do 2º segmento abdominal; l- lobo do dedo móvel; lad: linha aeglica dorsal ; lal: linha aeglica lateral; lbr: linha branquial ; ldl: linha dorsal longitudinal; ldt: linha dorsal transversa; lp: lobo protogástrico; m- mero; p- própodo; pe: proeminência epigástrica; psr: processo sub-rostral; q- quela ou mão; r: rostro; rg: região gástrica; sc: suco cervical; tb: tubérculo , escama ou espinho da face ventral do ísquio; 1l: 1º lobo hepático; 2l: 2º lobo hepático, 3l: 3º lobo hepático, 1s: 1º somito abdominal, 2s: 2º somito abdominal; 3s: 3º somito abdominal; 4s: 4º somito abdominal.

## 1.2 Microssatélites

Microssatélite é o termo atualmente mais utilizado para descrever repetições em tandem de seqüências curtas de DNA, com no máximo 6 pares de bases (pb), que têm sido encontradas em todos os organismos estudados (Hancock, 1999).

Hancock (1999) define um microssatélite como uma seqüência repetida de 1 a 6 pb, entretanto Chambers & MacAvoy (2000) sugerem uma definição de 2 a 6 pb para o tamanho da unidade repetida, além do tamanho mínimo de 8 pb para que o arranjo seja considerado um microssatélite. Arranjos com menos de 8 nucleotídeos são considerados seqüências simples crípticas.

Ainda segundo Chambers & MacAvoy (2000) podemos definir as seqüências repetidas em tandem da seguinte forma:

Satélites - segmentos altamente repetitivos de 100 nucleotídeos ou mais formando arranjos altamente uniformes com  $10^3$ -  $10^7$  pb de comprimento,

Minissatélites - segmentos moderadamente repetidos de 10 a 100 nucleotídeos formando arranjos uniformes de  $10^2$  a  $10^5$  pb de comprimento,

Microssatélites - segmentos curtos de 2 a 6 nucleotídeos de comprimento formando arranjos relativamente uniformes de até aproximadamente  $10^2$  pb de comprimento.

Arranjos de mononucleotídeos: trechos uniformes de um único nucleotídeo, de qualquer tamanho.

Os microssatélites podem ser classificados quanto à presença ou ausência de interrupções na unidade repetitiva, e também, quanto à presença de mais de um tipo de unidade repetitiva (Armour *et al.*, 1999):

Microssatélites perfeitos são compostos por um único motivo de repetição sem interrupções ao longo da seqüência repetida (por exemplo, GAGAGAGAGAGAGA).

Microssatélites imperfeitos apresentam uma ou mais repetições que contém uma base que altera o padrão do motivo repetitivo (por exemplo, GAGAGAGACAGAGAGA).

Microssatélites interrompidos apresentam a inserção de um pequeno número de bases que não se complementam na estrutura da repetição (por exemplo, GAGAGAGACCCGAGAGAGA).

Microssatélites compostos consistem de dois ou mais microssatélites adjacentes com motivos repetidos diferentes (CACACACAGATGATGATGATGATGAT).

Microssatélites complexos compreendem misturas de dois ou mais tipos das seqüências descritas acima.

Teoricamente, há 16, 64, 256, 1.024 e 4.096 motivos possíveis para repetições de di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, respectivamente. Entretanto, como os microssatélites são repetidos em tandem (de forma direta), alguns motivos são equivalentes a outros. Duas regras podem ser usadas para identificar se o motivo A é equivalente ao motivo B. O motivo A é considerado equivalente ao motivo B quando (1) o motivo A é inversamente complementar ao motivo B ou (2) o motivo A difere do motivo B ou da seqüência inversamente complementar ao motivo B na matriz de leitura. Por exemplo, (GAAA)<sub>n</sub> é equivalente a (AGAA)<sub>n</sub> ou (AAGA)<sub>n</sub> ou (AAAG)<sub>n</sub> ou (TTTC)<sub>n</sub> ou (TTCT)<sub>n</sub> ou (TCTT)<sub>n</sub> ou (CTTT)<sub>n</sub>. Assim, devido à equivalência entre motivos, é possível considerar a existência de 4, 10, 33, 102 e 350 motivos de repetição para microssatélites de di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, respectivamente (Jin *et al.*, 1994).

### 1.2.1 Origem dos microssatélites nos genomas

A gênese dos microssatélites nos genomas aparentemente não é ao acaso. Duas hipóteses alternativas, mas não mutuamente exclusivas, explicam a origem dos microssatélites. Estas hipóteses sugerem que os microssatélites surgem espontaneamente a partir (ou dentro) de seqüências únicas (microssatélites *de novo*) (Messier *et al.*, 1996) ou que são levados em uma forma primitiva para localizações genômicas receptivas por elementos móveis (microssatélites adotados) (Wilder & Hollocher, 2001).

Microssatélites *de novo* possivelmente se originam através da criação de um proto-microssatélite, isto é, um estágio intermediário com 3 ou 4 unidades repetidas, dentro de seqüências simples crípticas, que são definidas como uma mistura de motivos repetitivos sem um arranjo em tandem claro (Hancock, 1999). Messier *et al.* (1996) relataram o nascimento de um microssatélite a partir da comparação de seqüências ortólogas em 13 espécies de primatas. A partir da seqüência AAATTGTATGTGTGT, uma única substituição nucleotídica nos hominóides, G → A (AAATTGTATGTATGT), ocorreu na seqüência na linhagem do ancestral comum entre os macacos africanos grandes (gorila, bonobo e chimpanzé) e os humanos. Esta substituição gerou um proto-microssatélite (ATGT)<sub>2</sub>, o qual se expande para

(ATGT)<sub>4</sub> nos macacos africanos e para (ATGT)<sub>5</sub> nos humanos. Outra substituição nucleotídica, uma transição A → G (AAATTGTGTGTGTGT) ocorreu nos macacos do Novo Mundo na linhagem levando ao macaco-coruja, criando uma repetição de dinucleotídeos (TG)<sub>6</sub> que se expandiu em uma unidade nesta espécie.

O modelo alternativo de origem dos microssatélites sugere que estas seqüências são adotadas de outros genomas através de elementos transponíveis (TEs) encontrados em abundância em genomas de eucariontes. Estes TEs podem conter um ou mais sítios predispostos à formação de microssatélites, conseqüentemente favorecendo a dispersão destas seqüências repetidas nos genomas (Buschiazzo & Gemmel, 2007).

Há mais de uma década foi demonstrada a associação entre microssatélites e elementos *Alu* e L1, que são respectivamente as seqüências SINE (elementos nucleares dispersos curtos) e LINE (elementos nucleares dispersos longos) mais comuns em mamíferos (Arcot *et al.*, 1995; Nadir *et al.*, 1996; Dufy *et al.*, 1996). A cauda poli-A na extremidade 3' dos elementos SINEs e LINEs de mamíferos fornece um sítio acessível para erros de transcrição reversa, levando à gênese de proto-microssatélites ricos em adenina, que podem posteriormente se expandir (Nadir *et al.*, 1996).

Mais recentemente foi demonstrado o nascimento de microssatélites em insetos dípteros associados a elementos móveis *mini-me* (elementos móveis iniciadores de microssatélites), os quais servem tanto como agentes de dispersão quanto como sítios para a gênese de microssatélites nas regiões 5' e interna do retroposon (Wilder & Hollocker, 2001). Também foi proposto um papel para o elemento móvel MITE (elemento transponível miniatura com repetição invertida) na origem e dispersão de microssatélites em anfíbios anuros (Hikosaka & Kawahara, 2004).

Após o “nascimento” de um microssatélite, ele segue um ciclo de vida, no qual cresce, contrai, degenera e morre (torna-se uma seqüência simples críptica), havendo ainda a possibilidade de renascimento (Amos, 1999; Taylor *et al.*, 1999; Buschiazzo & Gemmel, 2007).

### 1.2.2 Mecanismos mutacionais dos microssatélites

Microssatélites possuem um índice de mutações de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  por geração o que pode ser considerado significativamente mais alto dos que os índices de substituição de bases nitrogenadas (Schlötterer, 2000).

Existem dois modelos, não mutuamente exclusivos, para explicar a hipermutabilidade dos locos de microssatélites: o primeiro envolve deslizamento de uma das fitas do DNA durante a replicação e o segundo envolve recombinação entre moléculas de DNA, isto é, taxa elevada de *crossing-over* desigual entre cromossomos homólogos imperfeitamente alinhados ao longo das repetições de microssatélites (Hancock, 1999).

O primeiro modelo proposto (SSM - Slip Strand Mismatching) propõe que o deslizamento durante a replicação pode ocorrer quando a fita de DNA nascente se dissocia da fita molde e renatura fora de fase. Quando uma seqüência não repetida começa a replicação, caso haja dissociação das fitas nascente e molde não haverá problemas, pois há somente uma direção a qual a fita nascente irá reanelar na fita molde após o deslizamento, mas, se a seqüência replicada é um DNA repetitivo, a fita nascente pode reanelar fora da fase da fita molde. Quando a replicação continua após o deslizamento e renaturação, a eventual fita nascente pode ser maior ou menor do que a fita molde, dependendo de quais foram as bases envolvidas, ou, quais as bases que foram descartadas na fita molde (Hancock, 1999).

O modelo SSM é amplamente aceito como o mecanismo mutacional mais freqüente para os microssatélites, em função de várias evidências que lhe oferecem suporte e contradizem o modelo de *crossing-over* desigual (revisado em Eisen, 1999).

### 1.2.3 Distribuição e frequência de microssatélites nos genomas

Os microssatélites têm uma distribuição não-aleatória nos genomas, devido a diferenças nas suas frequências dentro de regiões codificadoras e não-codificadoras e aos possíveis papéis funcionais desempenhados por diferentes repetições (Li *et al.*, 2002). Nas regiões codificadoras apenas repetições de tri e hexanucleotídeos são encontradas em excesso, o que pode ser explicado pela alta pressão de seleção contra a expansão de repetições que alteram a matriz de leitura e pela eficiência do sistema de reparo nestas regiões (Metzgar & Wills, 2000).

A frequência de microssatélites no genoma varia de acordo com o táxon, em termos de número absoluto de locos e repetições preferenciais (Hancock, 1999). Em plantas a sua frequência é 0,85% em *Arabidopsis* e 0,37% em *Zea mays*, enquanto que em peixes é de 3,21% em *Tetraodon nigroviridis* e 2,12% em *Fugu rubripes* (Crollius *et al.*, 2000). Em *Homo sapiens* a frequência de microssatélites no cromossomo 22 é 1,07%, enquanto que no genoma de *Caenorhabditis elegans* é somente 0,21% (Tóth *et al.*, 2000).

Os microssatélites GT são os mais abundantes em mamíferos e *Drosophila*, seguido por repetições AT e GA (Katti *et al.*, 2001), enquanto em *Arabidopsis thaliana* e leveduras os microssatélites AT prevalecem (Oliveira *et al.*, 2006). Por outro lado, foi observada uma ausência de repetições GC em vários genomas estudados (Dokholyan *et al.*, 2000; Katti *et al.*, 2001).

Quanto à frequência de microssatélites de trinucleotídeos, as repetições CAG são as mais frequentes no genoma humano (Stallings, 1995) e de *Drosophila melanogaster* (Katti *et al.*, 2001), enquanto nos genomas de *C. elegans* e de *A. thaliana* as repetições AAG são mais frequentes (Katti *et al.*, 2001).

### 1.2.4 Importância funcional dos microssatélites nos genomas

Embora os microssatélites sejam considerados como marcadores moleculares evolutivamente neutros, o significado funcional de uma porção substancial dessas seqüências tem sido provado por testes críticos em vários fenômenos biológicos descritos a seguir.

Alguns aspectos da distribuição dos microssatélites apontam para um possível papel na estrutura cromossômica específica de certos táxons. Além disso, essas seqüências repetidas são capazes de formar estruturas de DNA incomuns com padrões simples e complexos de formação de alças. Por exemplo, o grampo formado pela repetição  $(CCG)_n$  presente no X frágil pode ter um efeito regulador importante na expressão gênica, assim como as estruturas secundárias incomuns e estáveis formadas por repetições longas (CAG) e (CTG), após desnaturação e subsequente renaturação, oferecem um mecanismo de desenrolamento das hélices que é vantajoso durante a transcrição e fornece motivos de reconhecimento únicos para proteínas. Em muitas espécies, a região centromérica dos cromossomos é composta por numerosas repetições em tandem, que afetam a organização do centrômero. Microssatélites longos com motivos de mono, di, tri e tetranucleotídeos são altamente agrupados nas regiões centroméricas de algumas espécies. O DNA repetido que flanqueia o centrômero possivelmente desempenha duas funções: coesão de cromátides irmãs e assistência indireta na formação ou função do cinetócoro (revisado em Li *et al.*, 2002).

Na maioria dos organismos as extremidades dos cromossomos consistem de repetições em tandem de seqüências simples de DNA, constituindo os telômeros. A maioria das seqüências teloméricas repetidas é curta, geralmente de 5 a 8 pares de bases; por exemplo, em mamíferos o telômero apresenta um microssatélite hexanucleotídico TTAGGG (Zakian, 1995).

Além do possível papel dos microssatélites na organização da cromatina, também há evidências sobre a participação de microssatélites na regulação de processos metabólicos do DNA. Repetições de dinucleotídeos podem ser sítios preferenciais de recombinação devido a sua alta afinidade por enzimas que participam desse processo. Algumas seqüências de microssatélites poderiam influenciar a recombinação diretamente por seus efeitos na estrutura do DNA. Proteínas que se ligam a repetições GT, CA, CT, GA, GC ou AT poderiam participar no processo de recombinação através da indução de conformação Z ou de outras estruturas secundárias alternativas do DNA. Ainda, o número de unidades repetidas do microssatélite também parece influenciar a recombinação. Processos como a replicação do DNA e o ciclo celular também podem ser afetados pela presença de microssatélites (revisado em Li *et al.*, 2002).

Várias linhas de evidências indicam que microssatélites localizados próximos a regiões promotoras podem afetar a atividade gênica. Repetições  $(TC)_n$  em regiões promotoras servem como elementos transcrpcionais de genes ativados por choque térmico em alguns organismos, assim como a deleção de repetições de di, tri e tetranucleotídeos diminuem

significativamente a atividade transcricional de outros genes. Foi demonstrado também que microssatélites em regiões intrônicas podem afetar a atividade transcricional de alguns genes. Em muitos casos, o número de repetições parece ser um fator chave para a expressão gênica e o nível de expressão. Alguns genes podem ser expressos somente com um número específico de repetições, ou com uma amplitude estreita de número de unidades repetitivas, sendo que fora desta amplitude a atividade gênica seria cessada. Outros grupos de genes apresentam níveis de expressão ajustados pela alteração do número de repetições de seu microssatélite regulador em uma amplitude relativamente extensa. Em geral, há um decréscimo na expressão gênica à medida que aumenta o número de repetições, mas há casos em que a expressão aumenta com o aumento do número de unidades repetitivas (revisado em Li *et al.*, 2002).

Outras evidências da participação dos microssatélites na regulação da atividade gênica vêm do fato que algumas destas seqüências repetidas, encontradas em seqüências ativadoras, servem como sítios de ligação para uma variedade de proteínas reguladoras. Além disso, muitos estudos mostraram que os microssatélites podem afetar também a tradução, aumentando ou diminuindo a sua taxa (revisado em Li *et al.*, 2002).

O envolvimento de microssatélites com doenças é notável. Até o momento são conhecidas 14 doenças neurológicas que resultam da expansão de repetições de trinucleotídeos instáveis. Essas doenças incluem casos tanto de alterações nas seqüências não-codificadoras (não-traduzidas) quanto codificadoras (exônicas) de genes. O mecanismo exato que liga as expansões às patologias correspondentes ainda é desconhecido. Possivelmente, incluem uma variedade de mecanismos indo de alterações na estrutura do ácido nucléico e transcrição a alterações na estrutura e função de proteínas (revisado em Masino & Pastore, 2001). A associação de microssatélites instáveis e vários tipos de câncer também é conhecida há bastante tempo, tendo sido primeiramente descrita em casos esporádicos de câncer colo-retal (revisado em Oda *et al.*, 2002). Cerca de 15% dos cânceres colo-retais, assim como de cânceres em vários outros sítios, apresentam instabilidade de locos específicos de microssatélites (Atkin, 2001).

### 1.2.5 Aplicações dos microssatélites

Por serem altamente polimórficos e por apresentarem um padrão de herança mendeliana co-dominante, os microssatélites são amplamente utilizados como marcadores nos campos da biologia, medicina, medicina forense, parasitologia, ecologia e genética de populações. Os marcadores microssatélites fornecem informações relevantes para identificar unidades de conservação e para investigar os processos genéticos que ocorrem em populações, como padrões de fluxo gênico, ocorrência de deriva genética, endocruzamento, entre outros (Oliveira *et al.*, 2006).

### 1.2.6 Isolamento de microssatélites

O isolamento e caracterização de locos de microssatélites é um trabalho bastante exaustivo e caro. Para cada nova espécie que se trabalha, para a qual não se dispõe de genoma seqüenciado, há necessidade de um novo isolamento e caracterização de locos de microssatélites. Esta é a maior dificuldade encontrada quando se deseja utilizar microssatélites como marcadores moleculares.

Várias técnicas têm sido empregadas para o isolamento de microssatélites. Em uma revisão sobre as estratégias de isolamento mais frequentemente utilizadas, Zane *et al.* (2002) verificaram que, apesar de técnicas tradicionais envolvendo *screening* de bibliotecas genômicas parciais através de hibridização com sondas repetitivas ainda serem utilizadas, vários protocolos novos vêm sendo aplicados na tentativa de melhores resultados, em termos de número de clones positivos, custos e esforços empregados. Entre as estratégias mais populares estão os protocolos baseados em hibridização seletiva, a qual é realizada usando um oligonucleotídeo repetitivo como sonda; esta sonda pode ser ligada a uma membrana de náilon ou pode ser biotinizada em uma extremidade de forma que o DNA hibridizado à sonda pode ser seletivamente capturado usando esferas magnéticas recobertas com estreptavidina. O uso de uma sonda biotinizada é geralmente preferido devido a sua grande eficiência em hibridizar ao DNA alvo. Após a hibridização seletiva, os fragmentos recuperados são amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e clonados para posterior

seqüenciamento. A eficiência das metodologias é variável, sendo que as metodologias tradicionais são pouco eficientes e consomem bastante tempo; os protocolos alternativos têm sido preferidos por serem mais eficientes e relativamente mais rápidos (Zane *et al.*, 2002).

Visto que o isolamento e caracterização de locos de microssatélites requerem recursos financeiros e tempo disponível, torna-se mais rápido, fácil e barato a utilização de marcadores microssatélites previamente isolados e caracterizados para espécies filogeneticamente próximas. *Primers* projetados para uma espécie podem ser testados em espécies próximas, e a amplificação cruzada ocorrerá se as regiões flanqueadoras ao loco em estudo, sobretudo as regiões às quais ocorre o anelamento dos *primers*, forem conservadas em relação à seqüência da espécie focal (aquela para a qual os microssatélites foram isolados).

#### 1.2.7 Conservação de locos de microssatélites e potencial de amplificação cruzada entre diferentes espécies

Stallings (1995) estudou a conservação de arranjos de microssatélites (CT)<sub>n</sub> em regiões ortólogas dos genomas de espécies distantes de mamíferos. O autor alinhou 34 locos que puderam ser comparados entre humanos, camundongos, ratos, hamsters, coelhos, vacas, porcos, cachorros, ovelhas e cabras. Para muitos desses locos, as seqüências puderam ser alinhadas entre mais de duas espécies, com um total de 47 comparações. No caso da comparação entre roedores, 88% dos arranjos (CT)<sub>n</sub> eram conservados em regiões ortólogas. Já entre mamíferos distantemente relacionados (entre ordens diferentes), 8 das 39 comparações revelaram que os arranjos estavam próximos da mesma posição equivalente e 3 das 39 comparações mostraram repetições (CT)<sub>n</sub> dentro de 1 kb de posições equivalentes. Assim, o nível de conservação desses microssatélites entre espécies distantes foi de 28% (11 em 39 comparações). Cinco em 9 comparações (56%) entre humanos e outras ordens de mamíferos estavam conservadas em posições ortólogas, indicando que há um nível significativo de conservação dos microssatélites (CT)<sub>n</sub> de humanos em genomas de mamíferos distantemente relacionados (Stallings, 1995).

A observação de que a amplificação cruzada de locos de microssatélites pode se estender a espécies distantemente relacionadas, utilizando um mesmo par de *primers* flanqueadores à repetição, levou à sugestão de que as seqüências flanqueadoras de microssatélites devem estar sob fortes restrições seletivas, possivelmente relacionadas a um

papel funcional para as seqüências repetitivas associadas (Rico *et al.*, 1996). Entretanto, Brohede & Ellegren (1999) observaram que a taxa de substituição nucleotídica nas seqüências flanqueadoras de microssatélites não difere daquela encontrada para íntrons, sugerindo que se os íntrons em geral são seletivamente neutros, as regiões flanqueadoras de microssatélites também devem ser, o que é compatível com o fato de que microssatélites são encontrados principalmente dentro de regiões não-gênicas e não-codificadoras do genoma.

Em uma ampla revisão sobre o potencial e as limitações da transferência de marcadores microssatélites entre espécies, Barbará *et al.* (2007) verificaram que a distribuição da transferência com êxito (amplificação cruzada positiva) entre diferentes espécies é altamente desigual entre os táxons, sendo maior em animais e altamente variável entre plantas florescentes. Répteis, pássaros, mamíferos e invertebrados com exceção de artrópodes apresentam alto índice de sucesso de amplificação cruzada entre espécies dentro de um gênero. O declínio no sucesso de transferência para o próximo nível (entre gêneros dentro de uma família) foi mais abrupto para invertebrados e pássaros comparados a répteis e mamíferos, embora para os pássaros uma porcentagem considerável de marcadores amplificou com sucesso mesmo entre diferentes famílias. Um padrão notável nas plantas é a chance altamente reduzida de amplificação cruzada em monocotiledôneas em comparação com dicotiledôneas. Quando a taxa de amplificação cruzada com sucesso foi avaliada em termos de porcentagem de marcadores polimórficos, pássaros, répteis, peixes, mamíferos e invertebrados com exceção de artrópodes obtiveram melhores resultados dentro de e entre gêneros. As plantas obtiveram resultados claramente piores em relação aos animais, novamente com as dicotiledôneas apresentando mais sucesso na transferência do que as monocotiledôneas (Barbará *et al.*, 2007).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar a amplificação cruzada utilizando *primers* desenvolvidos para locos de microssatélites das espécies de Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura) *Aegla uruguayana* e *Aegla longirostri* em outras espécies de crustáceos decápodos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar a porcentagem de *primers* heterólogos para amplificação de locos de microssatélites que co-amplificam em outras espécies de crustáceos;
- Caracterizar os locos com amplificação cruzada positiva em cada espécie testada, quanto à presença de polimorfismo;
- Verificar se há correlação entre amplificação cruzada positiva e relação filogenética com as espécies das quais os microssatélites foram isolados;
- Verificar se há correlação entre grau de polimorfismo nas espécies com amplificação cruzada positiva e relação filogenética com as espécies das quais os microssatélites foram isolados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem

Diferentes espécies de crustáceos foram coletadas em várias localidades, conforme a tabela 1. Os animais foram crio-sacrificados e conservados em etanol 100%; em alguns casos os animais foram dissecados logo após o sacrifício. Os locais de ocorrência das espécies estudadas estão mostrados na figura 2.

Tabela 1 - Espécies de Crustacea Decapoda estudadas e suas respectivas procedências.

Classificação	Espécies	(N)	Procedência
Anomura: Aeglidae	<i>Aegla camargoi</i> Buckup & Rossi, 1977	4	S. José dos Ausentes, RS
Anomura: Aeglidae	<i>Aegla leptodactyla</i> Bond-Buckup & Buckup, 1994	6	S. José dos Ausentes, RS
Anomura: Aeglidae	<i>Aegla plana</i> Buckup & Rossi, 1977	8	Veranópolis, RS
Anomura: Aeglidae	<i>Aegla platensis</i> Schmitt, 1942	6	Lavras do Sul, RS
Anomura: Aeglidae	<i>Aegla spinipalma</i> Bond-Buckup & Buckup, 1994	12	Vespasiano Correa, RS
Anomura: Aeglidae	<i>Aegla violacea</i> Bond-Buckup & Buckup, 1994	8	Mariana Pimentel, RS
Anomura: Aeglidae	<i>Aegla sp.n.</i>	4	São Pedro do Sul, RS
Anomura: Hippidae	<i>Emerita brasiliensis</i> Schmitt, 1935	12	Imbé, RS
Anomura: Porcellanidae	<i>Pachycheles laevidactylus</i> Ortmann, 1892	4	Ubatuba, SP
Brachyura: Trichodactylidae	<i>Trichodactylus panoplus</i> (von Martens, 1869)	12	Santa Maria, RS
Caridea: Palaemonidae	<i>Macrobrachium amazonicum</i> (Heller, 1862)	7	Centro de Aquicultura da UNESP – Jaboticabal, SP
Caridea: Palaemonidae	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> de Man, 1879	7	Centro de Aquicultura da UNESP – Jaboticabal, SP



Figura 2 – Distribuição de 10 espécies estudadas no estado do Rio Grande do Sul - *Aegla camargoi* (1); *Aegla leptodactyla* (2); *Aegla platensis* (3); *Aegla plana* (4); *Aegla uruguayana* (5); *Aegla violacea* (6); *Aegla spinipalma*, (7) *Aegla longirostri* (8) *Emerita brasiliensis* (9); *Trichodactylus panoplus* (10). As espécies *Macrobrachium amazonicum*, *Macrobrachium rosenbergii* e *Pachycheles laevidactylus* não são mostradas.

### 3.2 Procedimentos laboratoriais

Os animais do gênero *Aegla* foram identificados de acordo com Bond-Buckup & Buckup (1994), os animais do gênero *Macrobrachium* e *Trichodactylus* foram identificados de acordo com Melo (2003) e os animais do gênero *Emerita* e *Pachycheles* foram identificados de acordo com Melo (1999). Após a identificação, os animais foram dissecados sobre o gelo para melhor conservação do material. Foram utilizados tecido muscular e brânquias para extração de DNA total.

#### Extração de DNA

Aos tecidos removidos foram acrescidos 400  $\mu$ L de tampão de lise (Tris-HCl 100mM, EDTA 100 mM, NaCl 250 mM), 100  $\mu$ L SDS 10%, 15  $\mu$ L proteinase K (20 mg/mL) e 10  $\mu$ L de  $\beta$ - mercaptoetanol. Após, as amostras foram colocadas no banho-maria a 65° C por no mínimo quatro horas, segundo Sambrook & Russel, (2001). Foi utilizado o método de extração de DNA com fenol-clorofórmio, com modificações (Bitencourt *et al.*, 2007). As amostras foram posteriormente tratadas com RNase A (20 mg/mL), purificadas com PEG 8.000 13%/NaCl 1.6 M e conservadas a 4° C.

#### Amplificação por PCR

*Primers* desenvolvidos para locos de microssatélites isolados de *Aegla longirostri* (AlCA138 e AlCA135) (Roratto, 2007) e de *Aegla uruguayana* (Au05) (Bitencourt, 2007) foram utilizados em Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para verificação de uma possível amplificação cruzada em outras espécies de crustáceos.

Para o par de *primers* Au05 as reações foram preparadas em um volume total de 15  $\mu$ L contendo aproximadamente 50 ng de DNA total, 100 $\mu$ M de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 10 pmol de cada primer (Au05F: GATAAGGAGTGTGATGGTG, Au05R: AATGACTATGGAACCTTTTG), tampão de amplificação 1X (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>. O programa de amplificação (TD 56/51) constituiu-se de cinco minutos a 94°C, 10 vezes { 1' a 56°C (-0,5°C por ciclo), 1' a 72°C e 1' a 94°C, 1' a 56°C (-0,5°C por ciclo), 1' a 72°C e 1' a 94°C } 1' a 51°, 1' a 72°C e 1' a 94°C, por 20 ciclos, 1' a 51°C e 10' a 72°C.

Para o par de *primers* AlCA138 as reações foram preparadas em um volume total de 15  $\mu$ L contendo aproximadamente 50 ng de DNA, 100 $\mu$ M de cada dNTP, 50mM KCl, 100

mM Tris-HCl, 1 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 20 pmol de cada *primer* (AICA138F:GATTTAGCCACCACTGCCACA e AICA138R: TGAGTGAACGAATGGGTGAA).

O programa de amplificação (TD 63/58) constituiu-se de cinco minutos a 94°C, 10 vezes { 1' a 63°C ( - 5°C por ciclo), 1' a 72°C e 1' a 94°C, 1' a 63°C (-0,5°C por ciclo), 1' a 72°C e 1' a 94°C } 1' a 58°, 1' a 72°C e 1' a 94°C, por 20 ciclos, 1' a 58°C e 10' a 72°C.

Para o par de *primers* AICA135 as reações foram preparadas em um volume total de 15 µL contendo aproximadamente 50 ng de DNA, 50mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0,1mM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> e 20 pmol de cada *primer* (AICA135 F: CATCTCGCTCACGTGCTTTA, AICA135R: TATGAGGGAATGGGGGTGTA).

O programa de amplificação constituiu-se de desnaturação a 94°C por 5', seguido de 30 ciclos de 1' de desnaturação a 94°C, 45'' de anelamento do primer a 60°C e 45'' de extensão a 72° C e extensão final de 5' a 72°C.

#### **Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Para observação de possível amplificação cruzada e da presença de polimorfismo, após a reação de PCR, 5 µL da reação contendo os produtos amplificados foram adicionados a 3 µL de tampão de amostra (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol) e foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (25 cm de comprimento), não-desnaturante, em tampão TEB 1X durante cerca de 24 horas, a 80V.

Após o término da eletroforese, os géis foram transferidos para uma solução de ácido nítrico 1%, na qual permaneceram durante 5 minutos. Em seguida, os géis foram corados com nitrato de prata 0,2% por 20 minutos e revelados em solução de carbonato de sódio 3% e formaldeído 0,05% até a visualização das bandas. A coloração foi interrompida com ácido acético 10% e os géis foram secos entre duas folhas de celofane embebidas em solução de metanol 30% e glicerol 1%.

A amplificação com sucesso dos marcadores testados foi inferida por comparação à amplitude esperada de tamanho do fragmento amplificado para as espécies focais. Nos casos em que foram obtidos produtos de amplificação com pesos moleculares muito superiores ou muito inferiores aos esperados, estes foram considerados inespecíficos, e conseqüentemente, a amplificação cruzada foi considerada sem sucesso. O produto de amplificação do microssatélite AICA135 clonado possui 216 pb e 13 repetições AC, enquanto o produto de amplificação do microssatélite clonado AICA138 possui 246 pb e 17 repetições GA (Roratto

*et al.*, 2007). Já o produto de amplificação do loco Au05 possui 256 pb e 12 repetições CA (Bitencourt *et al.*, 2007). O polimorfismo para cada loco foi avaliado com base na presença de mais de um alelo, identificados em gel de poliacrilamida longo, nos indivíduos de uma mesma espécie com amplificação cruzada positiva.

## **4 ARTIGO**

## AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE LOCOS DE MICROSSATÉLITES EM CRUSTACEA DECAPODA

Tális de Oliveira Silva<sup>1</sup>, Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos<sup>1,2</sup>, Sandro Santos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Curso de Pós-graduação em Biodiversidade Animal, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil

\* autor para correspondência: [marliselbs@gmail.com](mailto:marliselbs@gmail.com)

**Palavras Chave:** Aeglidae, amplificação cruzada, caranguejo de água doce, marcador molecular.

### INTRODUÇÃO

Os membros da família Aeglidae Dana, 1852 são “caranguejos de água doce” amplamente distribuídos na América do Sul meridional, sendo encontrados no Brasil, Argentina, Chile, Uruguai, Paraguai e Bolívia. Pertencem à Infraordem Anomura, e são exclusivos de água doce (Martin & Abele, 1986).

Os eglídeos atuais pertencem a um único gênero, *Aegla* Leach, 1820, consistindo de 63 espécies e subespécies descritas (Bond-Buckup & Buckup, 1994), mas este número pode chegar próximo a 70, em vista de espécies novas que ainda estão sendo descritas. No Brasil 35 espécies são conhecidas, sendo que o Rio Grande do Sul possui o maior número de ocorrências, num total de 21 espécies (Bond-Buckup, 2003).

A existência de um único gênero vivo em água doces continentais, em apenas um continente, com algumas dezenas de espécies que se diferenciam evolutivamente de outras 1.400 espécies da infraordem Anomura (Kaestner, 1980), de vida exclusivamente marinha, lacunar ou estuarina, representa um desafio para a pesquisa de âmbito genético e filogenético deste grupo (Bond-Buckup & Buckup, 1994). Além disso, várias espécies conhecidas estão ameaçadas de extinção (Pérez-Losada *et al.*, 2002), sendo necessária a implementação de medidas conservacionistas. A utilização de marcadores moleculares altamente sensíveis e

informativos como os microssatélites, em estudos populacionais de Aeglidae poderá fornecer informações detalhadas sobre a estrutura genética das espécies deste grupo, fornecendo subsídios para o entendimento dos processos que levaram a grande diversificação do gênero *Aegla*, assim como para identificar as espécies que devem ser priorizadas para conservação.

Microssatélites são seqüências com repetições de um único motivo de nucleotídeos, cuja unidade repetitiva tem de dois a seis pares de bases. Por serem altamente polimórficos, são amplamente utilizados em estudos populacionais podendo revelar detalhes da estrutura genética de populações. Entretanto, o isolamento de microssatélites é uma técnica cara e trabalhosa. A utilização de locos de microssatélites previamente desenvolvidos para espécies próximas é uma alternativa ao isolamento. Quanto mais próxima a relação filogenética entre duas espécies, maior a probabilidade de conservação das seqüências e de amplificação cruzada utilizando *primers* heterólogos. O objetivo deste estudo é testar a amplificação cruzada de locos de microssatélites desenvolvidos para duas espécies de Aeglidae (*Aegla longirostri* e *Aegla uruguayana*) em outras espécies do gênero *Aegla*, assim como em outros crustáceos decápodos, e verificar o seu potencial para aplicação em estudos de genética de populações.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Indivíduos de 7 espécies do gênero *Aegla* foram coletados no estado do Rio Grande do Sul, assim como os espécimes de *Trichodactylus panoplus* e *Emerita brasiliensis*. Indivíduos da espécie *Pachycheles laevidactylus* foram coletados em Ubatuba (SP). Os espécimes de *Macrobrachium amazonicum* e *Macrobrachium rosenbergii* foram obtidos junto ao Centro de Aqüicultura da UNESP – Jaboticabal (SP) (tabela 1). Os animais foram crio-sacrificados e conservados em etanol 100%; em alguns casos os animais foram dissecados logo após o sacrifício. Foram utilizados tecido muscular e brânquias para extração de DNA total. Foi utilizado o método de extração de DNA com fenol-clorofórmio, com modificações (Bitencourt *et al.*, 2007). As amostras foram posteriormente tratadas com RNase A (20 mg/mL), purificadas com PEG 8.000 13%/NaCl 1,6 M e conservadas a 4° C. *Primers* desenvolvidos para locos de microssatélites isolados de *Aegla longirostri* (AICA138 e AICA135) (Roratto, 2007) e de *Aegla uruguayana* (Au05) (Bitencourt, 2007) foram utilizados em Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para verificação de uma possível amplificação cruzada nas outras espécies de crustáceos decápodos. As seqüências dos *primers* utilizados

para cada loco, assim como as condições de amplificação, são as mesmas descritas em Roratto (2007) e Bitencourt (2007). Após a PCR, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (25 cm de comprimento), não-desnaturante, em tampão TEB 1X, durante 24 horas a 80 volts. Após o término da eletroforese, os géis foram transferidos para uma solução de ácido nítrico 1%, na qual permaneceram durante 5 minutos. Em seguida, os géis foram corados com nitrato de prata 0,2% por 20 minutos e revelados em solução de carbonato de sódio 3% e formaldeído 0,05% até a visualização das bandas. A coloração foi interrompida com ácido acético 10% e os géis foram secos entre duas folhas de celofane embebidas em solução de metanol 30% e glicerol 1%.

A amplificação com sucesso dos marcadores testados foi inferida por comparação à amplitude esperada de tamanho do fragmento amplificado para as espécies focais. O polimorfismo para cada loco foi avaliado com base na presença de mais de um alelo nos indivíduos de uma mesma espécie com amplificação cruzada positiva.

## RESULTADOS

Os resultados de amplificação cruzada de locos de microssatélites em Crustacea Decapoda, utilizando *primers* desenvolvidos para *A. longirostri* (AlCA135 e AlCA138) e *A. uruguayana* (Au05), juntamente com a classificação sistemática das espécies estudadas, são apresentados na tabela 1.

O loco AlCA135 foi o que apresentou maior sucesso na transferência entre espécies da família Aeglididae, tendo amplificado em cinco das sete espécies do gênero *Aegla* estudadas e sendo polimórfico em quatro espécies. O loco AlCA138 amplificou em quatro espécies de eglídeos e foi polimórfico para três, já o loco Au05 amplificou em duas espécies, apresentando-se polimórfico em ambas.

Duas espécies, *A. violacea* e *A. plana*, amplificaram com os três pares de *primers* testados. Por outro lado, *A. camargoi* e *Aegla* sp.n. não apresentaram amplificação cruzada para os locos testados.

A eficiência de transferência entre locos de microssatélites dentro da família Aeglididae foi de 52,3% (11 locos com amplificação positiva em 21 tentativas de transferência). Esse valor decaiu para 42,8% (9 em 21) quando se considera apenas os locos polimórficos (tabela 2).

Nenhum dos locos testados apresentou amplificação cruzada para outros membros da Infraordem Anomura (*E. brasiliensis* e *P. laevidactylus*) nem para membros das Infraordens Brachyura e Caridea (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Espécies de Crustacea Decapoda estudadas, classificação, resultados de amplificação cruzada e presença de polimorfismo para cada loco analisado.

Espécies	Classificação	Loco AICA135		Loco AICA138		Loco Au05	
		Amplif.*	Polim.**	Amplif.*	Polim.**	Amplif.*	Polim.**
<i>Aegla camargoi</i> Buckup & Rossi, 1977	Anomura: Aeglidae	0/4	----	0/4	----	0/4	----
<i>Aegla leptodactyla</i> Bond-Buckup & Buckup, 1994	Anomura: Aeglidae	3/6	-	3/6	-	0/6	----
<i>Aegla plana</i> Buckup & Rossi, 1977	Anomura: Aeglidae	4/8	+	5/8	+	5/6	+
<i>Aegla platensis</i> Schmitt, 1942	Anomura: Aeglidae	4/6	+	4/6	+	0/6	----
<i>Aegla spinipalma</i> Bond-Buckup & Buckup, 1994	Anomura: Aeglidae	8/12	+	0/12	----	0/12	----
<i>Aegla violacea</i> Bond-Buckup & Buckup, 1994	Anomura: Aeglidae	7/8	+	6/8	+	4/8	+
<i>Aegla sp.n.</i>	Anomura: Aeglidae	0/4	----	0/4	----	0/4	----
<i>Emerita brasiliensis</i> Schmitt, 1935	Anomura: Hippidae	0/12	----	0/12	----	0/12	----
<i>Pachycheles laevidactylus</i> Ortmann, 1892	Anomura: Porcellanidae	0/4	----	0/4	----	0/4	----
<i>Trichodactylus panoplus</i> (von Martens, 1869)	Brachyura: Trichodactylidae	0/12	----	0/12	----	0/12	----
<i>Macrobrachium amazonicum</i> (Heller, 1862)	Caridea: Palaemonidae	0/3	----	0/7	----	0/3	----
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> de Man, 1879	Caridea: Palaemonidae	0/3	----	0/7	----	0/3	----

\* Número de indivíduos com amplificação positiva/número de espécimes testados.

\*\* + = presença de polimorfismo; - = monomorfismo; ---- = loco sem amplificação cruzada.

Tabela 2 - Porcentagem de marcadores microssatélites com amplificação cruzada e porcentagem de marcadores microssatélites que apresentaram polimorfismo considerando-se diferentes amplitudes taxonômicas.

Amplitude taxonômica	% Amplificação	% Polimorfismo
Entre espécies/dentro do gênero <i>Aegla</i>	52,3	42,8
Entre famílias/dentro da mesma infraordem Anomura	0	-
Entre as infraordens Anomura e Brachyura/ dentro da ordem Decapoda	0	-
Entre as infraordens Anomura e Caridea/dentro da ordem Decapoda	0	-

## DISCUSSÃO

Nos últimos anos os microssatélites tornaram-se os marcadores moleculares mais populares, devido ao seu potencial para estimar vários parâmetros de interesse em diferentes áreas, entre elas a ecologia e a genética de conservação.

Os marcadores moleculares tradicionais, em geral, apresentam força estatística e precisão insuficientes para estimar diferenças genéticas. Em contraste, os microssatélites permitem a detecção de diferenciação com forte suporte estatístico (Oliveira *et al.*, 2006). Além disso, estão entre os poucos marcadores moleculares que permitem aos pesquisadores responder perguntas ecológicas em fina escala (Selkoe & Toonen, 2006).

O emprego de marcadores microssatélites em estudos da família Aeglidae poderá ajudar a solucionar diversas questões relativas à biogeografia e evolução deste grupo. Várias características peculiares dos eglídeos despertam a atenção dos pesquisadores: primeiro, são a única família de crustáceos anomuros inteiramente restrita à região neotropical da América do Sul; segundo, estão incluídos na superfamília Galatheaidea, mas há evidências morfológicas e moleculares que colocam em dúvida essa posição taxonômica; terceiro, várias das espécies conhecidas estão ameaçadas de extinção e quarto, os eglídeos são únicos sob a perspectiva ecológica porque são a única família de anomuros inteiramente restrita a habitats de água doce (Pérez-Losada *et al.*, 2004).

Recentemente, microssatélites foram isolados do genoma de duas espécies de eglídeos, *A. longirostri* (Roratto, 2007) e *A. uruguayana* (Bitencourt, 2007).

Apesar da grande vantagem de se utilizar microssatélites como marcadores moleculares, algumas dificuldades também ocorrem. A metodologia de isolamento e caracterização de microssatélites é laboriosa, pois requer várias etapas. Após o isolamento de

locos de microssatélites do genoma de um organismo, os locos obtidos são avaliados para a projeção de *primers* que flanqueiem a região repetitiva e que serão usados em PCRs para amplificação dos alelos presentes em um indivíduo. Geralmente, nesta etapa, alguns locos são eliminados por apresentarem regiões flanqueadoras ao microssatélite inadequadas para o desenho dos *primers*, seja por serem de extensão curta, seja por serem ricas em AT, resultando em *primers* com baixa  $T_m$  (*melting temperature*) e conseqüentemente, favorecendo a amplificação de produtos inespecíficos durante a PCR, ou ainda porque os pares de *primers* formam dímeros ou alças. Outros locos são eliminados por não corresponderem a seqüências reais do genoma, mas sim a artefatos da técnica de isolamento que geram locos quiméricos (Roratto *et al.*, 2008).

Numa etapa seguinte, os *primers* de um loco são testados em PCRs, onde vários parâmetros (concentração dos *primers*, concentração de  $MgCl_2$ , ciclo da PCR, entre outros) são ajustados para se obter um único produto de amplificação. Nesta fase, alguns pares de *primers* apresentam-se inadequados, sendo necessária a projeção de novos pares para aquele loco. Entretanto, se o loco de microssatélite estiver repetido no genoma, como frequentemente ocorre em borboletas e mariposas (Meglec *et al.*, 2004), não poderá ser utilizado, apesar de todos os esforços de otimização das condições de PCR.

Um loco que apresente regiões flanqueadoras adequadas para o desenho de *primers* e que possa ter suas condições de amplificação estabelecidas de forma a produzir um produto específico, ainda assim pode não ser útil como marcador molecular se apresentar-se monomórfico nas populações testadas. Enfim, dos vários locos isolados, apenas uma proporção será realmente utilizável.

Assim, a possibilidade de transferência de marcadores microssatélites entre espécies próximas é de grande interesse, visto que poupa tempo e recursos. O presente trabalho testou a transferência de dois locos de microssatélites isolados para *A. longirostri* e um loco isolado para *A. uruguayana*, todos os três isolados no Laboratório de Diversidade Genética da UFSM (Roratto *et al.*, 2007; Bitencourt *et al.*, 2007) em sete espécies do gênero *Aegla*, além de mais duas espécies da infraordem Anomura, uma espécie da infraordem Brachyura e duas espécies pertencentes à infraordem Caridea.

A amplificação cruzada, para os três locos testados, foi possível apenas dentro do gênero *Aegla*, sendo que das sete espécies testadas, cinco apresentaram amplificação positiva para pelo menos um loco.

Em geral, o índice de sucesso de amplificação cruzada mostra-se diretamente ligado à distância filogenética entre a espécie da qual o microssatélite foi isolado e a espécie a qual pretende-se obter amplificação do loco (Primmer *et al.*, 2005).

Pérez-Losada *et al.* (2004) analisaram as relações filogenéticas de 64 espécies e subespécies do gênero *Aegla*, utilizando quatro genes mitocondriais e um gene nuclear. As árvores-consenso obtidas através de máxima verossimilhança, máxima parcimônia e análise bayesiana mostraram uma subdivisão do grupo em cinco grandes clados, os quais foram denominados de A a E (Figura 1).

Observando as árvores obtidas pelos autores acima, podemos notar que no clado E encontram-se as espécies *A. longirostri* (da qual dois locos de microssatélites foram isolados, *AlCA135* e *AlCA138*) e *A. plana*, uma das espécies testadas quanto à amplificação cruzada. No clado D encontram-se as espécies testadas *A. platensis* e *A. violacea*, além de *A. uruguayana* (da qual foi isolado o loco *Au05*). No clado C encontram-se as espécies testadas *A. camargoi*, *A. leptodactyla* e *A. spinipalma*. Análises moleculares indicam que a nova espécie *Aegla* sp.n. agrupa no clado E, juntamente com *A. longirostri* (Sandro Santos, comunicação pessoal).

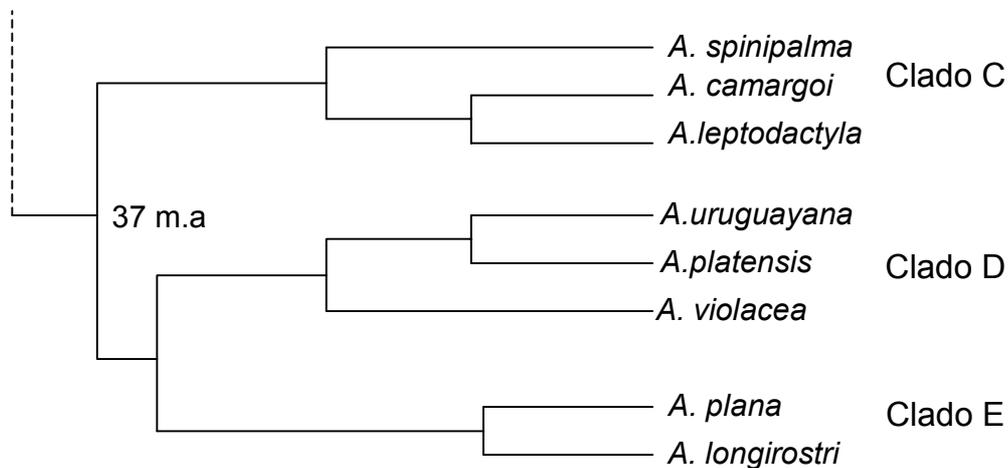


Figura 1. Relações filogenéticas entre oito espécies do gênero *Aegla*. Modificado de Pérez-Losada *et al.* (2004). Para simplificação, apenas parte da filogenia contendo as espécies estudadas e as utilizadas para o isolamento de microssatélites são apresentadas. M.a. = milhões de anos.

Com base nas informações acima, podemos verificar que a amplificação cruzada nem sempre ocorreu conforme o esperado, ou seja, algumas espécies filogeneticamente próximas a uma das espécies focais apresentaram amplificação cruzada positiva, enquanto outras não, ao

mesmo tempo em que algumas espécies filogeneticamente mais distantes de uma das espécies focais apresentaram amplificação cruzada positiva.

Duas espécies apresentaram amplificação cruzada positiva e polimorfismo de alelos para os três locos testados, sendo que uma delas, *A. plana*, é filogeneticamente próxima da espécie focal *A. longirostri*, e a outra, *A. violacea*, é filogeneticamente próxima de *A. uruguayana*.

O fato de *A. platensis* não ter apresentado amplificação cruzada positiva para o loco Au05, mas ter amplificação e polimorfismo para os locos *AlCA135* e *AlCA138* foi surpreendente, visto que *A. platensis* e *A. uruguayana* são espécies-irmãs de acordo com os estudos de Pérez-Losada *et al.* (2004), enquanto que *A. platensis* e *A. longirostri* situam-se em clados separados na filogenia.

Por outro lado, as espécies testadas que se encontram no clado C são filogeneticamente distantes de *A. uruguayana* e de *A. longirostri*. Apesar disso, os resultados foram diversificados para essas espécies. *A. camargoi* não apresentou amplificação cruzada para nenhum dos locos testados. *A. leptodactyla* apresentou amplificação cruzada positiva para os dois locos isolados de *A. longirostri*, entretanto não foram encontradas evidências de polimorfismo para os indivíduos analisados, inviabilizando a utilização desses locos em estudos com essa espécie. Já *A. spinipalma* apresentou amplificação cruzada positiva e polimorfismo de alelos para um dos locos isolados de *A. longirostri* (*AlCA135*).

A nova espécie analisada, a qual é filogeneticamente próxima de *A. longirostri*, não apresentou amplificação cruzada positiva para nenhum dos locos testados.

Pode-se observar na tabela 1 que nenhum dos locos com amplificação cruzada positiva apresentou 100% de sucesso na amplificação, ou seja, não ocorreu amplificação em todos os indivíduos testados de uma mesma espécie, variando de 50 a 87,5% a taxa de sucesso. Vários fatores podem ter sido responsáveis por estes resultados.

Neste estudo as condições de amplificação testadas foram aquelas otimizadas para as espécies focais dos quais os locos de microssatélites foram isolados. Talvez, com a otimização das condições de PCR para cada espécie testada, seja possível obter maior sucesso na amplificação cruzada dos locos de microssatélites, tanto aumentando o número de indivíduos que amplificam para um determinado loco, quanto aumentando o número de espécies que amplificam para um loco.

A ocorrência de alelos nulos, ou seja, de mutações no sítio de anelamento dos *primers*, na região flanqueadora ao microssatélite, pode ser responsável pela não-amplificação em alguns indivíduos de uma espécie, enquanto outros indivíduos apresentam amplificação

positiva. Hedgecock *et al.* (2004) encontraram uma alta frequência de alelos nulos em locos de microssatélites, segregando em famílias multigeracionais da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*, a qual estava correlacionada a um decaimento na habilidade de amplificação cruzada em espécies congênicas.

A presença de substâncias contaminantes nas amostras de DNA também poderia prejudicar a PCR, entretanto este é um fator pouco provável, embora não possa ser excluído, visto que as amostras de DNA, após a extração, foram purificadas para remoção de eventuais inibidores de PCR.

A transferência dos locos de microssatélites para espécies fora da família Aeglidae, entre indivíduos de diferentes infraordens dentro da ordem Decapoda, não obteve sucesso, conforme esperado devido à grande distância filogenética entre esses grupos.

A figura 2 apresenta as relações filogenéticas entre as infraordens de Decapoda e os tempos de divergência estimados entre elas. Podemos observar que a separação entre as linhagens que originaram as infraordens Brachyura e Anomura ocorreu há cerca de 380 milhões de anos e por sua vez, a separação entre a linhagem que originou estas duas infraordens e a que originou a infraordem Caridea ocorreu há cerca de 415 milhões de anos (Porter *et al.*, 2005).

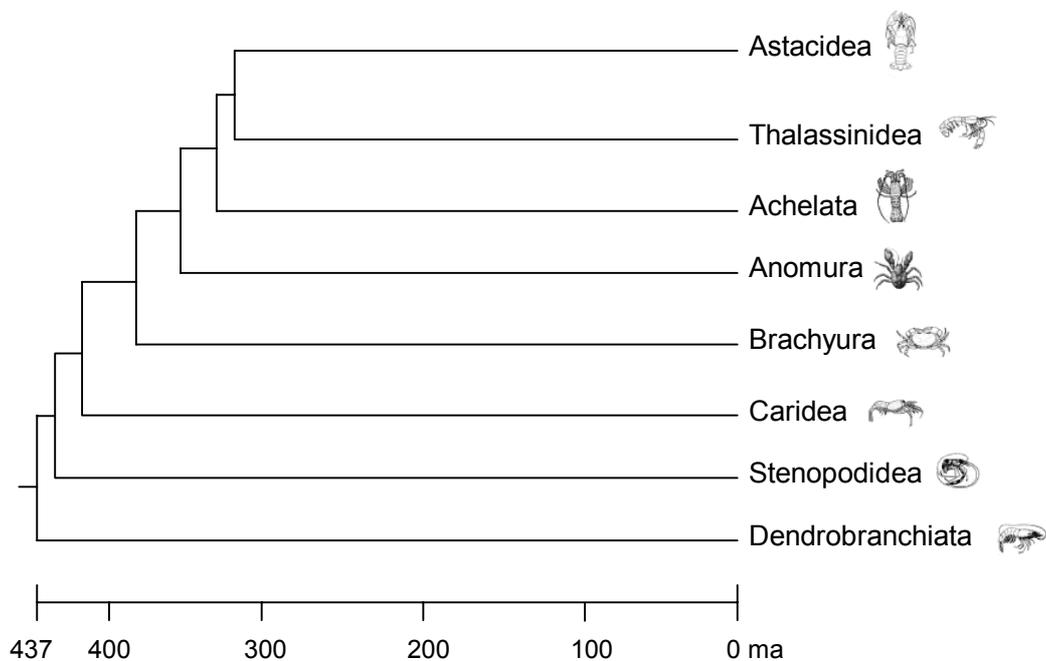


Figura 2. Tempo estimado de divergência entre Decapoda. Modificado de Porter *et al.* (2005). Ma = milhões de anos.

Em uma ampla revisão sobre transferência de locos de microssatélites entre diferentes grupos taxonômicos, Barbará *et al.* (2007) observaram que a taxa média de amplificação

cruzada entre espécies dentro de gêneros foi de 73% e, entre os casos de amplificação cruzada positiva, encontrou-se polimorfismo para 65% dos locos. Quando foi analisada a amplificação cruzada entre gêneros dentro da mesma família o índice de sucesso caiu para 60% e a proporção de locos polimórficos caiu para 43%. A amplificação cruzada positiva entre famílias dentro de ordens foi de 33%, e apenas 28% dos locos que amplificaram apresentaram-se polimórficos. Já o sucesso na amplificação cruzada entre ordens dentro da mesma classe caiu para 6% e em nenhum dos casos de amplificação cruzada positiva foi encontrado polimorfismo.

Estudos sobre transferência de locos de microssatélites em crustáceos também seguem a tendência descrita no trabalho de Barbará *et al.* (2007), embora possa haver algumas exceções.

Seeb *et al.* (2002) isolaram sete locos de microssatélites do caranguejo-rei vermelho *Paralithodes camtschaticus*, um anomuro. Seis locos apresentaram amplificação cruzada positiva no caranguejo-rei dourado *Lithodes aesquispinus*, o qual pertence a mesma família (Lithodidae) da espécie focal. Entretanto, apenas cinco locos amplificaram para a espécie congênica *Paralithodes platypus*. Um único loco apresentou amplificação cruzada positiva para *Labidochirus splendescens* e nenhum loco amplificou em *Pagurus aleuticus*, ambos pertencentes a família Paguridae, a qual está colocada na mesma superfamília (Paguroidea) que a espécie focal. Também não houve amplificação cruzada quando os locos foram testados em *Chionoecetes bairdi*, uma espécie classificada em outra Infraordem (Brachyura).

Seis locos de microssatélites isolados para o lagostim de água doce *Austropotamobius pallipes*, dos quais dois se apresentaram monomórficos nesta espécie, foram testados para amplificação cruzada em duas espécies próximas, *Austropotamobius italicus italicus* e *Austropotamobius italicus carsicus*, sendo que quatro locos amplificaram nestas últimas, inclusive apresentando polimorfismo nos dois locos para os quais a espécie focal apresentou um único alelo (monomorfismo) (Gouin *et al.*, 2000). Os autores ainda testaram a transferência dos locos de microssatélites em oito espécies da infraordem Astacidea (a mesma infraordem da espécie focal), em uma espécie da infraordem Brachyura e em uma espécie da infraordem Anomura. A amplificação cruzada apresentou melhor índice de sucesso entre gêneros dentro da mesma família, do que entre famílias dentro da infraordem Astacidea. Surpreendentemente, houve amplificação cruzada positiva entre as diferentes infraordens, sendo que dois locos amplificaram na espécie *Cancer pagurus* (Brachyura) e dois locos amplificaram na espécie *Galathea strigosa* (Anomura) (um dos locos apresentou-se conservado nas três infraordens). Entretanto, os autores não avaliaram a presença de

polimorfismo, pois analisaram um único espécime de cada espécie e assim, não puderam concluir sobre a utilidade desses locos como marcadores moleculares para as espécies testadas.

No presente estudo, o loco *AICA135* foi o que se apresentou mais conservado entre as espécies estudadas, ocorrendo amplificação cruzada para cinco das sete espécies de eglídeos testadas e apresentando polimorfismo em quatro delas, o que o torna promissor para ser testado em espécies adicionais, em especial naquelas filogeneticamente próximas à *A. longirostri*, do qual foi isolado.

Já o loco *Au05* foi o que apresentou menos conservação de suas regiões flanqueadoras, refletida no menor sucesso de transferência entre espécies, visto que a amplificação cruzada positiva ocorreu apenas em duas espécies.

Locos adicionais de microssatélites, previamente isolados para *A. longirostri*, deverão ser testados nas espécies de eglídeos utilizadas no presente trabalho, assim como também em outras espécies do gênero *Aegla*, para avaliar seus potenciais como marcadores moleculares nos estudos de genética de populações desses organismos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBARA, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, F.M & LEXER, CHRISTIAN.. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v.16, p.3759-3767, 2007.

BITENCOURT, J. T. **Influência de barreiras geográficas na estrutura genética de populações de *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 (Crustacea, Decapoda, Anomura)**. 2007.56 f. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal). Universidade Federal de Sana Maria, Santa Maria.

BITENCOURT, J.V.; RORATTO, P. A.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. .L. & SANTOS, S. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**,v. 50, p. 989-994, 2007.

BOND-BUCKUP, G. Família Aeglidae. Pp. 21–16 in G. A. S. MELO, ed. **Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de Água Doce do Brasil**. São Paulo. Editora Loyola, 2003

BOND-BUCKUP G. & BUCKUP L. A família *Aeglidae* (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**, v.32, p.159-347, 1994.

GOUIN, N.; GRANDJEAN, F.;& SOUTY-GROSSET, C. Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Astacidae) and their potential use in other decapods. **Molecular Ecology**, v. 9(5), p.636-638, 2000.

HEDGECOCK, D.; LI, G.; HUBERT, S.; BUCKLIN, K. & RIBES, V. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal of Shellfish Research**, v. 23(2), p.379-385, 2004.

KAESTNER, A. **Invertebrate Zoology**, Vol. III. Crustacea. Krieger, p. 523, 1980.

MARTIN, J. W.; & ABELE, L. G. Phylogenetic relationships of the genus *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae), with comments on anomuran phylogeny. **Journal of Crustacean Biology**, v.6, p.576-616, 1986.

MEGLECZ, E.; PETENIAN, F.; DANCHIN, E.; D'ACIER. A.C.; RASPLUS, J.-Y. & FAURE, E. High similarity between flanking regions of different microsatellites detected

within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. **Molecular Ecology**, v.13, p.1693–1700, 2004.

OLIVEIRA, E. J.; PADUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; V, R. & VIEIRA, M. L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.

PÉREZ-LOSADA, M.; BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G. & CRANDALL, K. A. Molecular systematics and biogeography of the southern South American fresh-water “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology**, v. 53(5), p.767-780, 2004.

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; BOND-BUCKUP, G. & CRANDALL, K. A. Phylogenetic relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) fresh-water crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22(2), p.304-313, 2002.

PORTER, M. L.; PEREZ-LOZADA, M. & CRANDALL, K. A. Model-based multi-locus estimation of decapod phlogeny and divergence times. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, p.355-369, 2005.

PRIMMER, C. R.; PAINTER, J. N.; KOSKINEN, M. T. & MERILÄ, J. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. **Journal of Avian Biology**, v.36, p.348-360, 2005.

RORATTO, P. A. **Isolamento e caracterização de microssatélites em *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura)**. 2007. 70 f Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal). Universidade Federal de Sana Maria, Santa Maria.

RORATTO, P. A.; BUCHMANN, D.; SANTOS, S. & BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. PCR-mediated recombination in development of microsatellite markers: mechanism and implications. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 58-63, 2008.

SEEB,L.W.; KRETSCHMER, E. J.; OLSEN, J. B.; TEMPLIN, W.; JONES, K. C. & GRANT, W.S. Development of microsatellite loci in red king crab (*Paralithodes camtschaticus*). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p.137–138, 2002.

SELKOE, K.A. & TOONEN, A.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p.615-629, 2006.

## 5 CONCLUSÕES

- A amplificação cruzada positiva utilizando *primers* desenvolvidos para locos de microssatélites de *Aegla longirostri* (AICA135 e AICA138) e *Aegla uruguayana* (Au05) ocorreu somente dentro gênero *Aegla*.
- Dentro do gênero *Aegla*, o sucesso na transferência de locos de microssatélites nem sempre ocorreu da forma esperada, ou seja, nem sempre espécies filogeneticamente mais próximas apresentaram maiores índices de sucesso de amplificação cruzada do que espécies mais distantemente relacionadas.
- Dentre as sete espécies de eglídeos estudadas, duas (*Aegla camargoi* e *Aegla violacea*) poderão ter a estrutura genética de suas populações avaliadas utilizando os locos AICA135, AICA138 e Au05, pois além do sucesso na amplificação cruzada, também apresentaram polimorfismo de alelos.
- O loco AICA135 é o mais promissor para utilização em estudos populacionais de eglídeos, visto que foi o que apresentou maior sucesso de amplificação cruzada, seguido pelo loco AICA138, indicando que as seqüências isoladas do genoma de *A. longirostri* parecem estar mais conservadas do que aquela isolada para *A. uruguayana*.
- O loco Au05 foi o que apresentou o menor índice de sucesso na amplificação cruzada, possivelmente devido à não-conservação de um ou ambos os sítios de anelamento dos *primers* nas regiões flaqueadoras ao microssatélite.
- Os locos avaliados, desenvolvidos para Aeglidae, não apresentaram potencial para aplicação em estudos populacionais de decápodos mais distantemente relacionados, pois não ocorreu amplificação cruzada em espécies de outras infraordens e nem mesmo em outras famílias da infraordem Anomura.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCOT, S.S.; WANG, Z.; WEBER, J.L.; DEININGER, P.L. & BATZER, M.A. *Alu* repeats: a source for the genesis of primate microsatellites. **Genomics**, v. 29, p.136-144, 1995.

ARMOUR, J.; ALEGRE, S. A. & MILES, S. Minisatellites and mutation process in tandemly repetitive DNA. Goldstein, D. B.; Scholtterer, C. (**Microsatellites: Evolution and applications.**) Oxford University Press, Oxford. 1999.

AMOS, W. A comparative approach to the study of microsatellite evolution. In Goldstein, D. B.; Scholtterer, C. (**Microsatellites: Evolution and applications.**) Oxford University Press, Oxford. 1999.

ATKIN, N.B. Microsatellite instability. **Cytogenetic Cell Genetics**, v. 92, p.177-181, 2001.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, F.M & LEXER, CHRISTIAN.. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v.16, p. 3759-3767, 2007.

BOND-BUCKUP, G. BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Arquivos de Zoologia**, v.32, p. 159-347, 1994.

BOND-BUCKUP, G. Família Aeglidae. Pp. 21–16 in G. A. S. MELO, ed. **Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de Água Doce do Brasil**. Editora Loyola, São Paulo. 2003.

BITENCOURT, J. T. **Influência de barreiras geográficas na estrutura genética de populações de *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 (Crustacea, Decapoda, Anomura)**. 2007.56 f. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BITENCOURT, J.V.; RORATTO, P. A.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. .L. & SANTOS, S. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 989-994, 2007.

BROHEDE, J. & ELLEGREN, H. Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 266, p.825-833, 1999.

BUENO, S.L. DE S.; SHIMIZU, R.M. & ROCHA, S. S. Estimating the population size of *Aegla franca* county of Claraval, state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Jornal of Crustacean Biology**, v.27(4), p. 553–559,

BUSCHIAZZO, E. & GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, v. 28, p. 1040-1050, 2007.

CHAMBERS, G. K. & MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.126, p. 455-476, 2000.

CROLLIUS HR, JAILLON O, DASILVA C, OZOUF COSTAZ C, FIZAMES C, FISCHER C, BOUNEAU L, BILLAULT A, QUETIER F, SAURIN W, BERNOT A & WEISSENBACH J Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Research**, v.10, p.939-949, 2000.

DOKHOLYAN, N.V.; BULDYREV, S.V.; HAVLIN, S. & STANLEY, H.E. Distributions of dimeric tandem repeats in non-coding and coding DNA sequences. **Journal of Theoretical Biology**. v.202, p. 273-282, 2000.

EISEN, J.A Mechanistic basis for microsatellite instability In Goldstein, D. B.; Schlotterer, C. ( **Microsatellites: Evolution and applications.**) Oxford University Press, Oxford. 1999.

DUFY, A.J.; COLTMAN, D.W. & WRIGHT, J.M. Microsatellites at a common site in the second ORF of L1 elements in mammalian genomes. **Mammalian Genome**, v.7, p. 386-387, 1996.

FELDMANN, R. M. *Haumuriaegla glaessneri* n.gen. and sp. (Decapoda: Anomura: Aeglidae) from Haumurian (Late Cretaceous) rocks near Cheviot, New Zeland. **New Zeland Journal of Geology and Geophysic**, v. 27, p. 379-385, 1984.

FELDMAN, R. M. Paleontology of two decapod taxa in Southern Hemisphere: Global conclusions with sparse data. Pages 5-19. In: R. H. Gore e K. L Heck. **Crustacean issues, volume 4. Crustacean biogeography**. A. A. Balkena, Rotterdam, The Netherlands. 1986.

HANCOCK, J.M.. Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D. & Schlötterer, C. (eds. **Microsatellites: evolution and applications.**) New York: Oxford University Press. 1999.

HIKOSAKA, A. & KAWAHARA, A. Lineage-specific tandem repeats riding on transposable element of MITE in *Xenopus* evolution: a new mechanism for creating simple sequence repeats. **Journal Molecular Evolution**, v.59, p.738-746, 2004.

JARA, C. G.; LÓPEZ, M. T. A new species of freshwater crab (Crustacea: Decapoda: Anomura) from insular south Chile. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 94(1), p. 34-41, 1981.

JIN, L.; ZHONG, Y. & CHAKRABORTY, R. The exact numbers of possible microsatellite motifs. **Am. The American Society of Human Genetics**, v.55, p. 582-583, 1994.

KATTI, M.V.; RANJEKAR, P.K. & GUPTA, V.S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. **Molecular Biology Evolution**, v. 18, p. 1161-1167, 2001.

KAESTNER, A. **Invertebrate Zoology**, Vol. III. Crustacea. Krieger, 523p, 1980.

LI, Y.-C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A. & NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putational functions, and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p. 2453-2465, 2002.

MASINO, L. & PASTORE, A. A structural approach to trinucleotide expansion diseases. **Brain Research Bulletin**, v.56, p.183-189, 2001.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda do litoral Brasileiro: Anomura, Thalassinidea, Palinuridea e Astacidea**. São Paulo: Plêida/FAPESP.1999

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Edições Loyola: Centro Universitário São Camilo: Museu de Zoologia. 2003

METZGAR, D & WILLS, C. Evidence for the adaptative evolution of mutation rates. **Cell**, v.101, p. 581-584, 2000.

MESSIER, W.; LI, S.H.; & STEWART, C.B. The birth of microsatellites. **Nature**, v.381, p. 483, 1996.

NADIR, E.; MARGALIT, H.; GALLILY, T. & BEN-SASSON, S.A. Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p.6470-6475, 1996.

ODA, S.; MAEHARA, Y.; SUMIYOSHI, Y. & SUGIMACHI, K. Microsatellite instability in cancer: what problems remain unanswered? **Surgery**, v. 131(Suppl.1), p.55-62, 2002.

OLIVEIRA, E. J.; PADUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; V, R. & VIEIRA, M. L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.

PÉREZ-LOSADA, M.; BOND-BUCKUP, G.; JARA, C. G. & CRANDALL, K. A. Molecular systematics and biogeography of the southern South American fresh-water “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology**, v.53(5), p. 767-780, 2004.

PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C. G.; BOND-BUCKUP, G. E CRANDALL, K. A. Phylogenetic relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) fresh-water crabs from Chile. **Journal of Crustacean Biology**, v.22(2), p.304-313, 2002.

PORTER, M. L.; PEREZ-LOZADA, M. & CRANDALL, K. A. Model-based multi-locus estimation of decapod phlogeny and divergence times. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.37, p.355-369, 2005.

RICO, C; RICO, I. & HEWITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. **Proceedings of The Royal Society, Biological Sciences**, v.263(1370), p. 549–557, 1996.

RORATTO, P. A. **Isolamento e caracterização de microssatélites em *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura)**. 2007. 70 f Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal). Universidade Federal de Sana Maria, Santa Maria.

SCHMITT, W. L. The species of *Aegla*, endemic south American fresh-water crustaceans. **Proceedings of the United States National Museum**, v.91(3132), p. 431-524, 1942.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, v.109, p.365-371, (2000).

STALLINGS, R.L Conservation and evolution of (CT)<sub>n</sub>/(GA)<sub>n</sub> microsatellite sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes. **Genomics**, v. (1), p.107-13, 1995

TAYLOR, J.S.; DURKIN, J.M. & BREDEN, F. The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. **Molecular Biology Evolution**, v.16, p. 567-572, 1999.

TÓTH G, GÁSPARI Z & JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p.967-981, 2000.

WILDER, J. & HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molecular Biology Evolution**, v.18 (3), p. 384-392, 2001.

ZAKIAN, V.A. Telomeres: beginning to understand the end. **Science**, v.270, p.1601-1607, 1995.

ZANE, L.; BARGELLONI, L. & PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p. 1-16, 2002.