

# DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE *STEINDACHNERIDION PARAHYBAE*

Ana Caroline Leite<sup>1</sup>; Alejandra Paola Ojeda<sup>2</sup>; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; email: anacarolineleite@live.com <sup>1</sup>

Co-orientadora Universidade de Mogi das Cruzes; email: paolinojeda@hotmail.com <sup>2</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; email: wagner@umc.br <sup>3</sup>

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: Microssatélite; Pesca; Surubim

## INTRODUÇÃO

O surubim do Paraíba é um bagre que se encontra na bacia do Rio Paraíba do Sul, é importante para a pesca profissional e é uma espécie nobre. Necessita de ambientes com água corrente para completar seu ciclo de vida, tem hábitos noturnos, são carnívoros, sua alimentação é composta por peixes e crustáceos (MORAES JÚNIOR & CARAMASCHI, 1993). Apresentam canibalismo e fotofobia de larvas, e podem possuir hábitos migratórios, e correm o risco de extinção devido a intervenções humanas, como construções de barragens, empreendimentos hidrelétricos, poluição, eutrofização, assoreamento, atividades agrícolas, pescas, introdução de espécies exóticas e nativas, fazendo com que o ecossistema sofra uma perda de diversidade genética (AGOSTINHO *et al.*; 2005). Assim, a utilização de marcadores microssatélites é útil para determinar a variabilidade genética, fornecendo informações sobre a quantidade e distribuição da diversidade genética e os processos que determinam a estrutura e a variação dentro e entre populações naturais, sendo portanto, aplicável a estudos de conservação e gestão de recursos biológicos (PROVAN *et al.*, 2001).

## OBJETIVOS

### Geral

Desenvolvimento de loci microssatélites para a espécie *Steindachneridion parahybae*

### Específicos

Fase 1: Análises *in silico* de sequências geradas por meio de pirosequenciamento;

Fase 2: Geração de *primers*, utilizando o software PRIMER 3;

Fase 3: Padronização dos *primers*;

Fase 4: Seleção dos loci polimórficos.

## METODOLOGIA

Inicialmente, foram mapeadas áreas de ocorrência do surubim na região do Rio de Janeiro, abrangendo os municípios de Andrade Pinto (Rio Paraíba do Sul), com 23 indivíduos; Santo Antônio de Pádua (Rio Pombo) com 3 indivíduos; Itaperuna (Rio Muriaé), com 37 indivíduos; Afonso Arinos (Rio Preto), com 5 indivíduos. E, na região de São Paulo, abrangendo somente o município de Lavrinhas (Rio Paraíba do Sul), com apenas um indivíduo (Tabela 1), totalizando 69 indivíduos.

A extração do DNA total foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio descrito por Taggart *et al.* (1992), com uma modificação: o uso do tampão STE (0,1 M NaCl, 0,05M Tris-HCl e 0,01M EDTA, pH 8,0) com menores quantidades de EDTA, visto que este pode quelar o MgCl<sub>2</sub>, reduzindo a eficiência de amplificação pelo PCR. A qualidade e integridade do DNA foram testadas em eletroforese 0,8%, utilizando marcador de peso molecular (Thermo Scientific Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder) e a concentração foi medida por espectrofotometria. As 44 amostras de DNA foram devidamente catalogadas e armazenadas em freezer -20°C.

A sequência genômica da espécie *Steindachneridion parahybae* foi disponibilizada pela empresa francesa, por meio de pirosequenciamento. Em seguida, as análises para desenho dos primers tiveram início.

Os *primers* reverse e forward foram desenhados com auxílio dos programas online IDT DNA e PRIMER 3, de acordo com os seguintes critérios; não conter bases redundantes; estar a uma distância adequada dos SSRs (entre 20 a 60 pb); ser constituídos por 17 a 23 nucleotídeos sem sequências repetitivas; conter uma porcentagem de bases G e C entre 50 a 55 %; começar em 5' e terminar em 3' com duas bases G, ou C, ou G e C, se possível; e ter temperatura de anelamento entre 45 e 60 °C, com diferença máxima de 2 °C entre as temperaturas dos *primers* direto e reverso, de modo que possam ser usados na mesma reação e não sofram auto-hibridização.

Os *primers* escolhidos foram padronizados, utilizando PCR em gradiente de temperatura, e analisados em eletroforese 2,5 %, utilizando marcador de peso molecular (Thermo Scientific Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder), selecionando a melhor temperatura de amplificação.

A análise de marcadores microssatélites para a composição da estrutura genética de populações do surubim do Paraíba baseou-se na utilização de *primers* desenhados para a espécie a partir do pirosequenciamento.

Serão realizadas reações de PCR de teste de gradiente de concentração de MgCl<sub>2</sub>(entre 1,5mM e 3,0mM) e temperatura (entre 56°C e 62°C) para a otimização da amplificação dos *locus* microssatélites. Os produtos amplificados foram visualizados por fluorescência através do LI-COR 4300 e a análise será feita com o programa SAGA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta fase do trabalho, foram utilizados 12 indivíduos de *Steindachneridion parahybae* da localidade do Rio Muriaé, do município de Itaperuna-RJ. As extrações de DNA através do fenol-clorofórmio foram realizadas com sucesso em 8 amostras. Em relação às outras 4 amostras, foi necessário extraí-las por meio do (KIT comercial Macherey-Nagel). Todos os indivíduos apresentaram pouca degradação quando observada em gel de agarose 0,8% e forneceram material suficiente para o desenvolvimento deste trabalho. Foram selecionados e testados 15 pares de *primers*, dos quais 14 amplificaram, sendo 5 dinucleotídeos, 5 trinucleotídeos e 4 tetranucleotídeos. Apenas um não apresentou amplificação (SUR 13) (Tabela 1).

O tamanho dos alelos, em pares de bases foi determinado pelo uso do programa *I Quant Capture 300 – GE*, que estimou o peso molecular das bandas no gel de agarose por comparação com o marcador 100 pb (Fermentas).

As amplificações por PCR foram realizadas para um volume final de 20 µL, contendo 10ng/µL de DNA, 1,25U de TaqDNA polimerase (Fermentas), 1X solução tampão (KCl), 0,25mM de dNTPs, 0,5µM de cada *primers*, 1,5, 2, 2,5 e 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

A maioria dos primers amplificaram a 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, exceto os primers SUR8, 12 e 15 que precisaram de 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, e os *primers* SUR4 e 14 que amplificaram numa concentração de 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. O *primer* SUR9, amplificou a 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Definiram-se também as condições de ciclagem, com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 40 s, temperatura de alinhamento por 1 min, 72°C por 40 s) e extensão final de 72°C por 10 min.

Tabela 1- *Primers* desenvolvidos para *Steindachneridion parahybae*

Loci	Sequência do <i>Primer</i>	Motivo	Tamanho total	Temperatura de anelamento (T°C)/Concentração de MgCl <sub>2</sub> (mM)
SUR 1L SUR 1R	F: 5' CTTTAGATTCATGCAATTTTGTCT 3' R: 5' CCGTACCTACCACACACACA 3'	(GT) <sub>27</sub>	152 pb	56°C 1,5 mM
SUR 2L SUR 2R	F: 5' GGCTTCTGCAGAGAACACAT 3' R: 5' AGCTGTTATAGCTGCGGTGT 3'	(AT) <sub>10</sub>	219 pb	60°C 1,5mM
SUR 3L SUR 3R	F: 5' CCATGTCACACGCGTAAATA 3' R: 5' AATGCTGACTGTTCTGGTAATG 3'	(GT) <sub>9</sub>	153 pb	56°C 1,5 mM
SUR 4L SUR 4R	F: 5' CTGCACTTTGCCTTTTLAGA 3' R: 5' CAGGAAGTCTACGTGCTGGT 3'	(AC) <sub>13</sub>	179 pb	60°C 2,5 mM
SUR 5L SUR 5R	F: 5' TTAATCTTGAAGGTGTGCTTGTG 3' R: 5' GTCCATTAATGCATGTCTGCTT 3'	(TG) <sub>11</sub>	150 pb	54°C 1,5 mM
SUR 6L SUR 6R	F: 5' ACAGAGAGAGCGAGACAGTG 3' R: 5' TGTTTGTCTACTCTCCGTCTG 3'	(AAT) <sub>8</sub>	232 pb	62°C 1,5 mM
SUR 7L SUR 7R	F: 5' GCCATGCTGGTCATATGTAG 3' R: 5' TCTCAGTCGTGTCTTGTGG 3'	(AAT) <sub>7</sub>	158 pb	62°C 1,5 mM
SUR 8L SUR 8R	F: 5' CTCGCACTTGTACCTTACAG 3' R: 5' CATCGGCATGTTTGTTTAGA 3'	(ATT) <sub>11</sub>	142 pb	56°C 2 mM
SUR 9L SUR 9R	F: 5' TCTCACTGTAGTGATGATGAGGA 3' R: 5' CCTGTGTACAGGTCTCACAC 3'	(AAC) <sub>7</sub>	172 pb	58°C 3 mM
SUR 10L SUR 10R	F: 5' TTCCTGCTTGAAAATGAACC 3' R: 5' GACTGCTTGGGTCTGCTTTA 3'	(ATC) <sub>6</sub>	150 pb	54°C 1,5 mM
SUR 11L SUR 11R	F: 5' TGGAAAAGAGCCTGTGGTAG 3' R: 5' TCGCATCAGAGAAACGTGTA 3'	(ATTT) <sub>6</sub>	188 pb	60°C 1,5 mM
SUR 12L SUR 12R	F: 5' TCAGCTATGCTCATTTTGTGG 3' R: 5' GGCAAATTGGATTCAGGTC 3'	(AGAT) <sub>13</sub>	217 pb	60°C 2 mM
SUR 13L SUR 13R	F: 5' GCCACCAACCCATTTATCCATCC 3' R: 5' TGGATATGAGATATGGGGTGGATG 3'	(ATCC) <sub>8</sub>	190 pb	Sem amplificação
SUR 14L SUR 14R	F: 5' CCAATCACACACCAAACAGA 3' R: 5' GGAAGTAGTGAAGAACAAGACT 3'	(ATCT) <sub>8</sub>	217 pb	54°C 2,5 mM
SUR 15L SUR 15R	F: 5' TCCTTCACCCAGAGTCTGTT 3' R: 5' ACAAACGGCGCATTA AAC 3'	(GTTT) <sub>6</sub>	151 pb	58°C 2mM

Todos os *primers Forward (F)* apresentam a sequência M13 5' TGAAAAACGACGGCCAGT 3'.

## **CONCLUSÕES**

Até o presente momento, 14 loci microssatélites foram amplificados com sucesso com as padronizações realizadas. Outros 6 loci estão sendo testados para formar um painel de 20 loci para publicação. Para a próxima etapa os 20 loci serão testados com todas as populações coletadas para avaliação dos índices de variabilidade genética dos loci, tais como heterozigosidade observada e esperada, bem como a frequência alélica. Os resultados a serem publicados serão fundamentais para os estudos genéticos populacionais desta espécie que está em sério risco de desaparecimento e que, por isso, é uma das espécies alvo do PAN- Plano de Ação Nacional do IBAMA para a bacia do Rio Paraíba do Sul.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. 2005. **Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil**. Megadiversidade, 1:1.

MORAES, Jr., D.F.; CARAMASCHI, E.P. 1993. **Projeto de levantamento da ictiofauna do rio Paraíba do Sul e ciclo reprodutivo das principais espécies no trecho a jusante de Três Rios (RJ). II. *Steindachneridion parahybae***. São Paulo, In: Resumos do X Encontro Brasileiro de Ictiologia.

PROVAN, JIM; POWELL, WAYNE & HOLLINGSWORTH, PETER M. 2001. **Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution** *Trends in Ecology and Evolution*, Volumen 16,142-147

TAGGART, J. B., HYNES, R. A., PRODOHL, P. A., & FERGUSON, A., 1992. **A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes**. *Journal of Fish Biology* 40: 963-965.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a UMC pela bolsa de iniciação científica concedida e as fundações FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e FAEP (Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa) pelo auxílio financeiro ao projeto.