

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE *STEINDACHNERIDION PARAHYBAE*

Ana Caroline Leite¹; Fernando Stopato da Fonseca²; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; email: anacarolineleite@live.com¹

Co-orientador Universidade de Mogi das Cruzes; email: stopatofonseca@gmail.com²

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

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: Microssatélite; Pesca; Surubim

INTRODUÇÃO

O surubim do Paraíba é um bagre nobre e que se encontra na bacia do Rio Paraíba do Sul, já foi importante para a pesca profissional e hoje está em risco de extinção. Necessita de ambientes com água corrente para completar seu ciclo de vida, carnívoro noturno que se alimenta de peixes e crustáceos (MORAES JÚNIOR & CARAMASCHI, 1993). Apresenta canibalismo e fotofobia de larvas, e pode possuir hábitos migratórios, e ações antropomórficas podem impedir a sua reprodução, 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 MgCl₂, 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.

Foram realizadas reações de PCR de teste de gradiente de concentração de MgCl₂(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 DNA Analyser 4300, Li-Cor (IR2, Lincoln, Neb. E, As imagens dos geis e o tamanho das bandas foram capturadas e estimados usando o projeto de microssatélites implementados no software SagaGT (Li-cor Biosciences, Lincoln, Nebraska). Por meio do programa HW-QuickCheck, os alelos determinados pelo software SagaGT foram avaliados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (P = 0,05). Após esta avaliação, foram verificados a existência de alelos nulos no programa MicroChecker e o desequilíbrio de ligação (pair *loci*) pelo GenePop. A frequência alélica foi estimada utilizando o programa Coancestry v.1.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados 70 indivíduos de *Steindachneridion parahybae* onde foram extraídos DNA através do fenol-clorofórmio e 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 23 pares de *primers*, dos quais 22 amplificaram, sendo 9 dinucleotídeos, 9 trinucleotídeos e 5 tetranucleotídeos. Sendo que 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 MgCl₂.

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. Dos 23 *primers* testados, somente 22 foram padronizados e amplificados com sucesso. Desta forma, os *primers* foram testados nos 70 indivíduos (por *loci*), onde foram avaliados, levando em consideração a diversidade alélica, heterozigotidade esperada e observada, frequência alélica e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (PHW). Dos *loci* propostos, dezessete foram polimórficos, sendo que o restante eram monomórficos ou não apresentaram nenhum produto de amplificação. O número de alelos por *loci* variou de 2 a 10, com uma média de 4,06. E, uma heterozigotidade esperada de 0,08 a 0,87 e observada de 0,04 a 0,75. E, a frequência alélica foi estimada para a população total e utilizada nos cálculos para o futuro trabalho de sistema de acasalamento. Entretanto, destes 17 *loci* somente 16 foram considerados polimórficos, representativos e/ou se mostraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1- *Loci* desenvolvidos para *Steindachneridion parahybae*.

<i>Loci</i>	Motif	Tamanho dos alelos	N	A	Ho	He	PHW
SUR02	(AT) ₁₀	234-272	38	8	0,7	0,79	0,52
SUR03	(GT) ₉	171-173	68	2	0,09	0,09	0,93
SUR04	(AC) ₁₃	169-193	48	4	0,21	0,27	0,05
SUR05	(TG) ₁₁	170-174	22	3	0,39	0,57	0,27
SUR06	(AAT) ₈	224-230	48	3	0,48	0,59	0,06
SUR07	(AAT) ₇	179-185	48	2	0,58	0,5	0,17
SUR08	(ATT) ₁₁	153-162	48	4	0,75	0,72	0,38
SUR11	(ATTT) ₆	200-212	48	3	0,23	0,21	0,52
SUR12	(AGAT) ₁₃	212-252	48	7	0,75	0,81	0,16
SUR15	(GTTT) ₆	164-172	70	3	0,31	0,37	0,13
SUR16	(AC) ₈	169-171	48	2	0,4	0,37	0,47
SUR17	(AC) ₁₀	163-187	70	7	0,5	0,73	0,0097*
SUR18	(GT) ₁₅	170-196	22	10	0,59	0,87	0,0002*
SUR19	(AC) ₆	175-177	48	2	0,04	0,08	0,06
SUR22	(AAT) ₅	151-190	70	3	0,29	0,28	0,54
SUR23	(GTT) ₄	178-181	70	2	0,1	0,12	0,24

N= Número amostral; A= Número de alelos diferentes; Ho= Heterozigotidade observada; He= heterozigotidade esperada; PHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; * Não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg.

CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos 23 *primers*, sendo que apenas 22 foram eficientemente amplificados com as padronizações realizadas. Destes 22, foram selecionados 17 *loci* polimórficos, entretanto, somente 16 *loci* foram polimórficos, representativos e/ou se mostraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). 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.