

# **CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES PARA PIRAÍBA CAPAPRETA *BRACHYPLATYSTOMA CAPAPRETUM* (SILURIFORMES – PIMELODIDAE), SUBSIDIANDO ESTUDOS POPULACIONAIS**

Adriel Lira CORDEIRO<sup>1</sup>; Kyara FORMIGA DE AQUINO<sup>2</sup>; Jacqueline da Silva BATISTA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientador CPBA/INPA; <sup>3</sup>Co-orientador CPBA/INPA

## **1. Introdução**

Os grandes bagres migradores, conhecidos popularmente como peixes lisos, estão dentro de uma grande parcela de peixes de alto valor comercial para a região Amazônica, por serem comercializados em toda a calha principal do Rio Amazonas e seus tributários (Barthem & Goulding, 2007). Seu ciclo de vida abrange desde o estuário Amazônico, no estado do Pará onde ha maior intensidade de pesca dessas muitas espécies de bagres, à calha principal do Rio Amazonas e às cabeceiras dos rios.

A piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*) é um bagre migrador de grande porte, descrita recentemente com base em caracteres morfológicos e osteológicos (Lunberg & Akama, 2005), de considerável valor no mercado pesqueiro e no mercado de exportação (Barthem & Goulding, 2007). Os padrões de migração do piraíba negra (*B. capapretum*) ainda são desconhecidos, contudo esta espécie pode realizar migração parecida com a dos demais bagres migradores amazônicos (Barthem & Goulding, 2007).

O uso de marcadores moleculares com base no polimorfismo de DNA vem sendo amplamente praticado em estudos populacionais. Entre estes, destacam-se os marcadores moleculares microssatélites ou SSRs (*Simple Sequences Repeats*) (Tautz, 1989) que se baseiam na amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de pequenas quantidades de DNA e compõe a classe de marcadores mais versátil para os estudos populacionais.

Neste contexto, para entendimento de do ciclo de vida e a distribuição de populações naturais, que são cruciais para o delineamento de estratégias de manejo, este projeto teve como objetivo a caracterização de locos SSR previamente desenvolvidos para a piraíba negra (*B. capapretum*).

## **2. Material e métodos**

Foi selecionado o DNA genômico de 43 indivíduos de *B. capapretum* coletados três em Belém (PA), nove em Manaus (AM), oito em Porto Velho (RO), três no Purus (AM), oito em Santarém (PA), cinco em Tefé (AM) e sete em Tabatinga (AM) para a caracterização dos locos microssatélites, do grupo de pesquisa de peixes eletro-sensitivos. As amostras de tecido foram extraídas com Fenol-Clorofórmio e as concentrações de DNA foram estimadas a partir de eletroforese em gel de agarose 0,8%, com comparação à marcadores de bandas conhecidas (DNA fago λ). A amplificação de 35 locos microssatélites, inicialmente foi feita utilizando quatro indivíduos de *B. capapretum*, à temperatura de anelamento 60°C.

Os locos não amplificados ou que apresentaram perfil de genotipagem insatisfatório foram submetidos a gradientes de temperaturas (50° à 66°C). A qualidade e tamanho dos produtos de amplificação foram visualizados e comparados com marcador *Ladder 1kb Plus (Invitrogen)*, em gel de agarose 1,5%.

O produto de PCR dos locos para amplificados foi submetido à eletroforese capilar em Analisador de DNA MegaBACE 1000 (*GE healthcare*), sendo determinados os tamanhos dos alelos com o auxílio de marcador (MegaBACE ET400R). As genotipagens foram analisadas com o auxílio do programa *Fragment Profiler 2.1 (GE HeathCare)*, e os parâmetros genéticos foram estimados através dos programas MSTOOLS v3 (Park 2001), FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 2002) e GENEPOP v4 (Raymond and Rousset 1995).

### **3. Resultados e Discussões**

Dos 35 locos microssatélites analisados, 30 locos amplificaram satisfatoriamente para pelo menos quatro amostras de *B. capapretum*, sendo 16 locos amplificados a 60°C e 14 via gradiente de temperatura (50° à 66°C). Foram genotipados 19 locos SSR com 2 a 35 indivíduos por loco e observados 15 locos polimórficos com presença de 2 a 9 alelos por loco (Tabela 01). Os parâmetros genéticos foram estipulados para seis locos microssatélites (Tabela 02), não sendo observado desequilíbrio de ligação entre estes. Os valores de *Pic* e *He* (Heterozigosidade esperada) foram similares, fortalecendo o conteúdo informativo de polimorfismo dos locos. O loco BC06 foi o que apresentou maiores índices de polimorfismo e diversidade alélica, dentre os locos analisados. Todos os locos apresentaram excesso de heterozigotos, com exceção do loco BC14, o qual está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os maiores valores para coeficiente de endogamia foram evidenciados no loco BC 15. Quanto à amplificação heteróloga, dos 30 locos com amplificação satisfatória para a piraíba negra, oito locos foram testados nas demais seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*, observando-se a presença de quatro locos com amplificação positiva para pelo menos duas espécies do gênero (Tabela 03).

Tabela 01- Locos microssatélites de piraíba capa preta (*Brachyplatystoma capapretum*) com alelos isolados para pelo menos dois indivíduos com tamanho do fragmento em pares de bases (pb), motivo de repetição e temperatura de anelamento (°C), número de indivíduos genotipados, número de alelos observados e variação dos tamanho dos alelos.

LOCO	Motivo de repetição	Temp. Anel	N	Número de Alelos	Tamanho Alelos (pb)
BC02	(CA)21	65,5°	17	5	149-169
BC03	(TG)20	64,5°	3	3	137-175
BC04	(TG)20	65,5°	35	6	266-294
BC05	(TG)7 ta (TG)13	60°	35	6	194-218
BC06	(TG)18 (AG)20	63,5°	23	9	310-322
BC08	(GT)12	60°	31	4	113-123
BC09	(TG)11	63°	3	3	200-210
BC14	(GT)8	60°	10	4	164-224
BC15	(CT)9	60°	11	4	311-335
BC16	(AG)24	62°	4	1	124
BC17	(GT)8	60°	3	1	260
BC18	(GT)21	60°	5	5	146-158
BC19	(GT)7	60°	4	1	251
BC23	(CA)8	60°	3	2	247-251
BC30	(AC)18	61°	2	2	236-242
BC31	(GT)6	61°	3	1	273
BC34	(TG)7	60°	2	2	217-235
BC35	(CA)7	66°	2	1	235
BC36	(AC)8	62,5°	3	2	117-133

Tabela 02- Caracterização de seis locos microssatélites polimórficos para *B.capapretum*.

LOCO	Motivo de repetição	Temp.Anel	N	A	Tamanho (pb)	Ho	He	Fis	Pic	HWE
BC04	(TG)20	65,5°	34	6	266-294	0,5	0,524	0.047	0,475	0.012
BC05	(TG)7 ta (TG)13	60°	33	6	194-218	0,151	0,253	0.405	0,242	0
BC06	(TG)18 (AG)20	63,5°	20	9	310-322	0,7	0,785	0.112	0,734	0.441
BC08	(GT)12	60°	29	4	113-123	0,103	0,222	0.540	0,206	0.008
BC14	(GT)8	60°	8	2	164-224	0,125	0,125	0.000	0,206	-
BC15	(CT)9	60°	9	3	311-335	0,111	0,307	0.652	0,206	0.058

N: Número amostral; A: Número de alelos; Ho: Heterozigosidade observada; He: Heretoziosidade esperada; Fis: Coeficiente de endogamia; Pic: Conteúdo informativo de polimorfismo. HWE: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 03- Amplificação heteróloga de oito locos microssatélites de piraíba negra (*B.capapretum*) em seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*.

Espécie	Locos SSR (BC)								N° locos amplificados
	1	2	4	7	12	16	35	36	
<i>B.filamentosum</i>	Cinza		Cinza	Cinza					3
<i>B.tigrinum</i>	Cinza		Cinza						2
<i>B.juruense</i>	Cinza		Cinza	Cinza					3
<i>B.platynemum</i>	Cinza		Cinza						2
<i>B.vailantii</i>	Cinza	Cinza	Cinza	Cinza					4
<i>B.rouseauxii</i>		Cinza	Cinza	Cinza					3
Espécies amplificadas	5	2	6	4	0	0	0	0	

Cinza: Amplificação positiva; Branco: Não amplifica

#### 4. Conclusões

Os marcadores microssatélites caracterizados neste trabalho tornam-se uma ferramenta em potencial para estudos populacionais tanto para a piraíba negra (*B.capapretum*) quanto para algumas espécies do gênero *Brachyplatystoma*, por apresentarem alto polimorfismo em alguns locos e pelo compartilhamento dessas regiões em outras espécies. Estas informações poderão servir como subsídios para identificação de estoques pesqueiros os quais futuramente poderão ser utilizados no estabelecimento de estratégias de manejo na conservação dessas espécies representam que representam um dos principais focos da pesca comercial na Amazônia. 5. Referências Bibliográficas

#### 5. Referências bibliográficas

Barthem, R ; Goulding, M. 2007. *Um ecossistema inesperado : A Amazônia revelada pela pesca*. Sociedade Civil do Mamirauá. Brasília. 2410p.

Lundberg, J.G. & Akama A. 2005. *Brachyplatystoma capapretum: a New Species of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a Reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae)*. Copeia. pp 492-516.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233-234

Tautz, D. 1989. *Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers*. Oxford. Pp 6463-6471

Park SDE. 2001. *Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection*. University of Dublin, Dublin

Goudet J. 2002. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)*. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248-249