

Caracterização de locos microssatélites para o surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*): Um bagre de importância comercial na Amazônia.

Valdir Ferreira de Paula JUNIOR¹ PIBIC/FAPEAM; Kyara Martins FORMIGA³ CBIO/INPA; Antônio Saulo Cunha Machado³ PPG-Biotecnologia/UFAM; Jacqueline da Silva BATISTA² CBIO/INPA;

1.Introdução

O surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*) é um dos bagres migradores de grande porte chegando a atingir cerca de 1 m de comprimento e 50 kg. Sua carne possui um alto valor comercial em países amazônicos incluindo a Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela, por apresentar excelente qualidade de carne com poucos ossos intramusculares. Devido à sobrepesca, hoje o surubim faz parte da lista de espécies ameaçadas do estado do Rio Grande do Sul. Na região do Estado do Amazonas ela não é considerada ameaçada, mas há sinais de diminuição do seu estoque, fato observado pela queda progressiva do número de animais capturados (Ruffino e Barthem, 1996). Visando o manejo e conservação das populações de *P. punctifer* foram caracterizados locos microssatélites (SSR), que são repetições de 2-6 pares de bases repetidas em fita, são multi-alélicos, codominantes e polimórficos, e através de processos mutacionais possui altas taxas de mutação que variam de 10^{-3} a 10^{-6} nucleotídeos por geração (Hoelzel, 1998). O objetivo geral do trabalho é caracterizar locos microssatélites para *Pseudoplatystoma punctifer*, e verificar o alcance da amplificação heteróloga em outras espécies do mesmo gênero. Os locos caracterizados podem ser aplicados em estudos da estimativa da variabilidade genética dessa espécie.

2.Material e Métodos

Foram selecionadas entre 30 a 40 amostras de DNA genômico de *Pseudoplatystoma punctifer* coletadas ao longo do Rio Purus. As amostras de tecidos musculares foram extraídas seguindo o método Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). As concentrações de DNA foram estimadas a partir da fotodocumentação em gel de agarose 0,8%, após eletroforese por 50 minutos em corrente 80V com comparação à marcadores de concentração conhecidos (DNA fago λ). Foram desenhados *primers* para 20 locos microssatélites com o auxílio do programa WEBSAT (Martins, 2009). A primeira etapa de validação desses *primers* consistiu na amplificação de quatro amostras de DNA genômico de *P. punctifer* a 60°C de temperatura de anelamento. As condições da PCR incluíram Tampão 1x, MgCl₂ a 1,5 mM, 0,2 mM de dNTPs 0,1 μ M do *primer forward* e do *primer* fluorescente, 0,2 μ M do *primer* reverso e 0.05 U de Taq DNA polimerase. O *primer* marcado (fluorescência *Fam* ou *Hex*) é complementar a cauda M13 presente na porção 5' do *Primer Forward* de acordo com o protocolo econômico de genotipagem (Schuelke, 2000). Os Locos SSR não amplificados nessa etapa ou que apresentaram perfil de genotipagem insatisfatório foram submetidos a segunda etapa que consistiu na amplificação dos locos em gradiente de temperatura com o perfil de anelamento variando entre 50°C a 60°C e 58°C a 66°C. O produto da amplificação foi visualizado e comparado com marcador de peso molecular *Ladder 1kb Plus (Fermentas)* em gel de agarose 1,5% após eletroforese por 90 minutos em corrente de 80V. O produto de PCR dos locos amplificados foi submetido a eletroforese capilar em Analisador de DNA MegaBACE 1000 (*GE healthcare*), sendo determinados os tamanhos dos alelos com o auxílio de marcador padrão, com tamanho de fragmentos conhecidos (ET400R). As genotipagens foram analisadas com o auxílio do programa *Fragment Profiler 2.1 (GE HeathCare)*, com o qual foi verificado e identificado os locos polimórficos e o tamanho dos alelos.

3. Resultados e discussão

Dos 20 locos microssatélites, seis foram amplificados a 60°C e três a 66°C de temperatura de anelamento (Tabela 01). Dois locos apresentaram (PFP27, PFP40 e PFP44) perfil de genotipagem satisfatório e utilizados na genotipagem de 4 a 40 indivíduos (Tabela 02).

Tabela 01. Locos microssatélites amplificados de (*Pseudoplatystoma punctifer*) com tamanho do fragmento em pares de bases (pb), motivo de repetição, temperatura de anelamento (T°C) e o tamanho do fragmento (pb).

Primer	T°C Anl	Motivo de repetição	Tamanho (pb)	N
PFP2	66	(ATCT) ₃	320	4
PFP3	66	(TG) ₁₂	385	4
PFP4	60	(AC) ₂₁	190	4
PFP8	66	(CA) ₅ T(AC) ₅	157	4
PFP19	60	(TG) ₇	324	4
PFP27	60	(CT) ₈ (CA) ₁₇	244	26
PFP29	60	(AC) ₇ ag(AC) ₇ ag(AC) ₇	272	4
PFP40	60	(AC) ₂₁	192	4
PFP44	60	(AC) ₆	184	28

Legenda: N = numero de indivíduos genotipados.

Foram obtidos 3 a 15 alelos cujo tamanho variou entre 197 a 272 pb. O loco Ppu27 apresentou o maior numero de alelos (Tabela 2).

Tabela 02. Locos SSR polimórficos isolados para *Pseudoplatystoma punctifer* com variação do tamanho dos alelos (Δ), motivo de repetição, número de indivíduos e número de alelos.

LOCO	Motivo de repetição	T° de Anelamento	NI	N° Alelos	Tam alelos(Δ)
Ppu44	(AC) ₆	60°	28	3	197-209
Ppu27	(CT) ₈ (CA) ₁₇	60°	26	15	248-272

Legenda: NI = numero de indivíduos

4 Conclusão

Dos 20 locos microsatelites isolados para a espécie *Pseudoplatystoma punctifer*, dois locos (PFP27, PFP44) foram polimórficos e caracterizados apresentando entre 3 a 15 alelos, com o tamanho variando de 197 a 272 pb.

5 Referências

- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution, second edition*. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 541 pp.
- Moeser, A.A.; Bermingham, E. 2005. Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish (*Pimelodella chagresi*) (Teleostei: Pimelodidae). *Molecular Ecology Notes*, (5) 363-365.
- Revaldaves, E.; Pereira, L.H.G.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, (5) 463-465.
- Ruffino, M.L.; Barthem, R.B.; Fischer, C.F.A. 2000. Perspectivas do manejo dos bagres migradores na Amazônia. In: Fisher, C.F.A., (Ed.), *Recursos pesqueiros do médio Amazonas: Biologia e estatística pesqueira*. IBAMA. Brasília. (PP). 141-152.
- Ruffino, M.L.; Isaac, V.J. 1995. Life cycle and biological parameters of several brazilian amazon fish species. *The ICLARM Quartely, Fishbyte Section*, (8) 40-45.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor, NY.
- Santos, G.; Ferreira, E.; Zuanon, J. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. Ibama/AM, Provárzea. Manaus, Amazonas.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, (18) 233-234.

Martins WS, Lucas DCS, KFds Neves, Bertoli DJ (2009) WebSat. A web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics* (3) 282-283.