

## OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA COM REGIÕES DE MICROSSATÉLITES PARA *BRACHYPLATYSTOMA CAPAPRETUM* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE).

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

A captura de bagres passou a ser uma das maiores fontes de renda para populações ribeirinhas da Amazônia a partir da década de 70, fazendo destes um importante alvo do comércio local, intensificando-se nas regiões do estuário amazônico. O filhote capa preta (*Brachyplatystoma capapretum*), incluso na ordem Siluriformes, gênero *Brachyplatystoma*, é umas das espécies-alvo da pesca local (Barthem & Goulding, 1997). O filhote capa preta (*B. capapretum*) (Figura 1) é um bagre de grande porte que realiza extensas migrações para completar seu ciclo de vida. Por ser um animal de topo de cadeia, a literatura sugere que suas rotas de migração também estariam associadas à busca dos pequenos cardumes de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillanti*). *B. capapretum* foi recentemente descrito por Lundberg & Akama, 2005 através de sutis diferenças morfológicas e osteológicas de outra espécie de bagre, a piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*). Os marcadores moleculares microssatélites ou SSRs (*Simple Sequences Repeats*) (Tautz, 1989; Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989) demonstram elevado grau de resolução para estudos populacionais, sendo a classe de marcadores mais versátil. Caracterizam-se por apresentarem um número variável de nucleotídeos que se repetem (Brodani *et al.*, 2007). Visando a identificação e caracterização de estoques pesqueiros, subsidiando estudos populacionais, a fim de se balizar políticas e estratégias de manejo sustentável deste recurso, o seguinte projeto propõe a caracterização de uma biblioteca genômica enriquecida, para posterior desenvolvimento de locos de regiões microssatélites para o filhote capa preta.



Figura 1- Filhote capa preta (*Brachyplatystoma capapretum*)

### 2. Material e métodos

A biblioteca enriquecida foi gerada segundo protocolo proposto por Billote *et al.* (1999) com modificações. O DNA plasmidial foi extraído e em seguida seqüenciado com kit de seqüenciamento *Big Dye Terminator* que inclui *Big Dye* (vs 3.1) com tampão apropriado (*Sequencing Buffer5X*) e *Primers T7\_F*(2 $\mu$ M) e *SP6\_R*(2 $\mu$ M). Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas por adição de isopropanol 65% e posteriormente lavadas com etanol 60%. O produto foi centrifugado, resuspenso em 10 $\mu$ l de formamida e eletro-injetado em seqüenciador automático ABI 3130. As seqüências foram analisadas nos programas Chromas 2.33 e Bioedit 5.0.9. O programa WebSat foi utilizado para desenho de *primers* flanqueadores das regiões de microssatélites e caracterização da biblioteca genômica seguindo os seguintes parâmetros: tamanho do *Primer* entre 18 à 23 pb, temperatura de anelamento entre 55°C à 65°C, conteúdo de GC de 50% à 80% e tamanho do fragmento de 100 à 300 pb.

### 3. Resultados e discussão

Foram geradas duas placas de bactérias recombinantes para montagem da biblioteca genômica de *B. capapretum*. Os clones das placas foram amplificados e destes foi verificado, que somente um clone não possui inserto. Foi extraído o DNA plasmidial de uma das placas com os clones contendo insertos de *B. capapretum* (figura 2).

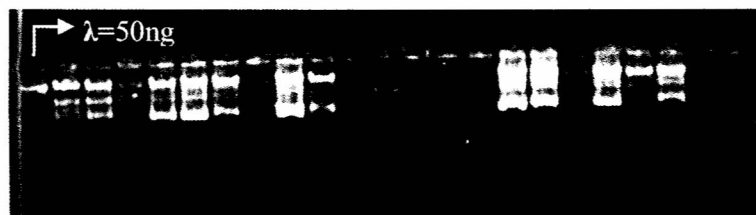


Figura 2- Gel de agarose 0,8% com produto da extração de DNA plasmidial de 20 dos 96 clones recombinantes de uma das placas geradas.

Foram seqüenciados 54 clones (28,12%) de uma das placas, observando quatro clones sem *SSRs* e duas redundâncias. Foi observada a presença de 70 *SSRs*, com mais de um *SSR* em cada clone, sendo que 73% apresentaram composição perfeita, 12,8% imperfeitos, 5,6% compostos perfeitos, 4,3% compostos imperfeitos e 4,3% compostos interrompidos (Figura 3). Quanto ao motivo de repetição, 91% dos microssatélites isolados são Dinucleotídeos, 2,6% Trinucleotídeos, 1,2% Tetranucleotídeos, 1,3% Pentanucleotídeos e 1,3% Hexanucleotídeos (Figura 4).

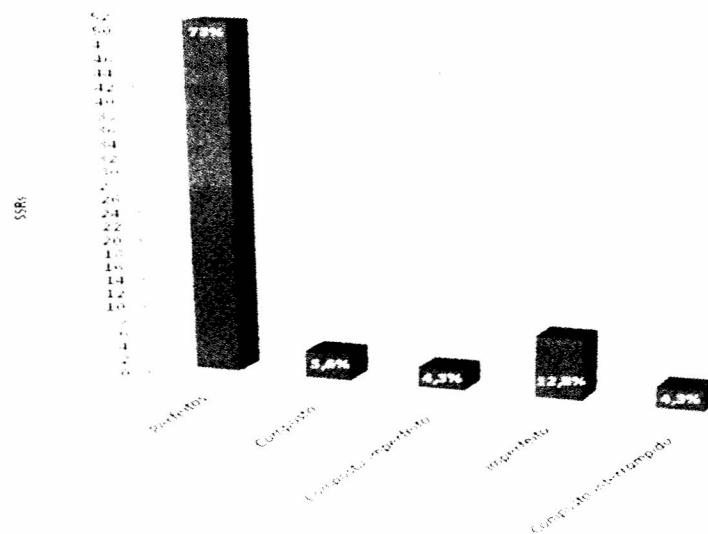


Figura 3 – Natureza dos *SSRs* encontrados nos 54 clones seqüenciados

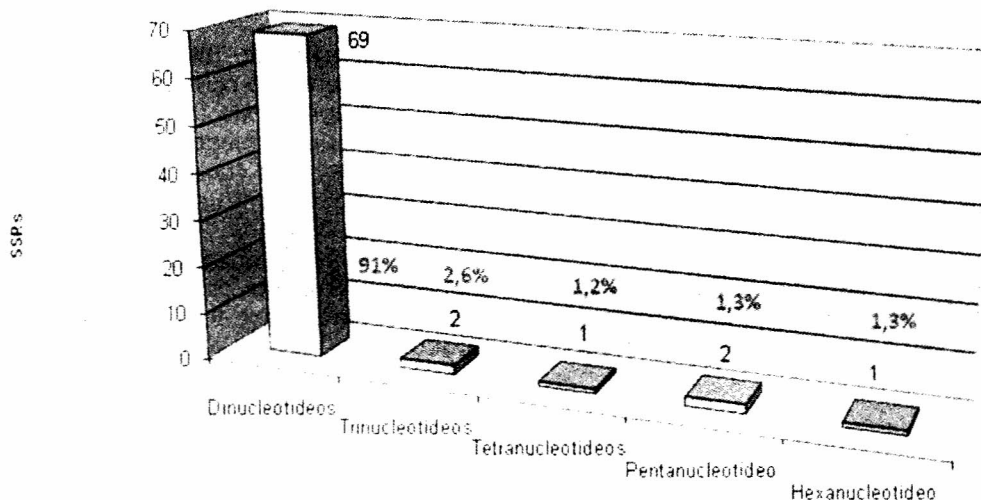


Figura 4 – Unidade de repetição dos *SSRs* encontrados nos 54 clones seqüenciais

O microssatélite com unidade de repetição GT/CA foi encontrado com maior frequência entre as seqüências analisadas. As frequências encontra-se apresentada na figura 5. A partir das seqüências obtidas, foram desenhados 36 pares de *primers* e até o momento, onde 15 destes amplificaram satisfatoriamente com temperatura de anelamento de 60°C (Tabela 1) (Figura 6).

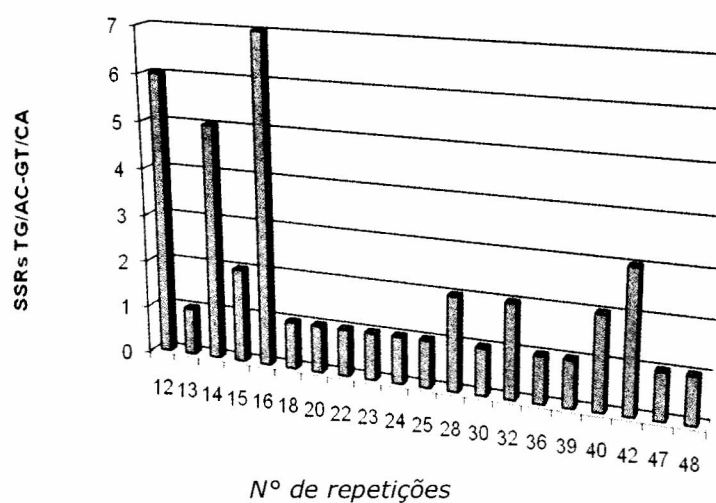


Figura 5- Frequência GT/CA-TG/AC nos SSRs identificados a partir dos clones seqüenciados.

Tabela 1- Locos microssatélites desenvolvidos para a espécie *B. capapretum* amplificados a uma temperatura de 60°C, com o nome dos *primers*, unidade de repetição, tamanho do fragmento (em pares de base) e natureza dos microssatélites.

Primer	Unidade de repetição	Fragmento(PB)	Natureza SSR
BC02F e BC02R	(CA) <sub>21</sub>	185	perfeito
BC03F e BC03R	(TG) <sub>20</sub>	153	perfeito
BC04F e BC04R	(TG) <sub>20</sub>	271	perfeito
BC05F e BC05R	(TG) <sub>7</sub> ta (TG) <sub>13</sub>	174	Interrompido
BC06F e BC06R	(TG) <sub>18</sub> (AG) <sub>20</sub>	348	composto
BC07F e BC07R	(TG) <sub>7</sub> tc (TG) <sub>3</sub> (AT) <sub>10</sub>	334	Composto Interrompido
BC08F e BC08R	(GT) <sub>12</sub>	101	Perfeito
BC09F e BC09R	(TG) <sub>11</sub>	189	Perfeito
BC12F e BC12R	(CA) <sub>12</sub>	339	Perfeito
BC13F e BC13R	(GT) <sub>8</sub>	256	Perfeito
BC14F e BC14R	(GT) <sub>8</sub>	145	Perfeito
BC15F e BC15R	(CT) <sub>9</sub>	307	Perfeito
BC16F e BC16R	(AG) <sub>24</sub>	104	Perfeito
BC17F e BC17R	(GT) <sub>8</sub>	237	Perfeito
BC18F e BC18R	(GT) <sub>21</sub>	143	Perfeito
BC19F e BC19R	(GT) <sub>7</sub>	230	Perfeito

