

Viabilidade de marcadores microsátélites para a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) da amazônia.

Rodrigo Augusto Porto MARINHO¹; Giselle Moura GUIMARÃES²; Jacqueline da Silva BATISTA³; Kyara FORMIGA-AQUINO⁴; Izeni Pires FARIAS⁵; José Antônio ALVES-GOMES⁶

Bolsista PIBIC INPA/CNPQ¹; Bolsista DTI/CNPQ²; Pesquisadora/LTBM/COPE/INPA³; Colaboradora/LTBM/COPE/INPA⁴; Colaboradora/LEGAL/ICB/UFAM⁵; Orientador/INPA⁶.

A piramutaba (Figura 01), é a principal espécie capturada para exportações na Amazônia Brasileira. Sua rentabilidade já atingiu US\$ 13 milhões somente no estuário, onde ocorre a pesca industrial (IBAMA, 1999). Essa espécie possui o comportamento migratório, tendo como região de reprodução as cabeceiras dos afluentes de água branca do rio Solimões/Amazonas, o Estuário Amazônico como área de criação e a Amazônia Central como área de alimentação dos indivíduos adultos e pré-adultos (Barthem & Goulding, 1997). Diferentes experimentos no início dos anos 80 demonstraram que os genomas dos eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetidas, umas mais complexas (minisatélites) e outras mais simples (SSR-*Simple Sequence Repeats*) chamados de marcadores moleculares microsátélites (Hamada *et al.*, 1982). Esses marcadores consistem de pequenas seqüências entre 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas *em tandem*. Em genomas de eucariotos, estas seqüências simples são mais freqüentes, distribuídas ao acaso e formam locos genéticos muito mais polimórficos. Estas características tornam os SSRs ideais para mapeamento genético e físico de genomas, na identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998). O objetivo deste trabalho foi de testar a amplificação heteróloga de 18 marcadores microsátélites desenvolvidos para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) em piramutaba (*B. vaillantii*), a fim de serem utilizados futuramente em estudos de genética populacional e na delimitação de estoques pesqueiros. Foram utilizados entre 2 e 26 indivíduos de piramutaba coletados no alto rio Madeira (arredores de Porto Velho - RO e Cachoeira de Teotônio). O DNA genômico foi extraído seguindo o método com CTAB e clorofórmio (Doyle & Doyle, 1990). A amplificação e genotipagem das amostras foram realizadas segundo o método descrito por Farias *et al.* (2006) e Schuelke (2000). Inicialmente, foi realizada a PCR, utilizando o mesmo perfil de temperatura padronizado para a dourada, utilizando-se 04 indivíduos de piramutaba. Alguns marcadores foram submetidos a testes de gradiente de temperatura de anelamento (entre 49 a 64°) a fim de se obter o produto amplificado. Os locos microsátélites obtidos por amplificação heteróloga foram inicialmente verificados em gel de agarose 1,2% e em seguida genotipados em eletroforese capilar no analisador de DNA Megabace 1000, utilizando um marcador padrão de tamanho de bandas conhecido (*Size standard ET400R, GE Healthcare*). As amostras genotipadas foram analisadas com o auxílio do programa FRAGMENT PROFILER 1.2 (*GE healthcare*) a fim de identificar os marcadores microsátélites polimórficos para a piramutaba (*B. Vaillantii*). Entre os 18 marcadores microsátélites desenvolvidos para dourada (*B. rousseauxii*) e testados em piramutaba, nove amplificaram satisfatoriamente, dentre os quais 07 apresentaram-se polimórficos (Tabela 1). Foram analisados entre 4 a 26 indivíduos coletados no rio Madeira, os quais apresentaram variação no número de alelos entre 2 (BR01 e BR17) a 6 (BR02). Os níveis de heterozigosidade observada apresentaram variação entre 0,0 (BR01) a 0,73 (BR07), os níveis de heterozigosidade esperada entre 0,33 (BR04) a 0,83 (BR10) e três locos apresentaram desequilíbrio de Hardy-Weinberg (BR02 e BR12). A amplificação heteróloga e os níveis de polimorfismo dos marcadores microsátélites da piramutaba, a partir de locos desenvolvidos para a dourada, representam potenciais marcadores moleculares para o estudo da genética populacional e delimitação de estoques pesqueiros dessa espécie no intuito de subsidiar políticas públicas de manejo e conservação da piramutaba na Amazônia.



Figura 01 - Piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Fonte: Batista e Formiga-Aquino, 2004).

Tabela 01 – Caracterização de 07 marcadores moleculares microsátélites de *Brachyplatystoma vaillantii* obtidos por amplificação heteróloga a partir de 18 locos desenvolvidos para *B. rousseauxii*.

Loco	Motivo de Repetição	N	Nº. Alelos	Tamanho (bp)	Temperatura de Anelamento	H_O	H_E
BR01	(GT) ₁₆	02	02	248-276	60° C	0.00	0.66
BR02	(GTGA) ₅ (GA) ₂₀	26	06	178-202	52° C	0.23*	0.65
BR04	(GA) ₁₀ ca (GA) ₅	13	03	253-257	49° C	0.23	0.33
BR07	(TCCA) ₅ tcta (TCCA) ₃	03	03	134-144	57° C	0.73	0.73
BR10	(CA) ₈	02	03	150-188	50° C	0.50	0.83
BR12	(TG) ₁₇	11	05	163-193	60° C	0.46*	0.65
BR17	tc (TG) ₄ tc (TG) ₂ tc (TG) ₃ cg (TG) ₃	21	02	166-188	55° C	0.57	0.42

N = Número de indivíduos; H_O = Heterozigosidade observada; H_E = Heterozigosidade esperada *Desequilíbrio de H-W $P < 0,009$.

Palavras- chave: Piramutaba, SSR, amplificação heteróloga.

Auxílio Financeiro : FAPEAM, CNPq, INPA.

Bibliografias citadas

Barthem, R. B. & Goulding, M. 1997. *Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos*. Brasília-DF: Sociedade Civil Mamirauá, CNPq. 140 p.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1990. *Isolation of plants DNA from fresh tissue Focus*; 13:13-15p.

Fabré, N. N. & Barthem, R. B. 2005. *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas*. Ed. IBAMA/ProVárzea. (Coleção Documentos Técnicos: Estudos Estratégicos) I. Manaus. p.114.

Farias, I. P.; Muniz, L. B.; Astolfi-Filho, S. & Sampaio, I. 2006. Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for *Cynoscion acoupa*, the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil. *Molecular Ecology*, (6) 3: 660-663.

Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª ed. Ed. EMBRAPA, Brasília-DF. 220p.

Hamada, H. *et al.*, 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79:6465 – 6469.

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

IBAMA. 1999. V Reunião do grupo permanente de estudos sobre a piramutaba: realizada em Belém/PA, no período de 26 a 29 de agosto de 1997 Ed. IBAMA. (Coleção Meio Ambiente, série Estudos Pesca nº 26). Brasília-DF. P.92.