

CARACTERIZAÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA E ISOLAMENTO DE MARCADORES DE DNA MICROSSATÉLITES PARA O MAPARÁ – *Hypophthalmus edentatus* (Spix e Agassiz, 1829) (SILURIFORMES: PIMELODIDAE), UM BAGRE DE IMPORTÂNCIA COMERCIAL NA AMAZÔNIA

Aline Souza da SILVA¹
Giselle Moura Guimarães MARQUES²
Kyara Martins FORMIGA³
Jacqueline da Silva BATISTA⁴

¹Bolsista PAIC/FAPEAM; ²Co-orientador CBIO/INPA; ³ Colaboradora CBIO/INPA; ⁴Orientador CBIO/INPA

INTRODUÇÃO

O gênero *Hypophthalmus* compreende quatro espécies válidas até o momento: *H. edentatus*, *H. fimbriatus*, *H. marginatus* e *H. oremaculatus*. Sendo que, três das quatro espécies descritas (*H. edentatus*, *H. marginatus* e *H. fimbriatus*), ocorrem na bacia amazônica e *H. oremaculatus* ocorre na bacia do Paraná. No estado do Amazonas, a produção pesqueira do mapará apresenta-se maior que de outras espécies amplamente comercializadas, como por exemplo: Matrinchã (*Brycon spp.*), pescada (*Plagioscion spp.*), piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*), surubim (*Pseudoplatystoma tigrinum*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pirarucu (*Arapaima gigas*) (Ruffino *et al.* 2006). Segundo os dados obtidos junto ao IBAMA em 2006, mediante as Guias de Comercialização, o mapará foi o terceiro pescado mais exportado pelo Amazonas, com um volume de 1.593,42 t, sendo as regiões Sudeste e Centro-Oeste seus principais destinos (946,98 t e 493,54 t, respectivamente). Levando-se em consideração a crescente e constante pressão de pesca sobre os estoques de mapará, entre os quais, *Hypophthalmus edentatus*, com possíveis consequências ecológicas e econômicas para a região, tornam-se necessários estudos que possibilitem a identificação de estoques pesqueiros desta espécie, para viabilizar a implementação de medidas para o manejo e conservação. Estudos com marcadores moleculares microssatélites têm ajudado bastante na identificação de estoques de peixes, para o conhecimento genético, análise populacional, estudos ecológicos e biogeográficos. Os microssatélites são pequenas sequências com um a seis nucleotídeos, repetidos em *tandem*, distribuídas no genoma nuclear dos organismos eucariotos, são os marcadores moleculares mais polimórficos conhecidos atualmente, por apresentar expressão codominante, taxa de mutação elevada e por serem seletivamente neutros (Estoup *et al.* 1995; Lanzaro *et al.* 1995), permitindo analisar desde indivíduos de mesma espécie até espécies proximamente relacionadas (Moxon 1999). É importante ressaltar que não são encontrados na literatura estudos com marcadores microssatélites para a espécie *Hypophthalmus edentatus*. Caracterizar a biblioteca genômica desenvolvida para *Hypophthalmus edentatus* e isolar marcadores de DNA microssatélites para a espécie pioneiramente, foram os objetivos deste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

A biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites foi construída utilizando o protocolo de Billote *et al.* (1999). Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989) a partir de um único indivíduo. O produto de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) foi gerado para os 192 clones (sendo 96 clones/placa) da biblioteca genômica, utilizando os *primers* T7 (5 μ M) e SP6 (5 μ M), água ultrapura, Tampão 10X, MgCl₂ (25 mM), dNTPs (1mM) e Taq DNA polimerase (5U/ μ l). Foi utilizado o perfil de temperatura: Desnaturação (60 s a 68°C, 90 s a 94°C), seguida de 30 ciclos de 30 s a 93°C, 45 s a 52°C, 90 s a 72°C e extensão final de 180 s por, 68°C, 240 s por 72°C e 20°C ∞ .

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *GelRed* (Biotium) e visualizado em fotodocumentador UV. O tamanho do fragmento foi estimado por comparação ao marcador *Ladder 1kb plus* (Fermentas) e variou de 500 a 1000 pb.

O produto da PCR foi sequenciado utilizando o *primer* T7 (5 μ M) e SP6 (5 μ M), juntamente com o *Kit Big Dye terminator* v3.1 e eletroinjetado em *ABI PRISM 3130XL Automated Genetic Analyzer* (Perkin Elmer, Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas foram analisadas com o auxílio do programa *CHROMAS 2.4* (Technelysium Pty Ltd, 2013), através de eletroferograma, para seleção de sequências nucleotídicas de boa qualidade.

A combinação das sequências nucleotídicas (*forward e reverse*) dos clones recombinantes foi realizada com o auxílio do programa *GENEIOUS* (Drummond *et al.* 2010), gerando os contigs. A identificação e seleção dos contigs que continham regiões microssatélites e desenho dos *primers* foi utilizado o programa *WEBSAT* (Martins *et al.* 2009) com os seguintes parâmetros: Dinucleotídeos repetidos no mínimo 6 vezes, trinucleotídeo 4 vezes, tetranucleotídeo 4, pentanucleotídeo 3, hexanucleotídeo 3. Tamanho mínimo do primer 18 pb, ótimo 21 pb, máximo 24 pb. Temperatura de anelamento

mínima 55°, ótima 60°, máxima 65°. Quantidade mínima de guanina 50% e máxima 80%. Tamanho do fragmento entre 100 e 340pb.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biblioteca genômica de *H. edentatus* totalizou em duas placas (96 clones cada) 192 clones. Destes, 168 clones foram amplificados e sequenciados, sendo obtidos 141 clones com sequência de DNA de boa qualidade. Destes, 123 clones apresentaram um total de 182 microssatélites (Figura 1), sendo que a maioria é do tipo dinucleotídeo (68,2%), seguido do tipo tetranucleotídeo (30,2%) (Tabela 1). Quanto à natureza de repetição: 68,5% são perfeitos, 31% imperfeitos e 0,5% imperfeitos compostos. O motivo de repetição mais freqüente foi do tipo dinucleotídeo TG/CA com 97 microssatélites obtidos (53,2%), sendo que o número de repetição variou entre 6 a 45.

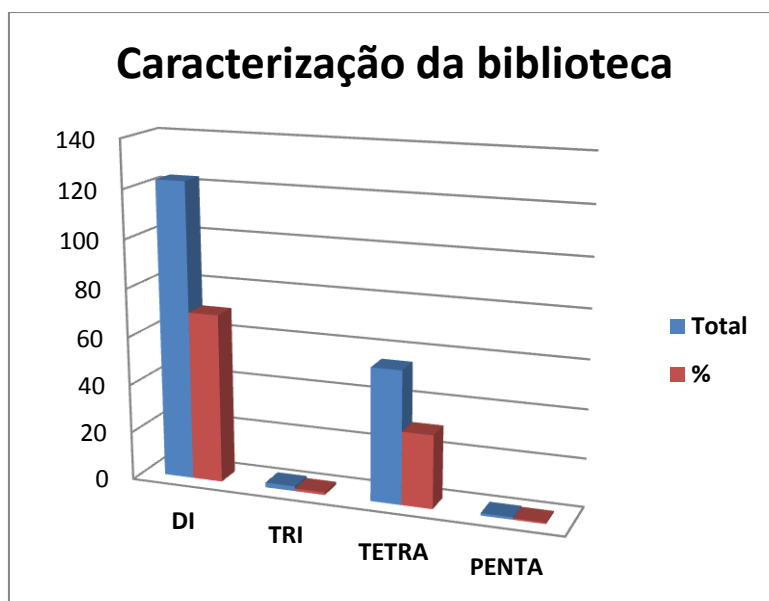


Figura 01. Caracterização da biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites desenvolvida para *Hypophthalmus edentatus* quanto ao motivo de repetição dos microssatélites.

Tabela 01. Caracterização da biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites desenvolvida para *Hypophthalmus edentatus* quanto ao motivo de repetição dos microssatélites e número de repetição.

	Total	%	Número de Repetição
DI	124	68,2	6 – 45
TRI	2	1,1	4 – 6
TETRA	55	30,2	4 – 29
PENTA	1	0,5	3

Do total de 141 sequências, foram obtidos 57 contigs, (com 59,6% de redundância) nos quais 46 possuíam regiões microssatélites, foi possível desenhar *primers* para 45 locos microssatélites (Tabela 2), a partir de 33 sequências nucleotídicas não redundantes. Os *primers* desenhados flanqueiam regiões que apresentaram tamanho médio de 179 pares de bases (pb), sendo a maior com 318 pb e o menor com 101 pb. Com relação aos 45 microssatélites a partir dos quais foram desenhados os *primers*, foi observado que a maioria é do tipo dinucleotídeo (33), seguida do tipo tetranucleotídeo (10) e pentanucleotídeo (1). Quanto à natureza de repetição: 31 perfeitos (70,4%), 12 imperfeitos (27,3%) e 1 imperfeito composto (2,3%). O motivo de repetição mais frequente foi o do tipo dinucleotídeo TG/CA com 26 microssatélites obtidos (57,7%), sendo que o número de repetição variou de 7 a 45.

Tabela 2. Locos microssátélites, para os quais foram desenhados *primers*, de *Hypophthalmus edentatus* com sua nomenclatura, motivo de repetição e tamanho do fragmento.

Nome do loco	SSR	Tamanho do fragmento (pb)
Hed01	(TG) ₉	129
Hed02	(GATG) ₅	311
Hed03	(ATTC) ₆	336
Hed04	(CA) ₁₃	114
Hed05	(TG) ₁₁	243
Hed06	(GATG) ₄	203
Hed07	(TG) ₈	217
Hed08	(GATG) ₄	330
Hed09	(TG) ₃ aa(TG) ₁₀	207
Hed10	(TG) ₁₂	127
Hed11	(GATG) ₆	160
Hed12	(TG) ₃ aa(TG) ₁₁	206
Hed13	(CA) ₂ 1tt(CA) ₃	383
Hed14	(TG) ₁₇ ta(TG) ₁₅ cg(TG) ₁₃	169
Hed15	(CA) ₇	116
Hed16	(GT) ₇	125
Hed17	(CATGT) ₃	303
Hed18	(TG) ₃ aa(TG) ₈	102
Hed19	(TG) ₃ aa(TG) ₇	273
Hed20	(TG) ₃ aa(TG) ₇	344
Hed21	(TG) ₁₂	262
Hed22	(GT) ₃ aa(GT) ₈	153
Hed23	(CA) ₇	118
Hed24	(CA) ₇	102
Hed25	(CA) ₉ tt(CA) ₂ tt(CA) ₃	132
Hed26	(CATC) ₄	272
Hed27	(TG) ₁₂	303
Hed28	(TG) ₉	111
Hed29	(TG) ₃ aa(TG) ₆	289
Hed30	(CA) ₂₂	124
Hed31	(CA) ₂₂ tt(CA) ₃	116
Hed32	(CATC) ₄	225
Hed33	(CA) ₉	144
Hed34	(GT) ₁₀	290
Hed35	(CA) ₆	118
Hed36	(CATC) ₆	257
Hed37	(CA) ₁₂ tt(CA) ₃	224
Hed38	(TG) ₁₃	134
Hed39	(GT) ₁₇	295
Hed40	(CAGT) ₅	296
Hed41	(AC) ₁₆	126
Hed42	(GT) ₁₆ a(TAA) ₆	253
Hed43	(GT) ₂₅	340
Hed44	(CA) ₁₀	195
Hed45	(TTTC) ₂₉	321

pb= pares de bases

Marcadores moleculares microssátélites já foram desenvolvidos para diferentes espécies de peixes amazônicos de importância comercial (Tabela 3).

Tabela 3: Espécies de peixes que ocorrem na região amazônica para as quais há locos microssatélites desenvolvidos e publicados na literatura.

Espécie	Nome Popular	Clones sequenciados	Nº de Locos	Referência
<i>Arapaima gigas</i>	Pirarucu	96	14	Farias <i>et al.</i> (2003)
<i>Brachyplatystoma capapretum</i>	Piraíba negra	96	24	Lira (2013)
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	120	40	Batista <i>et al.</i> (2010)
<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Pirambutaba	387	30	Rodrigues <i>et al.</i> (2009)
<i>Colossoma macropomum</i>	Tamabaqui	192	27	Santos <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Pintado	22	8	Revaldaves <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	Surubim	79	15	Saulo-Machado <i>et al.</i> (2011)
<i>Semaprochilodus insignis</i>	Jaraqui	22	16	Passos <i>et al.</i> (2010)

Para as espécies de bagres amazônicos, Batista *et al.* (2010) isolou e caracterizou microssatélites para a Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*). Para isso, sequenciou 120 clones, nos quais foram encontrados 140 microssatélites e desenhou *primers* para um total de 40 locos microssatélites, sendo que os microssatélites em sua maioria apresentaram motivo de repetição dinucleotídeos (89,29%), seguidos de 4,29% de trinucleotídeos e tetranucleotídeos cada, 1,43% de pentanucleotídeos e 0,71% de hexanucleotídeos. Para o Surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*) Saulo-Machado *et al.* (2010), sequenciaram 79 clones recombinantes, nestes encontraram 100 regiões microssatélites, desenharam *primers* para 42 locos e caracterizaram 15 locos polimórficos, quanto ao motivo de repetição dos microssatélites 95% eram dinucleotídeos e 5% tetranucleotídeos, e quanto a natureza dos microssatélites 79% perfeitos, 16% imperfeitos, 3% interrompidos, 1% composto e 1% interrompido.

No presente estudo, foram amplificados e sequenciados 168 clones recombinantes, destes 123 possuíam regiões microssatélites, a partir destes foi possível obter *primers* flanqueadores para 45 locos, quanto aos microssatélites 75,6% são dinucleotídeos, 22,2% tetranucleotídeos e 2,2% pentanucleotídeo e quanto à natureza de repetição 70,4% são perfeitos, 27,3% imperfeitos e 2,3% imperfeitos compostos, mostrando a eficiência da construção da biblioteca genômica desenvolvida para o *H. edentatus*.

CONCLUSÃO

A biblioteca genômica enriquecida com microssatélites desenvolvida para o *H. edentatus*, teve um rendimento satisfatório e eficiente com o desenho de *primers* para 45 locos microssatélites.

O uso futuro destes marcadores microssatélites em diferentes populações de mapará contribuirá para o estudo da variabilidade, estrutura e genética populacional desta espécie, uma vez que o mapará é um peixe que necessita urgentemente de um melhor conhecimento científico por se tratar de quatro espécies e não se saber qual destas pode estar mais ou menos propensa ao risco de sobrepesca.

REFERÊNCIAS

- Batista, J.S.; Farias, I.P.; Formiga-Aquino, K.; Sousa, A.C.B.; Alves-Gomes, J.A. 2010. DNA microsatellite markers for "dourada" (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genet Resour*, 2: 5–10.
- Billotte, N.; Lagoda, P.J.L.; Risterucci, A.M.; Baurens, F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54(4): 277-288.
- Drummon, D.A.J.; Ashton, B.; Buxton, S.; Cheung, M.; Cooper, A.; Duran, C.; Field, M. Heled, J.; Kearse, M.; Markowitz, S.; Moir, R.; Stones-Havas, S.; Sturrock, S.; Thierer, T.; Wilson, A. 2010. *Geneious*, 5(3). Available from <http://www.geneious.com>.
- Estoup, A.; Garnery, I.; Solignac, M.; Cornuet, J.M. 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140: 679-695.
- Farias, I.P.; Hrbek, T.; Brinkmann, H.; Sampaio, I.; Meyer, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, 3: 128–130.
- Lanzaro, G.C.; Zheng, L.; Toure, Y.T.; Traore, S.F.; Kafatos, F.C.; Vernick, K.D. 1995. Microsatellite DNA and isozyme variability in a west African population of *Anopheles gambiae*. *Insc. Mol. Bio.*, 4: 105-112.

- Lira-Cordeiro, A. 2013. Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae), por meio de marcadores mitocondriais e microsatélites. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 23–24 pp.
- Martins, W.S.; Lucas, D.C.S.; Neves, K.F.S. and Bertoli, D.J. 2009. WebSat - A web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics*, 3(6): 282-283.
- Moxon, E. R., Wills, C. DNA microsatellites: Agents of Evolution? 1999. *Scientific American*.
- Passos, Kelmer Batalha.; Leão, Adam Souza de Alencar.; Oliveira, Deyla Paula de.; Pires Farias, Izeni.; Hrbek, Tomas. 2010. Polymorphic microsatellite markers for the overexploited Amazonian fish, *Semaprochilodus insignis* (Jardine and Schomburgk 1841). *Conservation Genet Resour*, 2: 231–234.
- Revaldaves, Eloisa.; Pereira, Luiz H. G.; Oliveira, Fausto Foresti Claudio. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, 5: 463–465.
- Rodrigues, F.C.; Farias, I.P.; Batista, J.S.; Alves-Gomes, J. 2009. Isolation and characterization of microsatellites loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genet Resour*, 1: 365–368.
- Ruffino, M.L.; Soares, E.C.S.; Silva, C.O.; Barthem, R.B.; Silva, V.B.; Estupiñan, G.; Pinto, W.H. 2006. Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará – 2003. Manaus: IBAMA/ ProVárzea. 76p.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor, NY.
- Santos, M.C.F.; Hrbek, T.; Farias, I. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important 20 keystone species of the Amazon River floodplain. 2008. *Molecular Ecology Resources*, p. 874-876.
- Saulo-Machado, A.C.; Formiga, K.M.; Ortiz, M.F.; Sousa, A.C.B.; Alves-Gomes, J.A.; Batista, J.S. 2011. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). *Conservation Genet Resour*, 3: 307–310.
- Technelysium Pty Ltd. Chromas. (www.technelysium.com.au). Acesso em: 10/10/2013.