

RESUMO EXPANDIDO
XXVI Congresso de Iniciação Científica

DESENVOLVIMENTO DE UM PAINEL DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ESPÉCIE-ESPECÍFICO PARA PIAU-FLAMENGO (*Leporinus fasciatus*)

Claudiane Aparecida Alves Pinheiro¹

Danilo Assunção Vitoriano²

Alexandre Wagner Hilsdorf³

Letícia Rafaela de Moraes⁴

1. Discente do curso de Medicina Veterinária; e-mail: claudianealves2216@gmail.com
2. Discente no Programa de Pós-Graduação; e-mail: danilo.vitoriano3@hotmail.com
3. Docente na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br
4. Doutora pela Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: leti.morais@yahoo.com.br

Área de Conhecimento: Genética animal

Palavras-Chave: Loci; Polimorfismo; DNA; PCR.

Como citar:

Pinheiro CAA, Vitoriano DA, Hilsdorf AW, de Moraes LR. Desenvolvimento de um painel de marcadores microssatélites espécie-específico para piau-flamengo (*Leporinus fasciatus*). Revista Científica UMC [Internet]. 27 de outubro de 2023; 8(2):e080200023.

Disponível em: <https://seer.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/1886>

Fluxo de revisão: o presente resumo expandido foi revisado por pares pela comissão do evento.

Recebido em: 11/09/2023

Aprovado em: 26/10/2023

ID publicação: e080200023

DOI:

Licença CC BY 4.0 DEED

INTRODUÇÃO

O *Leporinus fasciatus*, conhecido popularmente com Piau-flamengo, é um peixe ósseo pertencente a ordem dos *Characiformes* e a segunda família mais diversa do grupo, os anastomídeos (BIRINDELLI et. al., 2020) apresenta grande relevância na pesca artesanal de populações tradicionais ribeirinhas e no ramo de aquarofilia. São amplamente distribuídos nas bacias do Orinoco e Amazônica, rios guianenses, rio Teles Pires que também é conhecido como rio São Manoel e possui uma extensão de aproximadamente 1.400 quilômetros e atua como um divisor territorial dos estados do Mato Grosso, Amazonas e Pará. Ao longo do rio encontra-se cinco UHEs (Usinas hidroelétricas) em operação, sendo elas Colíder, Foz do Apiacás, Sinop, São Manoel, Teles Pires e a Magessi que está planejada, juntas formam o complexo Teles Pires. Segundo Freeman e colaboradores (2001) apontam que a interrupção de cursos de rios para a construção de UHEs e barragens causa alterações na dinâmica físico-química da água e na quantidade de habitats e recursos disponíveis para biota, provocando alterações na estrutura da ictiofauna, principalmente em espécies com hábitos especialistas e migratórios (NAIK & JAY, 2011). A utilização de marcadores genéticos tem sido utilizada a fim de evidenciar a variabilidade dentro e entre populações possibilitando a compreensão dos processos que levam algumas espécies ao isolamento e adaptação de populações locais (HILSDORF & HALLERMAN, 2017), dentre eles os microssatélites, conhecido também como STR (“Short Tandem Repeats”), que se tornou um dos marcadores moleculares mais populares em vários estudos genéticos devido ao seu alto polimorfismo e sua relativa facilidade de obtenção. Tratando-se da espécie *L. fasciatus*, a escassez de conteúdos se acentua, pois no Brasil, informações sobre a estrutura populacional deste indivíduo são insuficientes e os dados disponíveis tratam apenas de espécies campeãs do comércio sendo evidente a importância da aplicação de ferramentas que atuam como um monitoramento da diversidade genética que favorecerá pesquisas futuras aplicada a genética de populações.

OBJETIVO

Desenvolver e validar um painel de iniciadores microssatélites espécie - específicos para robalo-peva, *Leporinus fasciatus*, como ferramenta para futuras análises populacionais.

METODOLOGIA

Foram 30 indivíduos coletados jusante e à montante da UHE de Teles Pires, em um acordo previamente estabelecido com a Usina Hidrelétrica que se responsabilizou pela coleta e envio do material biológico para as análises laboratoriais. A extração de DNA foi feita utilizando nadadeira caudal dos indivíduos, seguindo o protocolo de extração salina (ALJANABI & MARTINEZ, 1997). O DNA das amostras foi verificado quanto sua qualidade, integridade e concentração em gel de agarose a 1% corrido em eletroforese horizontal, utilizando marcadores de peso molecular (Lambda DNA/HindIIIr- Fermentas, 1Kb DNA Ladder Plus Fermentas e Low DNA Mass Ladder - Invitrogen) e por espectrofotometria no aparelho NanoDrop™ One Microvolume (Thermo Scientific™). O painel de loci microssatélites foi desenvolvido por meio das sequências geradas no sequenciador de nova geração Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA), o resultado foi analisado por softwares específicos que forneceram um rascunho genômico que foi submetido ao programa BatchPrimer3 para identificação das sequências que contém STR, bem como desenho dos primers para amplificação via PCR. Foram testados inicialmente 20 loci di, tri e tetranucleotídeos para seleção de 10 loci polimórficos. Os produtos de PCR foram genotipados, usando uma matriz de gel de poliacrilamida desnaturada 6,5% (KB plus 6,5% Gel Matrix, Li-Cor, Biosciences, Lincoln, NE, USA) pelo detector DNA Analyzer 4300, Li-Cor (IR2, Lincoln, NE, USA), utilizando o marcador IRDye®700 e iniciador cauda M13 universal descrito por Schuelke (2000).

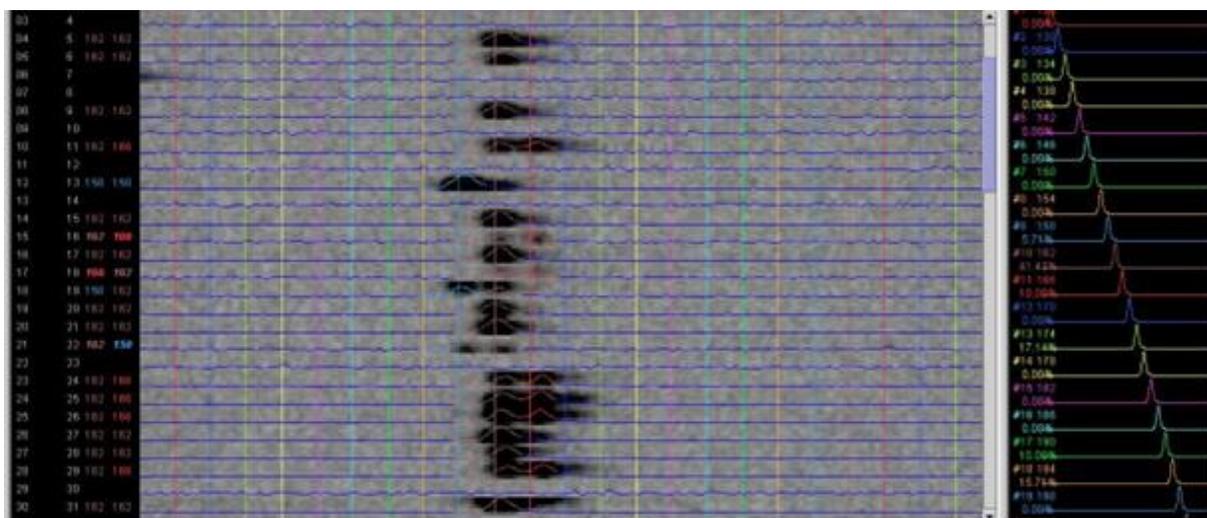
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da seleção dos iniciadores, 20 pares foram prospectados, sendo eles 10 di, 5 tri e 5 tetra nucleotídeos. Todos foram submetidos a testes de gradiente à 54°, 56° e 58° para determinar a melhor temperatura de anelamento, e analisados em gel de agarose a 2%, com marcador de 50pb DNA (Ladder-Sinapse), nesta etapa dois iniciadores foram descartados por não apresentar amplificação. Em seguida foram testados utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase- PCR nas 30 amostras de DNA, a fim de encontrar os mais polimórficos, e genotipados utilizando o aparelho descrito em métodos. Após a análises dos resultados três não apresentaram polimorfismo, já em 11 não atingiram a amplificação desejada, e dos 20 iniciadores testados em seis, descritos na tabela 1, já foi possível observar diferenciação nos tamanhos dos alelos comprovando a presença de polimorfismo.

Tabela 1. Lista de iniciadores selecionados para o painel de marcadores microssatélites espécie específico Piauí-flamengo.

Indentificação do Iniciador	Sequência		Motif	Tamanho do Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento
	Forward	Reverse			
LF_05	TGCTCTCTCCCTCTC TCTC	GCAGGAGGTA TGGTTTC	(TC)	150	58°
LF_07	CGTAATTTTCGCAAT CGTTA	GTGGTCAAATTCT GCTGTG	(GT)	175	58°
LF_10	CCAGGAAATGTGCT GATTA	TTCACTCAATTGA CATGCC	(AT)	150	58°
LF_11	AATGTTATTTCCGG ATTGC	GTCAGAGTCACTG CAGGG	(CAC)	174	58°
LF_12	TTATGGGTTGCTTC ACAGA	GGATGGAAACTG CCTGTAA	(AAT)	148	58°
LF_17	CTGGAGATCCCCTT CATAA	AACTCGTCATTTT GTGTGC	(GTTT)	152	56°

Figura 1 -Gel de poliacrilamida 6,5%, com amostras de DNA avaliadas no aparelho DNA Analyzer e programa SAGA demonstrando as amostras genotipadas e seus respectivos alelos.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi possível encontrar seis loci polimórficos, sendo necessário uma nova seleção e prospecção de novos iniciadores para que seja concluído o painel espécie específico para *Leporinus fasciatus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALJANABI, S.; MARTINEZ, I.; Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, v. 25, p. 4692-4693, 1997.
- BIRINDELLI, J. L. O. et. al. A new endangered species of Megaleporinus (Characiformes: Anostomidae) from the rio de Contas basin, eastern Brazil. *Journal of fish biology*, v. 96, n. 6, p. 1349-1359, 2020.
- FREEMAN, C Evans, CD, Monteith, DT, Reynolds, B., & Fenner, N.. Exportação de carbono orgânico de solos turfosos. *Natureza*, v. 412, n. 6849, pág. 785-785, 2001
- HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. Genetic resources of neotropical fishes. 1ª edição. Editora: Springer, 2017.
- NAIK, P. K.; JAY, D. A. Human and climate impacts on Columbia River hydrology and salmonids. *River Research and Applications*, v.27, n.10, p.1270-6, 2011.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v. 18, p. 233-234, 2000.
- THERMO SCIENTIFIC, T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers (s.d) "Assessment of Nucleic Acid Purity". Disponível em <<http://www.nanodrop.com>>.