

VALIDAÇÃO DE PAINEL DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ESPÉCIE-ESPECÍFICOS PARA CURIMBA (*Prochilodus nigricans*)

Leonardo Willian Gonçalves Ferreira Olímpio¹; Lara Endres da Silva²; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

1. Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: leonardowillianlive@outlook.com
2. Doutoranda da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: lara.endres@gmail.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br

Área de conhecimento: **Genética Animal**

Palavras-chaves: STR; conservação; usina hidrelétrica; peixes neotropicais

INTRODUÇÃO

Entre os anos de 1994 a 1996 a curimba (*Prochilodus nigricans*) esteve na segunda posição no número de desembarques no mercado de Manaus, afirmando a importância da sua preservação do ponto de vista econômico, social e ecológico (MOUNIC-SILVA & LEITE, 2013). Poucas pesquisas genéticas com esta espécie, os estudos mais relevantes utilizam DNA mitocondrial (MACHADO *et al.*, 2017) e microssatélites heterólogos (HENRIQUES, 2014), sendo assim apresentam sérias limitações do ponto de vista do manejo devido à herança apenas materna do mtDNA e os possíveis vieses causados pelos microssatélites heterólogos. A falta de trabalhos abre precedentes para possíveis danos em decorrência da instalação de barragens de usinas hidrelétricas nos principais rios da bacia amazônica (AGOSTINHO *et al.*, 2016). Visto isso, é grande a necessidade de analisar a genética de populações sob influência desses empreendimentos e para isso os marcadores moleculares são instrumento viáveis para a análises e estão entre as técnicas mais utilizadas nessa área (BERT *et al.*, 2002). Os marcadores microssatélites podem ser facilmente obtidos por meio de *Next-Generation Sequencing*, além de possuírem um baixo custo de produção marcadores microssatélite são muito vantajosos por serem abundantes no genoma dos eucariotos e fornecem informações sobre diferenciação genética, fluxo gênico. E uma das grandes vantagens desse marcador é a alta reprodutibilidade (KUMAR & KOCOUR, 2017).

OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo gerar informações que permitam avaliar a estrutura e distribuição da diversidade genética em populações de *Prochilodus nigricans*, fornecendo subsídios para a proposição de medidas de manejo a serem aplicadas às populações localizadas na área de influência das Usinas Hidrelétricas Teles Pires e São Manoel. Objetivase, portanto, selecionar e identificar marcadores microssatélites polimórficos desenvolvidos especificamente para *Prochilodus nigricans*;

METODOLOGIA

No presente trabalho foram utilizados tecidos de nadadeira coletados ao longo do rio Teles Pires – MT e tributários. As Usinas Hidrelétricas se responsabilizaram pela coleta e envio do material para análises laboratoriais. Para a extração de DNA foi utilizado o método salino descrito por Aljanabi e Martinez (1997). No total foram utilizados 18 indivíduos, 8 coletados à jusante e 10 coletados à montante dos reservatórios. A pureza (260 nm/280 nm) e a concentração (em ng.µL⁻¹) do DNA foram determinadas por densidade óptica via

espectrofotometria de microvolume (NANOVUE DNA da GE Healthcare®). Os 39 pares de *primers* utilizados foram desenvolvidos no próprio LAGOAA para a espécie alvo. Os *primers* foram selecionados por meio do software *OligoAnalyzer*® (*Integrated DNA Technologies*), o qual permite analisar a estabilidade termodinâmica dos *primers* desenvolvidos. As reações de PCR foram padronizadas quanto à quantidade de MgCl₂ e quanto à temperatura de anelamento dos primers. Os amplicons foram então analisados em gel de agarose 2 % para visualização do DNA e determinação das melhores condições da reação. Então os *loci* microssatélites foram testados nos indivíduos coletados e analisados em gel de poliacrilamida. A determinação dos genótipos para cada *loci*, visando a verificação de polimorfismos, foi realizada com auxílio do equipamento DNA Analyzer 4300 (Li-Cor® Inc.) e do software SAGA GT (Li-Cor® Inc.). Para as análises estatísticas foram utilizados os programas: GENEPOP v. 4.0, Micro-Checker, HW-Quickcheck, Cervus v. 3.0, FSTAT 2.9.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação, por espectrofotometria que utiliza a razão entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} , do DNA extraído de *Prochilodus nigricans* mostrou alto grau de pureza e concentrações satisfatórias. O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação de sua integridade, nos experimentos realizados a maioria das amostras apresentaram integridade satisfatória. Para a padronização das reações de PCR foram realizados testes de gradiente para cada um dos *loci*, no quais foram definidas a concentração de MgCl₂ e temperatura de anelamento para amplificação da população. Dentre os mais de mil *primers* gerados, a princípio 30 pares foram selecionados com base nas análises físico-químicas de suas respectivas estruturas secundárias. Após a seleção e testes dos 30 pares de primers iniciais, observou-se que nove não amplificaram satisfatoriamente. Deste modo, outros nove pares de primers foram submetidos às análises físico-químicas seguindo-se os mesmos parâmetros e foram então sintetizados, destes apenas quatro puderam ser utilizados. A eletroforese em gel de agarose foi aplicada para analisar o sucesso da PCR e também determinar a quantidade de *amplicon* a ser aplicado ao gel de poliacrilamida para genotipagem e validação do *loci*. Os genótipos, de maneira geral, foram eficientemente determinados e mostraram polimorfismo. O painel desenvolvido pode ser observado na Tabela 1. O número de alelos por *locus* variou de 4 (Pro26) a 11 (Pro14 e Pro22), com média de 8,12 alelos. A maioria dos *loci* apresentou heterozigosidade observada menor do que a heterozigosidade esperada, três *loci* (Pro16, Pro22 e Pro23), mesmo estando com heterozigosidade observada menor que a esperada, apresentaram índices muito próximos, e ainda o *locus* Pro26 apresentou uma heterozigosidade observada maior do que a esperada. Considerando apenas a população à montante 8 dos 16 *loci* estão dentro do Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), e na população à jusante apenas 4 *loci* apresentaram desvio do EHW. Pode haver a presença de alelos nulos nos *loci* Pro02, Pro14, Pro17, Pro18, Pro20, Pro25, Pro27 e Pro29. Foi encontrada pouca evidência estatística para desequilíbrio de ligação entre os 16 *loci*. Os *loci* que apresentam PIC acima de 0,5 são altamente informativos, aqueles com PIC entre 0,25 e 0,5 são moderadamente informativos, os que apresentam PIC de 0,1 a 0,25 são pouco informativos (BOTSTEIN et al., 1980), dos *loci* testados 12 se mostraram altamente informativos, 3 se mostraram moderadamente informativo e apenas 1 se mostrou pouco informativo, assim os *loci* microssatélite desenvolvidos são uma boa ferramenta para o estudo populacional das populações de *Prochilodus nigricans*. Esse estudo é peça chave na busca por ferramentas de conservação das populações de *P. nigricans* nas barragens do rio Teles Pires, pois desenvolve pela primeira vez *loci* microssatélites para o estudo populacional dessa espécie. Esses marcadores moleculares são os mais utilizados nessa área de pesquisa (PIORSKI et al., 2008), além de ser muito mais acessível após o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (NGS)

Tabela 1. Caracterização genética de 16 loci microssatélites para *Prochilodus nigricans*

Locus	Sequência do primer (5'-3')	Repetição	T _a (°C)	N	A	Tamanho (pb)	Ho	He	PIC	EHW	
										Montante	Jusante
Pro01	F: CAGTCAGACTCGAACTTGC R: CCATAAGCTTTGAAAGTGG	(CA) ₁₂	50	17	05	161-177	0.150	0.226	0.253	0.13	0.50
Pro02	F: CACTGTGTGAGAGTGAGAGG R: ATGTGAGCACACTTTTAACC	(AC) ₂₄	54	17	12	173-201	0.278	0.872	0.831	0.01*	0.00*
Pro04	F: CTCATTCCCTTTCATTTC R: AGAGAGGGCTCAGTGTCC	(TC) ₂₄	50	16	08	218-228	0.583	0.670	0.595	0.14	0.66
Pro06	F: GCAGTGTGTTTCATTACCC R: GTGTCAGAAGTGACAGTTGG	(AG) ₁₆	54	18	10	158-166	0.575	0.727	0.670	0.32	0.00*
Pro14	F: TTAAGGTAGCCCAACAAGG R: CATCCATAGGCCATACAGG	(TTC) ₂₁	52	17	11	216-252	0.464	0.801	0.723	0.01*	0.09
Pro16	F: AAAAGAGGATGAGCTGTGC R: GACTAGACCTTTGTGGAGACC	(AGG) ₁₈	54	18	08	224-233	0.550	0.610	0.550	0.33	0.59
Pro17	F: CCATTTGCCATAGTTTCC R: TGCTTATGAGCAGTTACAGG	(ACA) ₂₁	54	14	07	151-175	0.143	0.714	0.688	0.00*	0.02*
Pro18	F: GCACCTCCACATCATTGC R: GACAACAAAACACTTGTGTGC	(AAC) ₁₅	58	18	06	142-148	0.063	0.436	0.363	0.00*	0.07
Pro20	F: AGCAAGGTTGAATGTATGG R: CTGCAAGAACTAGAAAACC	(ATT) ₃₃	56	15	10	154-208	0.556	0.746	0.720	0.01*	0.72
Pro22	F: CAGGGTTTACTCCAGAACC R: ACCTCTCGTCATTCAAGG	(GTAT) ₁₆	58	17	11	163-190	0.757	0.796	0.794	0.52	0.33
Pro23	F: TACATTGGTGTGGTCTGC R: CAGAGATGTGGGTAAGC	(TAAC) ₁₈	58	16	08	165-192	0.659	0.663	0.746	0.36	0.57
Pro25	F: GAACAGTTCATTGCTTTGC R: GGTTTTCCCTTCCTTATGC	(TTAT) ₂₀	54	17	09	277-298	0.321	0.689	0.640	0.36	0.00*
Pro26	F: CTGTCGCTTCTTTCTTCC R: CCACCCCTACACAATAACC	(AGTC) ₁₆	56	18	04	177-189	0.500	0.320	0.495	0.00*	0.50
Pro27	F: ACTTCACTGATCCAGAGG R: CCAAAAATACAGGCAAACC	(AATA) ₁₆	54	14	09	177-196	0.313	0.733	0.629	0.00*	0.12
Pro29	F: CACCAACAATGAGTAATGG R: CTGAAACTCTGGTCATTCC	(TTAT) ₂₄	54	15	07	160-175	0.278	0.626	0.544	0.20	0.03*
Pro30	F: TTGACTGTTGTTGACATGG R: CGGAAGAACAAGCTTAACC	(TTTC) ₂₈	54	18	05	165-189	0.113	0.208	0.198	0.05	0.50

T_a: Temperatura de anelamento; N: número de indivíduos; A: número de alelos; P_b: tamanho do alelo em pares de base; Ho: heterozigiosidade observada; He: heterozigiosidade esperada; PIC: conteúdo de informação polimórfica; EHW: valores de P para equilíbrio de Hardy-Weinberg. *p<0.05 desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Primer 5' com cauda M13 (5'TGTAACGACGGCCAGT 3') (SCHUELKE, 2000).

CONCLUSÃO

Os objetivos do trabalho foram atingidos satisfatoriamente. Foi desenvolvido um painel 16 de marcadores moleculares microssatélite altamente informativos e inédito para a espécie estudada, que serão utilizados futuramente para análise populacional de *Prochilodus nigricans* nas barragens das hidrelétricas Teles Pires e São Manoel no rio Teles Pires. O desenvolvimento deste painel permite não apenas gerar conhecimento a respeito da estrutura genética atual, mas também possibilita monitoramentos futuros desta espécie realizando-se comparações diretas com resultados prévios.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SANTOS, N. C. L.; ORTEGA, J. C. G.; PELICICE, F. M. Fish assemblages in Neotropical reservoirs: Colonization patterns, impacts and management. **Fisheries Research**, v. 173, p. 26-36, 2016.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- BERT, T. M.; SEYOU, S.; TRINGALI, M. D.; McMILLEN-JACKSON, A. Methodologies for conservation assessments of genetic biodiversity of aquatic macro-organisms. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 3, p. 387-408, 2002.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 32., p. 314-331, 1980.

HENRIQUES, J. M. **Análise da Diversidade Genética em Curimatá (Prochilodus) da Bacia do Prata e Amazônica.** 2014. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Zoologia)) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2014.

KUMAR, G.; KOCUOR, M. Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review. **Fisheries research**, v. 186, p. 11-22, 2017.

MACHADO, V. N.; WILLIS, S. C.; TEIXEIRA, A. S.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. Population genetic structure of the Amazonian black flannelmouth characin (Characiformes, Prochilodontidae: *Prochilodus nigricans* Spix & Agassiz, 1829): contemporary and historical gene flow of a migratory and abundant fishery species. **Environ. Biol. Fish**, v. 100, p. 1-16, 2017.

MOUNIC-SILVA, C. E.; LEITE, R. G. Influência do rio Negro sobre o status nutricional de juvenis de curimatã *Prochilodus nigricans* (Characiformes; Prochilodontidae) no médio rio Solimões-Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 3, p. 371-376, 2013.

PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, LF.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR., P.M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Braz. J. Biol.**, v. 68, n. 4, supl. p. 1039-1050, 2008.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233–234, 2000.