



# VALIDAÇÃO DE *PRIMERS* DE MICROSSATÉLITE PARA USO EM ESTUDOS POPULACIONAIS DE CURIMBATÁ, *PROCHILODUS LINEATUS* (TELEOSTEI, CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE).

Henriques J.M.<sup>1</sup>; Sirol R.N.<sup>2</sup>; Foresti F.<sup>1</sup>; Oliveira C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia, Laboratório de Biologia e Genética de Peixes - 18618-000, Botucatu, SP, Brasil, jefferson@ibb.unesp.br. <sup>2</sup>Duke Energy International, Geração Paranapanema S/A.

## INTRODUÇÃO

A intensificação do uso de recursos aquáticos tem produzido um grande impacto sobre as comunidades de peixes. Aproximadamente 30.000 espécies de peixes encontram-se identificadas e uma parte significativa se encontra extinta, ameaçada ou vulnerável (McAllister, 1999).

Dentre as ações antrópicas mais impactantes destacam-se a construção de barragens, a sobrepesca, o mau uso do solo na agricultura, o descarte de esgoto sem tratamento prévio, a construção de hidrovias e a introdução de espécies exóticas. Diante do decréscimo dos desembarques pesqueiros, um aumento na conscientização geral sobre a necessidade de conservação da diversidade biológica tem surgido na última década (Arias et al., 1995; Avise e Hamrick, 1996). Por outro lado, o aumento de áreas produtivas, como a aquicultura, e o futuro das populações selvagens dependem grandemente da variação genética das populações naturais (Ryman, 1991). O estudo dessa variação é assim fundamental para o desenvolvimento de projetos de manejo sustentável.

A variabilidade genética é de fundamental importância nos estudos de biologia básica e aplicada. É na verdade um pré-requisito, tanto para o estudo de sistemas naturais como nos programas de cruzamento em organismos vegetais e animais. O estudo da variabilidade genética populacional e específica têm sido possível devido ao desenvolvimento de vários marcadores moleculares. O uso das técnicas moleculares na pesquisa pesqueira tem aumentado dramaticamente nos últimos anos devido ao desenvolvimento das técnicas e também a conscientização do valor dos dados genéticos. Nesse sentido, os marcadores moleculares têm permitido avanços nos estudos sobre análise de estrutura de estoques, aquicultura e taxonomia/ sistemática (Ward e Grave, 1995).

Entre as técnicas mais usadas atualmente nos estudos de genética de populações, está a técnica de microsatélites, que são marcadores considerados adequados aos estudos de variabilidade genética, por apresentarem um alto grau de polimorfismo.

## OBJETIVO

Considerando que os estudos com microsatélites são geralmente baseados na premissa de que todos os alelos têm herança mendeliana, ainda que isso possa não ser totalmente verdadeiro, o presente projeto tem como objetivo principal analisar a distribuição de alelos de microsatélites de três locus em dez casais de curimatás (*Prochilodus lineatus*) e sua respectiva progênie, proporcionando assim ferramentas confiáveis a serem usadas em planos de manejo e estudos populacionais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os cruzamentos foram realizados na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Salto Grande da empresa Duke Energy International, Geração Paranapanema Ltda. De cada um dos pais foi retirada uma amostra de nadadeira e foram preservados cerca de 50 alevinos em etanol 95%.

O DNA genômico foi extraído com a resina Chelex 100 (5%) a partir das amostras de tecido preservadas em etanol 95%. Um microlitro de sobrenadante foi utilizado em cada reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 12,5 ml com 0,5 unidade de *Pht* DNA polimerase, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM de cada dNTP, 1X tampão de reação e 5 mM de cada *primer*. Os *primers* utilizados foram: Plin36 (GenBank AY285820), Plin44 (GenBank AY285830), Plin52 (GenBank AY285836). Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de poliacrilamida a 6% e corados com nitrato de prata. Os alelos foram identificados visualmente com referência a um ladder de 10 pares

de bases utilizando o programa computacional Kodak Digital Science 1D

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a análise dos dados, pode-se determinar o genótipo dos parentais e da respectiva progênie para os diferentes loci, bem como a frequência de indivíduos com genótipos não esperados, ou seja, indivíduos cujo genótipo não corresponde à segregação mendeliana esperada.

A frequência média de indivíduos com genótipos não esperados, para os diferentes *primers* utilizados, foi de 62,85% para Plin36, em quatro famílias analisadas; 28,28% para Plin44, em dez famílias analisadas; e 8,26% para Plin52, em dez famílias analisadas.

Enquanto as pequenas frequências de indivíduos portadores de genótipos não esperados, observadas em algumas análises, possam ser explicadas pela ocorrência de mutações nos indivíduos da geração F1, as elevadas frequências de indivíduos portadores de genótipos não esperados, observadas nos experimentos, podem estar associadas à presença de alelos nulos, descritos em diversos sistemas de microssatélites, isso porque os alelos nulos são resultado de mutações, tais como substituição, inserção e deleção em uma ou em ambas as regiões de anelamento dos *primers* no DNA (Callen et al. 1993).

## CONCLUSÃO

No estudo de populações, os alelos nulos podem complicar a interpretação dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e os múltiplos nulos podem confundir a análise da estrutura da população. A estimativa de frequência dos alelos nulos para cada locus, realizada no presente trabalho, pode contribuir para uma melhor avaliação da estrutura genética de populações naturais e determinar a variabilidade genética de indivíduos introduzidos em ações de peixamento de *Prochilodus lineatus*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, J., Sanchez, L., Martinez, P. (1995). Low stocking incidence in brown trout populations from northwestern Spain monitored by LDH-5\* diagnostic marker. *J. Fish Biol.* 47: 170-176.
- Avise, J.C., Hamrick, J.L. (1996). Conservation genetics. Case histories from nature. Chapman & Hall, New York, 512 p.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards HI, Mulley JC, and Sutherland GR, 1993. Incidence and origin of "null alleles" in the "AC" microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 52: 922-927.
- McAllister, D. E. (1999). The crisis of aquatic biodiversity. Pages 25-28, In: R. S. V. Pullin, R. Froese, C. N. V. Casal (Eds). Proceedings of the conference on sustainable use of aquatic biodiversity: data, tools and cooperation. Brussels, ACP-EU Fisheries Research Initiative Report, 6.
- Ryman, N. (1991). Conservation genetic considerations in fishery management. *J. Fish Biol.* 39: 211-224.
- Ward, R. D. ; Grave, P. M. (1995) Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: Molecular genetics in fisheries. (Carvalho, G. R.; Pitcher, T. J.). p. 29-54.