

PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO DA ICTIOFAUNA

SUBPROGRAMA DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES

APROVEITAMENTO HIDRELÉTRICO JIRAU

RELATÓRIO TÉCNICO TRIMESTRAL 1

OUTUBRO DE 2010

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
EQUIPES DE TRABALHO	1
METODOLOGIA	2
A. Obtenção de Material Biológico	2
B. Extração de DNA	2
C. Amplificação dos Marcadores Microssatélites	3
D. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	5
RESULTADOS PARCIAIS	6
CONSIDERAÇÕES	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

APRESENTAÇÃO

O presente documento técnico apresenta o primeiro relatório trimestral do Subprograma de Genética de Populações, em execução no âmbito do Programa de Conservação da Ictiofauna (PCI), durante a fase pré-enchimento do reservatório do Aproveitamento Hidrelétrico Jirau (AHE Jirau). Os resultados apresentados neste documento contemplam os três primeiros meses de atividades (maio, junho e julho), considerados neste documento, para efeito de cronograma executivo, como primeiro trimestre de atividades, executadas no período entre 01 de maio e 31 de julho de 2010.

Este programa é executado por contrato entre a Energia Sustentável do Brasil S.A. (ESBR) e a Systema Naturae Consultoria Ambiental Ltda. (NATURAE) e suas atividades são licenciadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), através do Processo nº 02001.006920/2008-12, estando em vigor a Autorização nº 074/2010 – CGFAP, com validade entre 24.03.2010 e 24.03.2011.

EQUIPES DE TRABALHO

A **Tabela 1** abaixo apresenta os profissionais que constituíram a equipe técnica da NATURAE, no primeiro trimestre de atividades (01 de maio a 31 de julho de 2010), e suas respectivas funções.

Tabela 1. Relação dos profissionais da NATURAE, funções durante o primeiro trimestre de atividades (01 de maio a 31 de julho de 2010).

NOME	FUNÇÃO
BIÓL. NELSON JORGE DA SILVA JUNIOR – PH.D.	COORDENADOR GERAL
BIÓL. MARCIO CANDIDO DA COSTA – M.SC.	COORDENADOR TÉCNICO
BIÓL. FERNANDA CAPUZO SANTIAGO	COORDENADORA DO LABORATÓRIO DE ICTIOLOGIA
BIÓL. LIANDRO ROSA	COORDENADOR DE CAMPO
BIÓL. IGOR DAVID DA COSTA	BIÓLOGO
BIÓL. JOSMARA DOS PASSOS CARVALHO	BIÓLOGA
BIÓL. MARCOS PAULO DOS SANTOS FONSECA	BIÓLOGO
BIÓL. MARTIUS VINITIUS DE AZEVEDO AQUINO	BIÓLOGO
BIÓL. NAIARA PEREIRA GUEDES	BIÓLOGA
ANA PAULA MERCADO PALHANO	SERVIÇOS GERAIS
ANTÔNIO IVO DOS SANTOS QUINTINO	APOIO TÉCNICO (PESCADOR)
ANTÔNIO RAIMUNDO DOS SANTOS	APOIO TÉCNICO (PESCADOR)

Tabela 1. Continuação.

NOME	FUNÇÃO
REGINALDO DA SILVA	APOIO TÉCNICO (BARQUEIRO)
ROSILDA TEIXEIRA DE OLIVEIRA	COZINHEIRA
ZIGLEYSON PEREIRA MARTINS	APOIO TÉCNICO (BARQUEIRO)

Além da equipe técnica apresentada acima, contou se com um corpo de consultores *ad hoc* contratados pela ESBR e disponibilizados para o PCI. A **Tabela 2** apresenta a relação dos profissionais e suas instituições de origem.

Tabela 2. Relação dos consultores *ad hoc*, instituições de origem.

NOME	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM
BIÓL. ÂNGELO ANTÔNIO AGOSTINHO – DR.	NUPELIA/UEM
BIÓL. JOSÉ ALEXANDRE FELIZOLA DINIZ FILHO – DR.	ICB/UFG
BIÓL. MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES – DR. ^A .	LGB/ICB/UFG
BIÓL. RONALDO BORGES BARTHEM – DR.	MPEG/MCT
ENG. FLOR. ROSANE GARCIA COLLEVATTI – DR. ^A .	LGB/ICB/UFG
MÉD. VET. DOMINGO RODRIGUEZ FERNANDEZ – DR.	ITAIPU BINACIONAL

METODOLOGIA

A. Obtenção de Material Biológico

De acordo com o plano de trabalho do PCI (NATURAE, 2009), o material a ser analisado pela equipe do Laboratório de Genética & Biodiversidade, vinculado ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (LGB/ICB/UFG), será proveniente das atividades de campo executada pela equipe do PCI do AHE Jirau e a metodologia de coleta e preparação das amostras segue o descrito no referido plano de trabalho.

Para o início das atividades laboratoriais foram adquiridas amostras de peixes da ordem Siluriformes no mercado público municipal de Porto Velho – RO, as quais foram utilizadas para a realização de testes e padronização da amplificação via Reação em Cadeia da Polimerase.

B. Extração de DNA

As análises genético-moleculares foram realizadas no LGB/ICB/UFG. O DNA foi extraído a partir de pequenas quantidades de tecido muscular (aproximadamente 40 mg), utilizando o Kit de

purificação DNA para tecidos *DNeasy Blood & Tissue Kit* do fabricante QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda., segundo o protocolo proposto. Com o auxílio de uma pinça foi retirado a amostra de tecido e em seguida, tanto a pinça como as tesouras sempre eram lavadas em álcool antes de serem reutilizadas novamente em outra amostra. Cada amostra de tecido foi colocada em um eppendorf de 2,0ml e, macerado dentro do tampão. O processo de extração do DNA, seguindo o protocolo do fabricante, passa pelas etapas de lise celular, digestão com proteinase K, precipitação de proteína, separação/extração do DNA dos outros resíduos celulares e finalmente é colocado um tampão de hidratação que permite a recuperação do DNA extraído.

Depois de extraído, a quantificação de DNA foi realizada em gel de agarose 1,4%, utilizando tampão de eletroforese TBE 1X (0,89M Tris, pH 8,0; 0,89M ácido bórico; 0,02M EDTA) em uma cuba horizontal, utilizando-se como parâmetro de comparação o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*, do fabricante *Invitrogen*TM. Cada amostra, incluindo o marcador, foi preparada contendo 3µl de DNA/marcador e 3µl de tampão de carregamento. O gel foi submetido a uma voltagem constante igual a 80V, durante cerca de duas horas. Ao final do processo, o gel foi submetido a uma solução contendo brometo de etídeo para a coloração das amostras, e em seguida, fotografado sob luz ultravioleta, com o auxílio de um fotodocumentador. Depois de quantificado, o DNA de cada indivíduo foi diluído para a concentração final de ~5ng/µL, para ser usado nas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Os testes para a padronização dos locos de regiões microssatélites, e a verificação da amplificação cruzada em algumas espécies, foi feita a partir da amplificação dos fragmentos de DNA utilizando três indivíduos de cada uma das espécies avaliadas.

C. Amplificação dos Marcadores Microssatélites

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram preparadas, para cada indivíduo, utilizando-se um par de *primers* em cada reação. Em cada reação foi adicionado 5µl do DNA e 10µl de uma mistura (mix), contendo H₂O MilliQ autoclavada, *primer*, BSA (*Bovine Serum Albumin*), tampão da enzima, MgCl₂, dNTP's e enzima Taq-DNA-polimerase (fornecida pela Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda.), totalizando um volume final de 15µl. As concentrações e as quantidades dos reagentes utilizados nessa reação estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Protocolo das reações de PCR demonstrando os reagentes utilizados e suas concentrações de uso e volumes, para um sistema de 15 μ l.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME (μ l)
H2O MilliQ autoclavada	-	0,8
DNA	~ 5ng/ μ l	5
Primer (F+R)	0,9mM	4,4
BSA	10mg/ml	1,3
Tampão da enzima	10x	1,5
MgCl ₂	50mM	0,5
dNTP's	2,5 mM	1,3
Taq polimerase	5U	0,2
Total	-	15

O DNA de cada indivíduo foi amplificado, via reação em cadeia da polimerase (PCR), em termociclador, utilizando-se o programa cujos passos estão descritos a seguir: i) desnaturação inicial do DNA a 94°C por 05 (cinco) minutos; ii) desnaturação do DNA a 94°C por 01 (um) minuto; iii) anelamento dos *primers* a X°C por 01 (um) minuto; iv) extensão da molécula pela enzima Taq-DNA-polimerase a 72°C por 01 (um) minuto; v) 30 ciclos seguindo do segundo ao quarto passo; vi) passo final de extensão por 07 (sete) minutos a 72°C, finalizando os produtos amplificados (**Figura 1**).

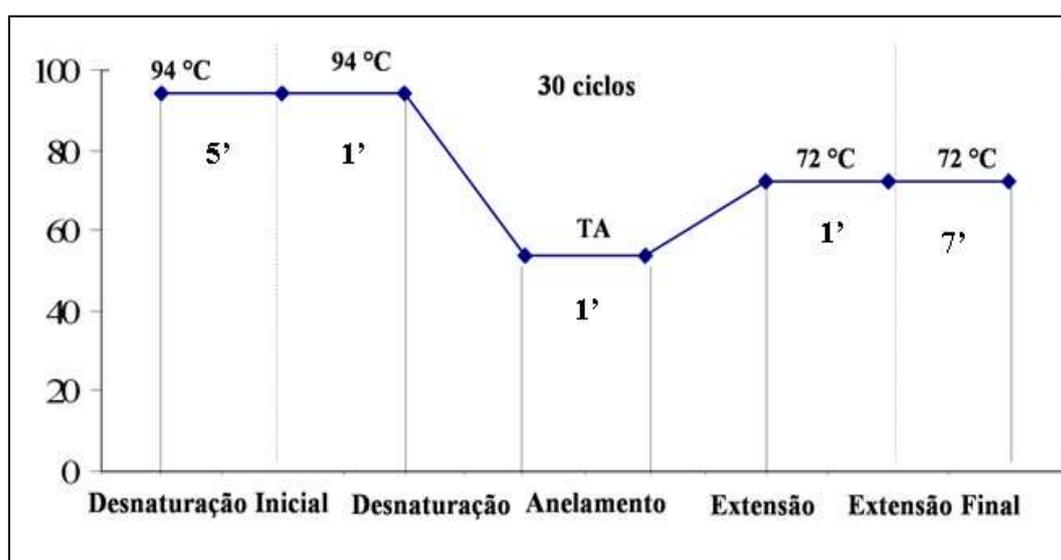


Figura 1. Programa de termociclagem para regiões microsatélites, mostrando cada passo com sua respectiva temperatura de anelamento (TA) do *primer*. Fonte: Melo *et al.*, 2008.

D. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os produtos da amplificação resultantes dos testes de padronização foram submetidos à eletroforese vertical em gel de acrilamida 6% na cuba de sequenciamento, modelo *Sequi-Gen* da marca *BioRad*). Para a eletroforese foi utilizado tampão TBE 1X e corrente elétrica constante em 90 Watts, por um tempo médio de uma hora e meia. Para a visualização dos alelos (produtos da amplificação), os géis foram submetidos aos passos descritos no sistema de coloração apresentados por Creste *et al.* (2001) (Tabela 4).

Tabela 4. Sistema de coloração do gel de acrilamida, apresentados por Creste *et al.* (2001).

PROCEDIMENTO	SOLUÇÃO	TEMPO	Nº DE VEZES PARA REUTILIZAÇÃO
1. Fixação	Etanol 10%, ácido acético 1%	10'	3
2. Lavagem	Água destilada deionizada	1'	-
3. Pré-tratamento	Ácido Nítrico 1,5%	3'	4
4. Lavagem	Água destilada deionizada	1'	-
5. Impregnação	0,2% AgNO ₃	20'	3
6. Lavagem	Água destilada deionizada	30''	-
7. Lavagem	Água destilada deionizada	30''	-
8. Revelação**	45g/L Na ₂ CO ₃ , 0,81 mL formaldeído* (37%)	4-7'	-
9. Bloqueio	Ácido acético	5'	5
10. Lavagem	Água destilada deionizada	1'	-

Legenda: * = Acrescentar na solução de revelação na hora de utilizar; ** = Durante a revelação colocar aproximadamente metade da solução (resfriada a 12°C) e manter sob lenta agitação até a solução ficar escura e adicionar então o restante da solução.

Após a revelação e secagem das placas, estas foram colocadas sobre a luz branca para a obtenção dos genótipos, utilizando-se como padrão de peso molecular o marcador *Ladder* 10bp (InvitrogenTM), que apresenta uma faixa de fragmentos de tamanhos que varia entre 10pb e 330pb, com intervalo de 10pb. Em seguida, os géis foram analisados e digitalizados para armazenamento das informações para futuras consultas.

O ajuste da temperatura de anelamento dos locos foi feito com o aumento ou diminuição da temperatura, de acordo com o aparecimento ou não, de bandas específicas ou inespecíficas, até que a visualização das bandas tivesse melhor resolução.

Depois da padronização dos *primers*, os mesmos serão marcados com fluorescência e utilizados para a genotipagem em sequenciador automático com os indivíduos coletados ao longo da área de estudo.

Depois de finalizada a codificação dos géis, a matriz de genótipos gerada será utilizada para a elaboração da planilha de genótipos. Para a confirmação do número de alelos de cada loco, após a codificação, será organizada uma escada alélica, que pode ser obtida com a realização de uma nova eletroforese com o menor número de indivíduos que contenham todos os alelos, para cada loco. Quando não há a confirmação de algum alelo, a matriz de genótipos deve ser revista.

RESULTADOS PARCIAIS

Durante os três primeiros meses de atividades do Subprograma de Genética de Populações foi realizada a síntese de 26 pares de *primers* (26 locos de marcadores microsatélites) desenvolvidos para *Brachyplatystoma rousseuxii* e transferidos para *Brachyplatystoma vaillantii*, *Brachyplatystoma platynemum*, *Brachyplatystoma filamentosum* e *Pseudoplatystoma punctifer*.

A **Tabela 5** apresenta a relação dos *primers* (marcadores microsatélites), seguido do código de acesso no GenBank (Banco de Dados de Sequência Genética), da espécie para qual o marcador foi desenvolvido originalmente, do motivo de repetição da região microsatélites, da sequência de nucleotídeos dos *primers* “*Foward*” e “*Reverse*”, da faixa de tamanho dos alelos e da referência bibliográfica dos locos que foram sintetizados para as análises genético-populacionais.

A **Tabela 6** apresenta uma relação contendo a concentração dos *primers* sintetizados e a diluição preparada para a realização dos testes de amplificação de cada *primer* e na **Tabela 7** é apresentada a relação dos marcadores que estão sendo testados para cada uma das espécies-alvo do Subprograma de Genética de Populações, de acordo com o que está relatado em literatura especializada quanto ao potencial de transferibilidade destes marcadores.

Tabela 5. Relação dos *primers* (marcadores microssatélites), seguido do Código de acesso no GenBank, espécie para qual o marcador foi desenvolvido originalmente, motivo de repetição da região microssatélites, sequência de nucleotídeos dos *primers* “Foward” e “Reverse”, faixa de tamanho dos alelos e referência bibliográfica dos locos que foram sintetizados para as análises genético-populacionais.

PRIMER (MARCADOR)	CÓDIGO DE ACESSO GENBANK	ESPÉCIE ORIGINAL	MOTIVO REPETIDO	SEQUENCIA "FOWARD"	SEQUENCIA "REVERSE"	FAIXA DE TAMANHO (PB)	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Pcor1	AY737063	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(TC) ₉ GC(TC) ₉	AAACCCGAGGATAACCAGTC	CAGCGTGCTACTAACACAAAC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor2	AY737064	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(AG) ₁₉	GATATGCAAATAAGAAGGTC	TCTTCTGGCTTTTCTCTCTCT	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor5	AY737067	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(TC) ₈ CC(TC) ₁₅	GACTAAGATTACACAGAGATTC	CTTGGTGGGGAAACAGGC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor7	AY737069	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(AG) ₈ GG(AG) ₂ CG(AG) ₄	ATGCTGGGATACGCTCAGAC	GTGGCGAGTGAACAAGTCC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor8	AY737070	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(AC) ₁₂	ACACCATACGCACACACTCG	TGAGGTCGGGTGATAAGGTC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor10	AY737072	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(GTCG) ₁₅ (GT) ₉ CC	TTAAGACAGCACAGCCTGTGGGG	AAGACAGCGCCATAGATTCTGCC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor21	AY737078	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(GT) ₁₃	TCACCGAGAGGTCTGACCATGA	CTGTGGTTAACCAGCTAGCAC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
BR38	GQ903737	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(TC) ₃₃	AGTTCCTTCTCGTTCCCTTC	ATCTCCACTCTCTCTGGCTC	214–248	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR40	GQ903733	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) ₁₃	ACTCAGGGGCACTAACATGG	CTTTTGCTTTGACAGGCG	146–170	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR43	GQ903735	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) ₂₅	CCCAGAAAAGAATCCAGCAG	CGCCAAATGAACAACACC	164–180	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR44	GQ903736	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) ₁₃	GTTGTGGGGTAGAAAGAAGGC	AGACGGGATCAGAGAGAGGAC	185–201	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR45	GQ903760	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(CT) ₁₅	TCTGTGGAGATTGAAGCCTG	GGTGTGAAGATGGAGTGAAC	203–223	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR47	GQ903739	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(TG) ₁₁	TCAGTGTGTGTGACTGTTG	GCTCCTCTGTTTCACTTC	102–116	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR49	GQ903741	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(TC) ₁₇	GAGTGGTTTGACTCTCCAGCA	GGACTGCATAGGTTGTTGTC	296–312	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR50	GQ903742	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) ₂₁	CACAAGAGCTGAAACCTGCC	TATGCGCTAACCCAACCTGT	218–250	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR51	GQ903743	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) ₁₈	GTTACACATGGTCGCTGGTG	GTTCACTCTCTCGGCTTCG	263–285	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR52	GQ903744	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) ₁₇	TGCATAGGCTTGTGTGAACC	GCACTGAGGAATCTGACCTTG	310–354	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR53	GQ903746	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) ₁₅	TTTATGAGTGTGTTATCCGGCA	TGAGAGTGTGTTCACTTCCA	160–162	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR54	GQ903731	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(CA) ₂₅	AAACCAACCAACACACCCTC	GTCTGGATGCCAAGTCGTTT	223–269	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR57	GQ903748	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) ₂₆	CTAGAGCATCTCGGGTAGTG	GCTGTCTCATTACATTC	217–261	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR61	GQ903749	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(TG) ₂₃	CTGTGAAAACATGAGGCAG	GACATCAGAGCGAAGCACAC	246–286	Batista <i>et al.</i> , 2009

Tabela 5. Continuação.

PRIMER (MARCADOR)	CÓDIGO DE ACESSO GENBANK	ESPÉCIE ORIGINAL	MOTIVO REPETIDO	SEQUENCIA "FOWARD"	SEQUENCIA "REVERSE"	FAIXA DE TAMANHO (PB)	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
BR63	GQ903750	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AG) ₂₂	CATTCAAGTCTGCTCACCCAC	TGGAGTGCATAGGAAGAGAGG	219–249	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR67	GQ903752	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) ₁₈	AAATGCTCTTAGTGATCCGAGG	ATCAGACTCAAAGGTTTATGGG	224–252	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR73	GQ903756	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(CA) ₁₅	GAGGGGAAATATGAACTGCG	CAAGCGTATAGTGGGGTTTG	103–125	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR75	GQ903758	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) ₁₈	GACAGTGAGTTGGAGTCGATGA	CAGGACTTTGGTGAAGGGAA	226–260	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR76	GQ903759	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) ₄ AT (GT) ₇	GGGAATGACAAAACCTCAAAC	CCACTCTATCAGGCTATCAGTATTT	102–182	Batista <i>et al.</i> , 2009

Tabela 6. Relação dos primers e suas sequências de nucleotídeos, concentração de cada um dos primers liofilizados em picomoles, quantidade de tampão de eluição (TE) para o preparo de solução estoque (SE1) que deve ficar com a concentração ([I]) próximo à 500µM, diluição para o preparo da segunda diluição de solução estoque (SE2) que deve ficar com a concentração ([I]) próximo à 100µM e diluição para o preparo da solução estoque de trabalho (ET) que deve ficar com a concentração ([I]) próximo à 0,9µM.

PRIMER	SEQUÊNCIAS	PICOMOLES	TE ADICIONADO	SE1	SE2	DILUIÇÃO (SE→H ₂ O)	ET (0,9 µM)	DILUIÇÃO (ET→H ₂ O)
Pcor1 - F	GGGAATGACAAAACCTCAAAC	21500	52,4	410	102,6	1 → 3	0,9	1 → 110
Pcor1 - R	CCACTCTATCAGGCTATCAGTATTT	21200	42,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor2 - F	AAACCCGAGGATAACAGTC	18400	36,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor2 - R	CAGCGTGCTACTAACACAAAC	25300	50,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor5 - F	GATATGCAAATAAGAAGGTC	23300	46,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor5 - R	TCTTCTGGCTTTTCCTCCTCT	21200	42,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor7 - F	GACTAAGATTACACAGAGATTC	23600	47,2	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor7 - R	CTTGGTGGGGAAACAGGC	20200	40,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor8 - F	ATGCTGGGATACGCTCAGAC	22900	45,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor8 - R	GTGGCGAGTGAACAAGTCC	19900	39,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor10 - F	ACACCATACGCACACTCG	18900	37,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor10 - R	TGAGGTCGGGTGATAAGGTC	21900	43,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
Pcor21 - F	TTTAAGACAGCACAGCCTGTGGGG	22500	45	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110

Tabela 6. Continuação.

PRIMER	SEQUÊNCIAS	PICOMOLES	TE ADICIONADO	SE1	SE2	DILUIÇÃO (SE→H ₂ O)	ET (0,9 μM)	DILUIÇÃO (ET→H ₂ O)
Pcor21 - R	AAGACAGCGCCATAGAGTTCTGCC	22000	44	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR38 - F	GGTGGTTTCCCTTATGGTAT	26200	52,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR38 - R	AACCAACCCAAAGTGAAGAT	26200	52,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR40 - F	AGTTCCTTCTCGTCCCTTC	21900	43,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR40 - R	ATCTCCACTCTCTCGGCTC	24900	49,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR43 - F	ACTCAGGGGCACTAACATGG	20900	41,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR43 - R	CTTTTGCTTTGACAGGCG	23200	46,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR44 - F	CCCAGAAAAGAATCCAGCAG	22600	45,2	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR44 - R	CGCCAAATGAACAACACC	20800	41,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR45 - F	GTTGTGGGGTAGAAAGAAGGC	21400	42,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR45 - R	AGACGGGATCAGAGAGAGGAC	20500	41	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR47 - F	TCTGTGGAGATTGAAGCCTG	23500	47	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR47 - R	GGTGCTGAAGATGGAGTGAAC	25100	50,2	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR49 - F	TCAGTGTGTGTGACTGTTG	25400	50,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR49 - R	GCTCCTTTGTTTCACTTC	22900	45,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR50 - F	GAGTGGTTGACTCTCCAGCA	22500	45	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR50 - R	GGACTGCATAGGGTTGTTGTC	23800	47,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR51 - F	CACAAGAGCTGAAACCTGCC	24500	49	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR51 - R	TATGCGCTAACCCAACCTGT	24300	48,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR52 - F	GTTACACATGGTCGCTGGTG	22500	45	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR52 - R	GTTCATTCTCTCGGCTTCG	20800	41,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR53 - F	TGCATAGGCTTGTGTGAACC	21200	42,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR53 - R	GCACTGAGGAATCTGACCTTG	19300	38,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR54 - F	TTTATGAGTGTATTATCCGGCA	21500	43	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR54 - R	TGAGAGTGTGTTCACTCCA	19900	39,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR57 - F	AAACCAACCAACACACCCTC	14200	28,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR57 - R	GTCTGGATGCCAAGTCGTTT	21900	43,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR61 - F	CTAGAGCATCTGCGGGTAGTG	15800	31,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110

Tabela 6. Continuação.

PRIMER	SEQUÊNCIAS	PICOMOLES	TE ADICIONADO	SE1	SE2	DILUIÇÃO (SE→H ₂ O)	ET (0,9 μM)	DILUIÇÃO (ET→H ₂ O)
BR61 - R	GCTGTCTCATTACATTC	21700	43,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR63 - F	CTGTCGAAAACATGAGGCAG	24200	48,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR63 - R	GACATCAGAGCGAAGCACAC	20600	41,2	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR67 - F	CATTCAAGTCTGCTCACCCAC	20800	41,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR67 - R	TGGAGTGCATAGGAAGAGAGG	20300	40,6	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR73 - F	AAATGCTCTTAGTGATCCGAGG	19600	39,2	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR73 - R	ATCAGACTCAAAGGTTTATGGG	20400	40,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR75 - F	GAGGGGAAATATGAACTGCG	24900	49,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR75 - R	CAAGCGTATAGGTGGGGTTTG	23000	46	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR76 - F	GACAGTGAGTTGGAGTCGATGA	21900	43,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR76 - R	CAGGACTTTGGTGAAGGGAA	24100	48,2	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110

Tabela 7. Relação dos locos que a literatura relata como sendo informativo e que serão testados com cada uma das espécies defina para Subprograma de Genética de Populações do AHE Jirau. O símbolo “-” indica ausência de informação e o “X” indica que o marcador deverá ser informativo para a espécie.

Loco	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>
Pcor1	-	-	-	-	X
Pcor2	-	-	-	-	X
Pcor5	-	-	-	-	X
Pcor7	-	-	-	-	X
Pcor8	-	-	-	-	X
Pcor10	-	-	-	-	X
Pcor21	-	-	-	-	X
BR38	X	X	X	X	-
BR40	X	X	X	X	-
BR43	X	X	X	X	-
BR44	X	X	X	X	-
BR45	X	-	X	X	-

Tabela 7. Continuação.

Loco	<i>Brachyplatystoma rousseuxii</i>	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>
BR47	X	X	X	X	-
BR49	X	X	X	X	-
BR50	X	-	X	X	-
BR51	X	X	X	X	-
BR52	X	X	X	-	-
BR53	X	X	X	X	-
BR54	X	-	X	X	-
BR57	X	-	X	X	-
BR61	X	X	X	X	-
BR63	X	-	X	X	-
BR67	X	-	X	-	-
BR73	X	X	X	X	-
BR75	X	X	X	X	-
BR76	X	-	X	X	-

Para a realização dos testes e padronização da amplificação via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram adquiridas 11 (onze) amostras de peixes da ordem Siluriformes, no mercado público municipal de Porto Velho – RO, as quais foram destinadas para o LGB/ICB/UFG. A **Tabela 8** apresenta a lista dos indivíduos que foram adquiridos e encaminhados ao LGB/ICB/UFG.

Tabela 8. Relação das amostras de músculo congelado de 11 indivíduos de peixe, provenientes do rio Madeira, região de Porto Velho.

Nº DA AMOSTRA	ESPÉCIE	NOME COMUM	MATERIAL
1	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Músculo congelado
2	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Piramutaba	Músculo congelado
3	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Piramutaba	Músculo congelado
4	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Piramutaba	Músculo congelado
5	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Músculo congelado
6	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Músculo congelado
7	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	Surubim	Músculo congelado
8	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	Surubim	Músculo congelado
9	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	Surubim	Músculo congelado
10	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	Surubim	Músculo congelado
11	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	Surubim	Músculo congelado

A **Figura 2** ilustra um resultado parcial, obtido em eletroforese em gel de agarose 1%, contendo a primeira extração de DNA realizada para se iniciar os testes de padronização da amplificação dos locos.



Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1%, realizada para a quantificação de quatro indivíduos da primeira extração de DNA que será utilizado para dar início aos testes de padronização da amplificação dos locos.

A **Figura 3** apresenta o resultado parcial dos primeiros testes de padronização da amplificação de parte dos marcadores para a espécie *Pseudoplatystoma punctifer*, demonstrando o perfil eletroforético com o produto de amplificação dos testes realizado para 07 (sete) locos microsatélites para a espécie.

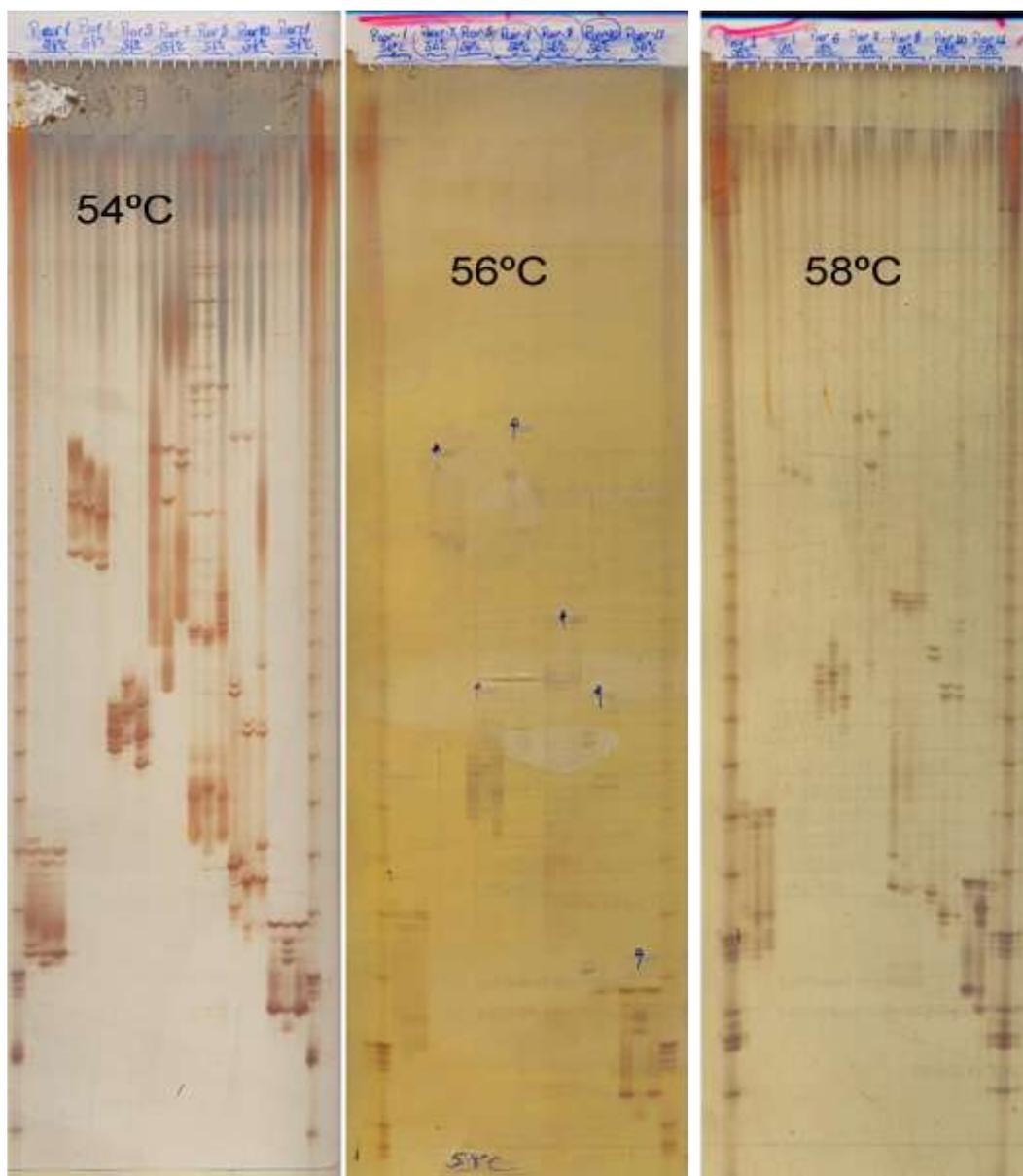


Figura 3. Perfil eletroforético com o produto de amplificação dos testes realizado para 07 (sete) locos microsatélites para a espécie *Pseudoplatystoma punctifer*.

A **Tabela 9** apresenta a relação dos locos testados com as temperaturas de anelamento (TA) para os três testes realizados, seguido da faixa de variação do tamanho dos alelos encontrados como resultado de cada teste realizado para a espécie *Pseudoplatystoma punctifer*.

Tabela 9. Relação dos locos testados com as temperaturas de anelamento (TA) para os testes 1, 2 e 3, seguido da faixa de variação do tamanho dos alelos encontrados como resultado de cada teste realizado para a espécie *Pseudoplatystoma punctifer*.

LOCO	TEMPERATURA DE ANELAMENTO (°C)																TA OTIMIZADA	TESTE TA1		TESTE TA2		TESTE TA3			
	40	42	44	46	48	50	52	54	56	57	58	60	61	62	64	66		68	Loco 1	Loco 2	Loco 1	Loco 2	Loco 1	Loco 2	
Pcor-1								1	2		3									120	105	120	105	120	105
Pcor-2								1	2		3								58	222	180	222		222	
Pcor-5								1	2		3									150		150		150	
Pcor-7								1	2		3									255		255		255	
Pcor-8								1	2		3									130	170	130	170	110	170
Pcor-10								1	2		3									115	155			115	155
Pcor-21								1	2		3									105		105		105	

CONSIDERAÇÕES

Considerando que o pequeno número de testes realizado até o momento já revelou alelos bem definidos e também a existência de polimorfismo, mesmo neste pequeno número de indivíduos avaliados, espera-se que estes marcadores sejam capazes de gerar informações sobre a variação genética suficiente para a realização de um estudo genético-populacional robusto e com bom poder de discriminação.

Na próxima etapa de atividades, na qual se pretende caracterizar geneticamente as populações das espécies-alvo do Subprograma de Genética de Populações do AHE Jirau, deverão ser concentrados esforços na coleta de um número significativo de indivíduos por população (grupo de indivíduos em diferentes pontos de coleta) para que se torne possível a avaliação da diversidade genética presente nessas populações naturais, bem como a magnitude e distribuição dessa variabilidade ao longo do rio Madeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A. & FIGUEIRA, A. 2001. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306.
- MELO, D. B.; TELLES, M. P. C.; SOARES, T. N. & RESENDE, L. V. 2008. Brasília. Anais do IX Simpósio Nacional sobre o Cerrado e II Simpósio Internacional sobre Savanas Tropicais.
- NATURAE. 2009. Programa de Conservação da Ictiofauna – UHE Jirau (RO). *Plano de Trabalho*. Goiânia, GO, Brasil.

Goiânia, 08 de outubro de 2010.

A handwritten signature in black ink, reading "Nelson Jorge da Silva Jr.", written in a cursive style.

Nelson Jorge da Silva Jr. - Ph.D.
CRBio 13627-4 CRBM 015-3
Diretor

