

**PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO DA ICTIOFAUNA**

**SUBPROGRAMA DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES**

**APROVEITAMENTO HIDRELÉTRICO JIRAU**

**RELATÓRIO TÉCNICO TRIMESTRAL 2**

**NOVEMBRO DE 2010**

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	1
<b>EQUIPES DE TRABALHO</b> .....	1
<b>METODOLOGIA</b> .....	2
A. Obtenção de Material Biológico .....	2
B. Extração de DNA .....	2
C. Padronização da Amplificação dos Marcadores Microsatélites.....	4
D. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....	5
<b>RESULTADOS PARCIAIS</b> .....	6
<b>CONSIDERAÇÕES</b> .....	25
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	25

## APRESENTAÇÃO

O presente documento técnico apresenta o segundo 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 o segundo trimestre de atividades, executadas no período entre 01 de agosto e 31 de outubro 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 segundo trimestre de atividades (01 de agosto a 31 de outubro de 2010), e suas respectivas funções.

**Tabela 1.** Relação dos profissionais da NATURAE, funções durante o segundo trimestre de atividades (01 de agosto a 31 de outubro 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 – M.SC.	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)
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* e técnicos 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* e técnicos, com suas 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 <sup>A</sup> .	LGBio/ICB/UFG
BIÓL. RONALDO BORGES BARTHEM – DR.	MPEG/MCT
ENG. FLOR. ROSANE GARCIA COLLEVATTI – DR <sup>A</sup> .	LGBio/ICB/UFG
MÉD. VET. DOMINGO RODRIGUEZ FERNANDEZ – DR.	ITAIPIU BINACIONAL
BIÓL. THAÍS GUIMARÃES DE CASTRO – M.Sc.	LGBio/ICB/UFG
ZOOTECNISTA LUCILEIDE VILELA REZENDE – M.Sc.	LGBio/ICB/UFG

## METODOLOGIA

### A. Obtenção de Material Biológico

De acordo com o plano de trabalho do PCI (NATURAE, 2009), o material analisado pela equipe do Laboratório de Genética & Biodiversidade, vinculado ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (LGBio/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 as atividades laboratoriais realizadas no segundo trimestre do Subprograma de Genética de Populações, foram utilizadas amostras de peixes da ordem Siluriformes provenientes do mercado público municipal de Porto Velho – RO, recebidas no primeiro trimestre de atividades, e amostras provenientes da primeira e da segunda remessa (agosto e setembro de 2010, respectivamente) de peixes da mesma ordem (Siluriformes), as quais foram utilizadas para a continuação dos testes e padronização dos marcadores microssatélites, pela amplificação via Reação em Cadeia da Polimerase.

### B. Extração de DNA

As análises genético-moleculares foram realizadas no LGBio/ICB/UFG. O DNA foi extraído a partir de pequenas quantidades de tecido muscular (aproximadamente 200 mg), utilizando um

protocolo de extração de DNA de amostras de tecido que apresenta, resumidamente, as etapas de lise celular, digestão com proteinase K, precipitação de proteína, separação/extração do DNA dos outros resíduos celulares e finalmente a eluição em tampão de hidratação que permite a recuperação do DNA extraído, conforme os passos descritos a seguir:

- 1) Preparação de alíquotas de aproximadamente 50 mg de tecido em tubo *ependorf* de 2,0mL;
- 2) Lavagem do tecido muscular do peixe com um tampão PBS 1x concentrado;
- 3) Adição de 800µL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA e 400 mM NaCl) e em cada amostra alíquotada;
- 4) Maceração do tecido embebido em tampão de extração em pedaços muito pequenos com a ajuda de uma tesourinha.
- 5) Adição ao macerado 50µL de uma solução detergente SDS 20% e 20µL de proteinase K (10mg/µL), e homogeneização para incubação no banho-maria a 65°C por, no mínimo, 5 horas;
- 6) Divisão de cada amostra em dois tubos *ependorfs* de 2,0mL e adição, em cada tubo, 200µL de NaCl 5M para posterior incubação das amostras por 15 minutos em gelo (aproximadamente 4°C);
- 7) Centrifugação, após incubação no gelo a amostra, por 15 minutos com a velocidade igual a 14.000rpm. Transferência do sobrenadante para um tubo *ependorf* novo de 2,0mL, onde é adicionado 50µL de NaAc 3M;
- 8) Precipitação do produto com 1mL de etanol absoluto gelado, para a formação do pellet. Para tanto, é feita a agitação lenta (no mínimo, seis vezes) e nova centrifugação por 15 minutos à velocidade de 14.000rpm. O sobrenadante é descartado e o tubo deve ser deixado aberto, à temperatura ambiente, por 5 minutos para secar um pouco do etanol;
- 9) Para lavagem do pellet é adicionado ao tubo 500µL de etanol gelado 70%, e feita uma agitação levemente por, no mínimo 6 vezes, e centrifugação das amostras por 5 minutos a velocidade de 14.000rpm. O sobrenadante é descartado mais uma vez e o tubo é deixado aberto, à temperatura ambiente, para secagem total do etanol;
- 10) O pellet de DNA deve ser ressuscitado em 250µL de tampão de eluição + RNase e deixado em banho-maria por 1 hora em cerca de 37°C.

Depois de extraído, o DNA de todas as amostras foi quantificado em gel de agarose 1% (com adição de brometo de etídeo para a coloração das amostras) 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*<sup>TM</sup>. 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 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, foram realizados a partir da amplificação dos fragmentos de DNA de três indivíduos de cada uma das espécies avaliadas.

### C. Padronização da Amplificação dos Marcadores Microssatélites

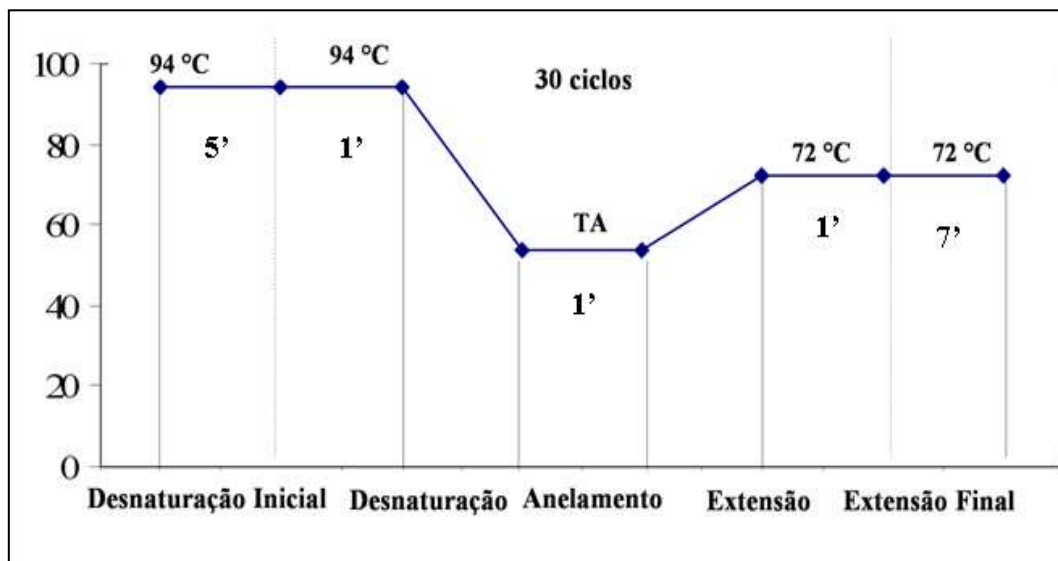
As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram preparadas, para cada indivíduo, utilizando-se um par de *primers* em cada reação. Para cada reação foi adicionado 3µl de DNA e 12µl de uma mistura (mix), contendo H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada, *primer*, BSA (*Bovine Serum Albumin*), tampão da enzima, MgCl<sub>2</sub>, 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 15µl.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME (µl)
H <sub>2</sub> O MilliQ autoclavada	-	2,8
DNA	5ng/µl	3,0
<i>Primer</i> (F+R)	0,9mM	4,4
BSA	25mg/mL	1,3
Tampão da enzima	10x	1,5
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0,5
dNTP's	2,5 mM	1,3
Taq polimerase	5U	0,2
<b>Total</b>	-	<b>15</b>

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%. Para a eletroforese foi utilizado tampão TBE 1x concentrado e corrente elétrica constante em 70 Watts, por um tempo médio de duas horas. 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'	5
4. Lavagem	Água destilada deionizada	1'	-
5. Impregnação	0,2% AgNO <sub>3</sub>	20'	3
6. Lavagem	Água destilada deionizada	30''	-

**Tabela 4.** Continuação.

PROCEDIMENTO	SOLUÇÃO	TEMPO	Nº DE VEZES PARA REUTILIZAÇÃO
7. Lavagem	Água destilada deionizada	30''	-
8. Revelação**	45g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 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 (Invitrogen<sup>TM</sup>), 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 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.

Após a finalização da padronização da amplificação desses *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.

## RESULTADOS PARCIAIS

Durante os meses de agosto, setembro e outubro de 2010, correspondentes às atividades laboratoriais do segundo trimestre do Subprograma de Genética de Populações, foi dada continuidade à padronização da amplificação dos sete marcadores microssatélites (pares de primers) desenvolvidos para a espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (Pcor-1, Pcor-2, Pcor-5, Pcor-7, Pcor-8, Pcor-10 e Pcor-21) e testados, por amplificação cruzada, no genoma de



*Pseudoplatystoma fasciatum*. Também foram dados continuidade aos testes com os 19 marcadores (pares de *primers*) desenvolvidos para *Brachyplatystoma rousseauxii* (Br-38, Br-40, Br-43, Br-44, Br-45, Br-47, Br-49, Br-50, Br-51, Br-52, Br-53, Br-54, Br-57, Br-61, Br-63, Br-67, Br-73, Br-75, Br-76) e testados tanto dos indivíduos da espécie *Brachyplatystoma rousseauxii*, proveniente do Rio Madeira, quanto para os testados, por amplificação cruzada, no genoma das espécies *Brachyplatystoma platynemum* e *Brachyplatystoma vaillantii*, também provenientes do rio Madeira.

A **Tabela 5** apresenta a relação dos marcadores microssatélites (pares de *primers*) que forma utilizados para a padronização e amplificação cruzada, 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 microssatélites, da sequência de bases nitrogenadas 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* utilizados e a diluição que foi preparada para a realização dos testes de amplificação de cada par de *primer*, e a **Tabela 7** relaciona os marcadores que permanecem em teste, para cada uma das espécies-alvo do Subprograma de Genética de Populações, de acordo com o que está relatado na literatura 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) <sub>9</sub> GC(TC) <sub>9</sub>	AAACCCGAGGATAACCAGTC	CAGCGTGCTACTAACACAAAC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor2	AY737064	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(AG) <sub>19</sub>	GATATGCAAATAAGAAGGTC	TCTTCTGGCTTTTCTCCTCT	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor5	AY737067	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(TC) <sub>8</sub> CC(TC) <sub>15</sub>	GACTAAGATTACACAGAGATTC	CTTGGTGGGAAACAGGC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor7	AY737069	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(AG) <sub>8</sub> GG(AG) <sub>2</sub> CG(AG) <sub>4</sub>	ATGCTGGGATACGCTCAGAC	GTGGCGAGTGAACAAGTCC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor8	AY737070	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(AC) <sub>12</sub>	ACACCATACGCACACTCG	TGAGGTCGGGTGATAAGGTC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor10	AY737072	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(GTCG) <sub>15</sub> (GT) <sub>9</sub> CC	TTTAAGACAGCACAGCCTGTGGGG	AAGACAGCGCCATAGATTTCTGCC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
Pcor21	AY737078	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	(GT) <sub>13</sub>	TCACCGAGAGGTCTGACCATGA	CTGTGGTTAACCAGCTAGCAC	-	Revaldaves <i>et al.</i> , 2005
BR38	GQ903737	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(TC) <sub>33</sub>	AGTTCCTTCTCGTCCCTTC	ATCTCCACTCTCTGGCTC	214–248	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR40	GQ903733	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) <sub>13</sub>	ACTCAGGGGCACTAACATGG	CTTTTGCTTTGACAGGCG	146–170	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR43	GQ903735	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) <sub>25</sub>	CCCAGAAAAGAAATCCAGCAG	CGCCAAATGAACAACACC	164–180	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR44	GQ903736	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) <sub>13</sub>	GTTGTGGGGTAGAAAGAAGGC	AGACGGGATCAGAGAGAGGAC	185–201	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR45	GQ903760	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(CT) <sub>15</sub>	TCTGTGGAGATTGAAGCCTG	GGTGCTGAAGATGGAGTGAAC	203–223	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR47	GQ903739	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(TG) <sub>11</sub>	TCAGTGTGTGTGACTGTTG	GCTCCTCTGTTTCACTTC	102–116	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR49	GQ903741	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(TC) <sub>17</sub>	GAGTGGTTGACTCTCCAGCA	GGACTGCATAGGGTTGTTGTC	296–312	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR50	GQ903742	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) <sub>21</sub>	CACAAGAGCTGAAACCTGCC	TATGCGCTAACCAACCTGT	218–250	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR51	GQ903743	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) <sub>18</sub>	GTTACACATGGTCGCTGGTG	GTTCACTCTCTCGGCTTCG	263–285	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR52	GQ903744	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) <sub>17</sub>	TGCATAGGCTTGTGTGAACC	GCACTGAGGAATCTGACCTTG	310–354	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR53	GQ903746	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(AC) <sub>15</sub>	TTTATGAGTGTGTTATCCGGCA	TGAGAGTGTCTCACTCCA	160–162	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR54	GQ903731	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(CA) <sub>25</sub>	AAACCAACCAACACACCCTC	GTCTGGATGCCAAGTCGTTT	223–269	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR57	GQ903748	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) <sub>26</sub>	CTAGAGCATCTGCGGGTAGTG	GCTGTCTCATTTACATTC	217–261	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR61	GQ903749	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(TG) <sub>23</sub>	CTGTGCAAAACATGAGGCAG	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) <sub>22</sub>	CATTCAAGTCTGCTCACCCAC	TGGAGTGCATAGGAAGAGAGG	219–249	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR67	GQ903752	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) <sub>18</sub>	AAATGCTCTTAGTGATCCGAGG	ATCAGACTCAAAGGTTTATGGG	224–252	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR73	GQ903756	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(CA) <sub>15</sub>	GAGGGGAAATATGAACTGCG	CAAGCGTATAGGTGGGGTTTG	103–125	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR75	GQ903758	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) <sub>18</sub>	GACAGTGAGTTGGAGTCGATGA	CAGGACTTTGGTGAAGGGAA	226–260	Batista <i>et al.</i> , 2009
BR76	GQ903759	<i>Brachyplatystoma rousseuaxii</i>	(GT) <sub>4</sub> AT (GT) <sub>7</sub>	GGGAATGACAAAACCTCAAACCT	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 <sub>2</sub> O)	ET (0,9 µM)	DILUIÇÃO (ET→H <sub>2</sub> O)
Pcor1 - F	GGGAATGACAAAACCTCAAACCT	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	TCTTCTGGCTTTTCCTCTCT	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 <sub>2</sub> O)	ET (0,9 μM)	DILUIÇÃO (ET→H <sub>2</sub> 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	AGTTCCTTCTCGTTCCTTC	21900	43,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR40 - R	ATCTCCCACTCTCTGGCTC	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	GCTCCTTGTTCACCTTC	22900	45,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR50 - F	GAGTGGTTTGACTCTCCAGCA	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	TATGCGCTAACCAACCTGT	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	GTTCACTCTTCGGCTTCG	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	TTTATGAGTGTATTCCGGCA	21500	43	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR54 - R	TGAGAGTGTGTTCACTTCCA	19900	39,8	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR57 - F	AAACCAACCAACACACCTC	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 <sub>2</sub> O)	ET (0,9 μM)	DILUIÇÃO (ET→H <sub>2</sub> O)
BR61 - R	GCTGTCTCATTACATTC	21700	43,4	500	100	1 → 4	0,9	1 → 110
BR63 - F	CTGTGCGAAAACATGAGGCAG	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 amplificação e o “X” indica que o marcador deverá ser amplificado na espécie.

Loco	<i>Brachyplatystoma rousseuxii</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	-
BR45	X	X	X	X	-

**Tabela 7.** Continuação.

<b>Loco</b>	<b><i>Brachyplatystoma rousseauxii</i></b>	<b><i>Brachyplatystoma vaillantii</i></b>	<b><i>Brachyplatystoma platynemum</i></b>	<b><i>Brachyplatystoma filamentosum</i></b>	<b><i>Pseudoplatystoma punctifer</i></b>
BR47	X	X	X	X	-
BR49	X	X	X	X	-
BR50	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	-	-	-	-
BR73	X	X	X	X	-
BR75	X	X	X	X	-
BR76	X	X	X	X	-

As **Tabelas 8 e 9** apresentam a relação dos indivíduos que foram adquiridos e encaminhados ao LGBio/ICB/UFG.

**Tabela 8.** Relação das amostras de peixes do rio Madeira recebidas pelo LGBio/ICB/UFG, sendo 11 indivíduos de peixes que foram comprados no mercado público municipal de Porto Velho-RO e 23 indivíduos correspondentes a primeira remessa.

Nº	Nº REGISTRO CAMPO	Nº REGISTRO LG&Bio	ESPÉCIE	NOME COMUM	COLETA/ PROCEDÊNCIA
01	01	Br-01(C)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Mercado
02	02	Bv-01(C)	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Pirurutaba	Mercado
03	03	Bv-02(C)	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Pirurutaba	Mercado
04	04	Bv-03(C)	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Pirurutaba	Mercado
05	05	Bp-01(C)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Mercado
06	06	Bp-02(C)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Mercado
07	07	Pf-01(C)	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Surubim	Mercado
08	08	Pf-02(C)	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Surubim	Mercado
09	09	Pf-03(C)	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Surubim	Mercado
10	10	Pf-04(C)	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Surubim	Mercado
11	11	Pf-05(C)	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Surubim	Mercado
12	GEN-01	Br-01(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
13	GEN-02	Br-02(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
14	GEN-03	Br-03(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
15	GEN-04	Br-04(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
16	GEN-05	Br-05(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
17	GEN-06	Br-06(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
18	GEN-07	Br-07(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
19	GEN-08	Br-08(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
20	GEN-09	Br-09(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
21	GEN-10	Br-10(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
22	GEN-11	Br-11(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
23	GEN-12	Br-12(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
24	GEN-13	Br-13(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
25	GEN-14	Br-14(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
26	GEN-15	Br-15(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
27	GEN-16	Br-16(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
28	GEN-17	Br-17(01)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	1ª remessa
29	GEN-18	Bp-01(01)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	1ª remessa
30	GEN-19	Bp-02(01)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	1ª remessa
31	GEN-20	Bp-03(01)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	1ª remessa
32	GEN-21	Bt-01(01)	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	Pintado	1ª remessa
33	GEN-22	Pf-01(01)	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Cachara	1ª remessa
34	GEN-23	Pf-02(01)	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Cachara	1ª remessa

**Tabela 9.** Relação das 59 amostras de peixes do rio Madeira recebidas pelo LGBio/ICB/UFMG correspondentes a segunda remessa.

Nº	Nº REGISTRO CAMPO	Nº REGISTRO LG&Bio	ESPÉCIE	NOME COMUM	COLETA/ PROCEDÊNCIA
1	2629	Bp-01(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
2	2630	Bp-02(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
3	2632	Bp-03(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
4	2633	Bp-04(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
5	2634	Bp-05(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
6	2635	Bp-06(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
7	2636	Bp-07(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
8	2637	Bp-08(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
9	2638	Bp-09(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
10	2639	Br-01(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Nova Mamoré
11	2640	Bp-10(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
12	2641	Bp-11(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Nova Mamoré
13	2642	Bp-12(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Mutum Paraná
14	2643	Br-02(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Nova Mamoré
15	2644	Bp-13(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
16	2645	Bf-01(02)	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	Filhote	lata
17	2646	Bf-02(02)	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	Filhote	lata
18	2647	Bp-14(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
19	2648	Bp-15(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
20	2649	Bp-16(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
21	2650	Bp-17(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
22	2651	Bp-18(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
23	2652	Bp-19(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
24	2653	Bp-20(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
25	2654	Bp-21(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
26	2655	Bp-22(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
27	2656	Bp-23(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
28	2657	Bp-24(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
29	2658	Bp-25(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
30	2659	Bp-26(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
31	2660	Bp-27(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	lata
32	2661	Br-03(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Guajará Mirim
33	2662	Br-04(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Vila Murтинho
34	2663	Br-05(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Vila Murтинho
35	2664	Br-06(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Vila Murтинho
36	2665	Br-07(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Vila Murтинho
37	2666	Br-08(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Vila Murтинho
38	2667	Bp-28(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murтинho
39	2668	Bp-29(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murтинho

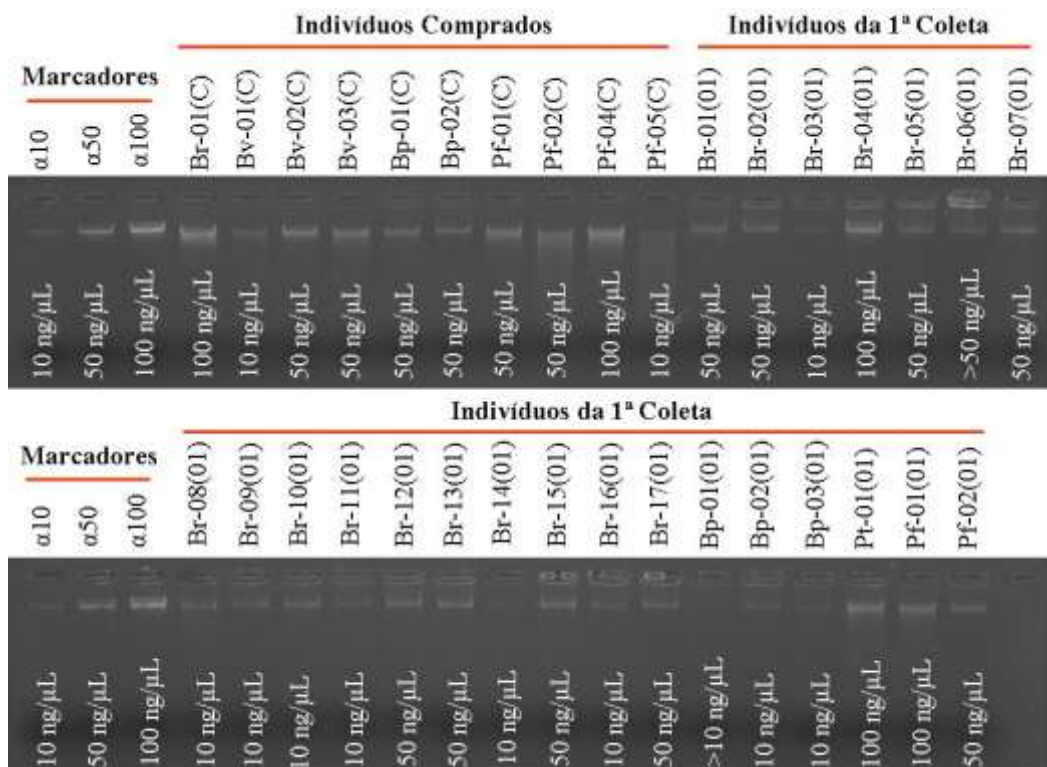


Tabela 9. Continuação.

Nº	Nº REGISTRO CAMPO	Nº REGISTRO LG&Bio	ESPÉCIE	NOME COMUM	COLETA/ PROCEDÊNCIA
40	2669	Bp-30(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
41	2674	Bp-31(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
42	2678	Bp-32(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
43	2679	Bp-33(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
44	2680	Bp-34(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
45	2682	Br-09(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Vila Murtinho
46	2684	Bp-35(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
47	2685	Br-10(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Vila Murtinho
48	2686	Bp-36(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
49	2689	Bp-37(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
50	2712	Bp-38(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
51	2713	Bp-39(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
52	2718	Bp-40(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
53	2719	Bp-41(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
54	2720	Bp-42(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
55	2721	Bp-43(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
56	2722	Bp-44(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
57	2723	Bp-45(02)	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	Vila Murtinho
58	2771	Br-11(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Rio Madeira - Jirau
59	2773	Br-12(02)	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	Rio Madeira - Karipuna

Para a realização dos testes, via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram usados três indivíduos de cada espécie do gênero *Brachyplatystoma* (*B. rousseauxii*, *B. vaillantii*, *B. platynemum*) e três do gênero *Pseudoplatystoma* (*P. fasciatum*), provenientes do mercado público municipal de Porto Velho – RO (código C) e da primeira remessa de indivíduos (código 01), destinados ao LGBio/ICB/UFG. Os indivíduos para testes com o gênero *Brachyplatystoma* foram Br-01 (C), Br-04 (01) e Br-15 (01); Bv-01 (C), Bv-02 (C) e Bv-03 (C); Bp-01 (C), Bp-02 (C) e Bp-02 (01), e para os testes com o gênero *Pseudoplatystoma* foram usados os indivíduos Pf-01(C), Pf-02(C) e Pf-05(C). Os indivíduos da segunda remessa, encaminhados ao LBio/ICB/UFG, ainda não foram usados neste trimestre de trabalho, uma vez que para este trabalho inicial de padronização e transferibilidade de marcadores microssatélites, nas espécies alvo do projeto, são necessários somente três indivíduos de cada espécie, que já foram adquiridos das amostras compradas no Mercado Público Municipal de Porto Velho e da primeira remessa.

Neste segundo trimestre de trabalho, foi feita uma nova extração de material dos indivíduos provenientes do mercado público e dos provenientes da primeira remessa. Durante a extração de DNA, houve a perda da amostra referente ao indivíduo Pf-03(C) (*Pseudoplatystoma fasciatum*), totalizando 33 indivíduos cujo DNA foi extraído com sucesso. A **Figura 2** ilustra o gel com o resultado da eletroforese contendo a quantificação destas amostras, que foram posteriormente usadas nos testes de padronização e amplificação cruzada dos marcadores microssatélites.

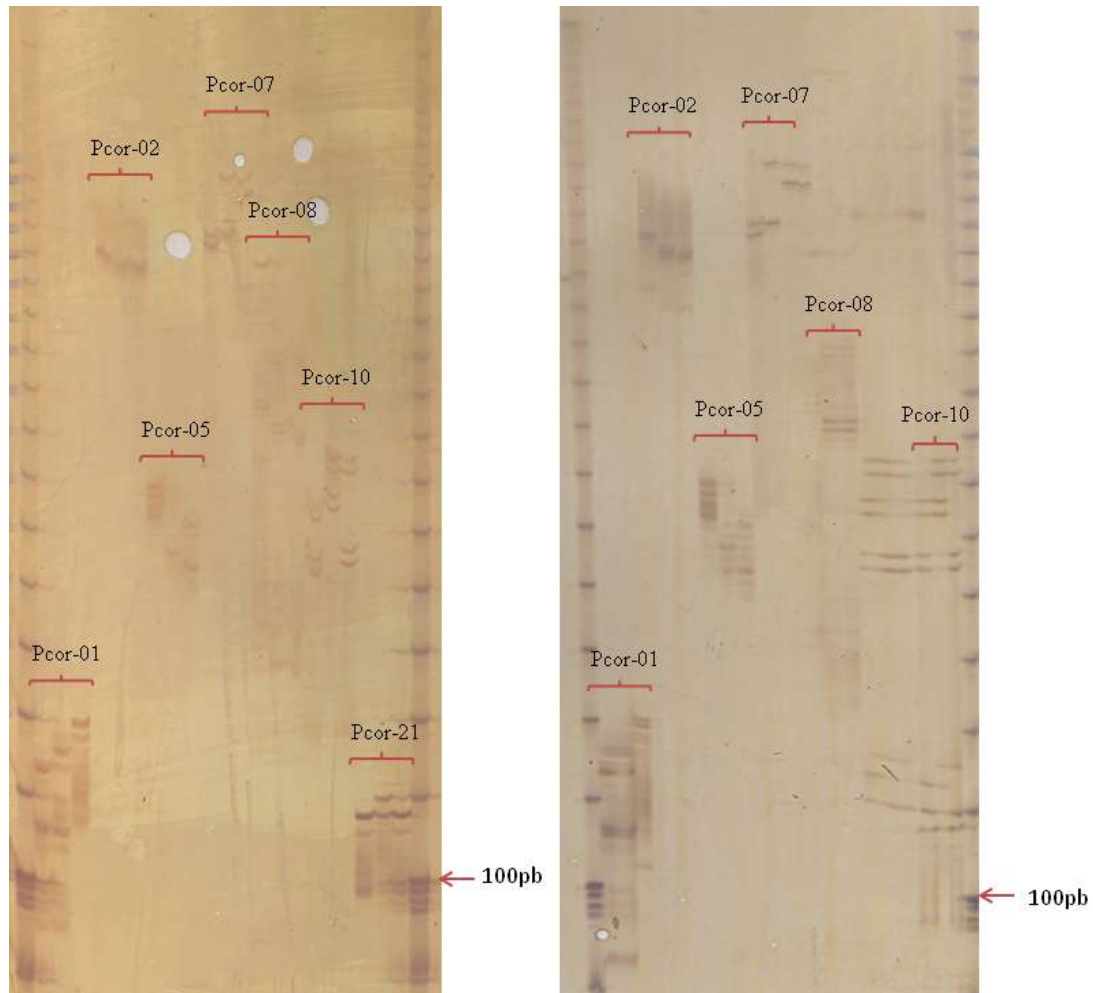


**Legenda:** α - Lambda; Br – *Brachyplatystoma rousseauxii*; Bv – *Brachyplatystoma vaillantii*; Bp – *Brachyplatystoma platynemum*; Pf – *Pseudoplatystoma fasciatum*; Pt – *Pseudoplatystoma tigrinum*.

**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1%, realizada para a quantificação de 23 indivíduos provenientes da primeira coleta de peixes do rio Madeira, e que serão usados para os testes de padronização e amplificação cruzada dos locos microssatélites Pcor e Br.

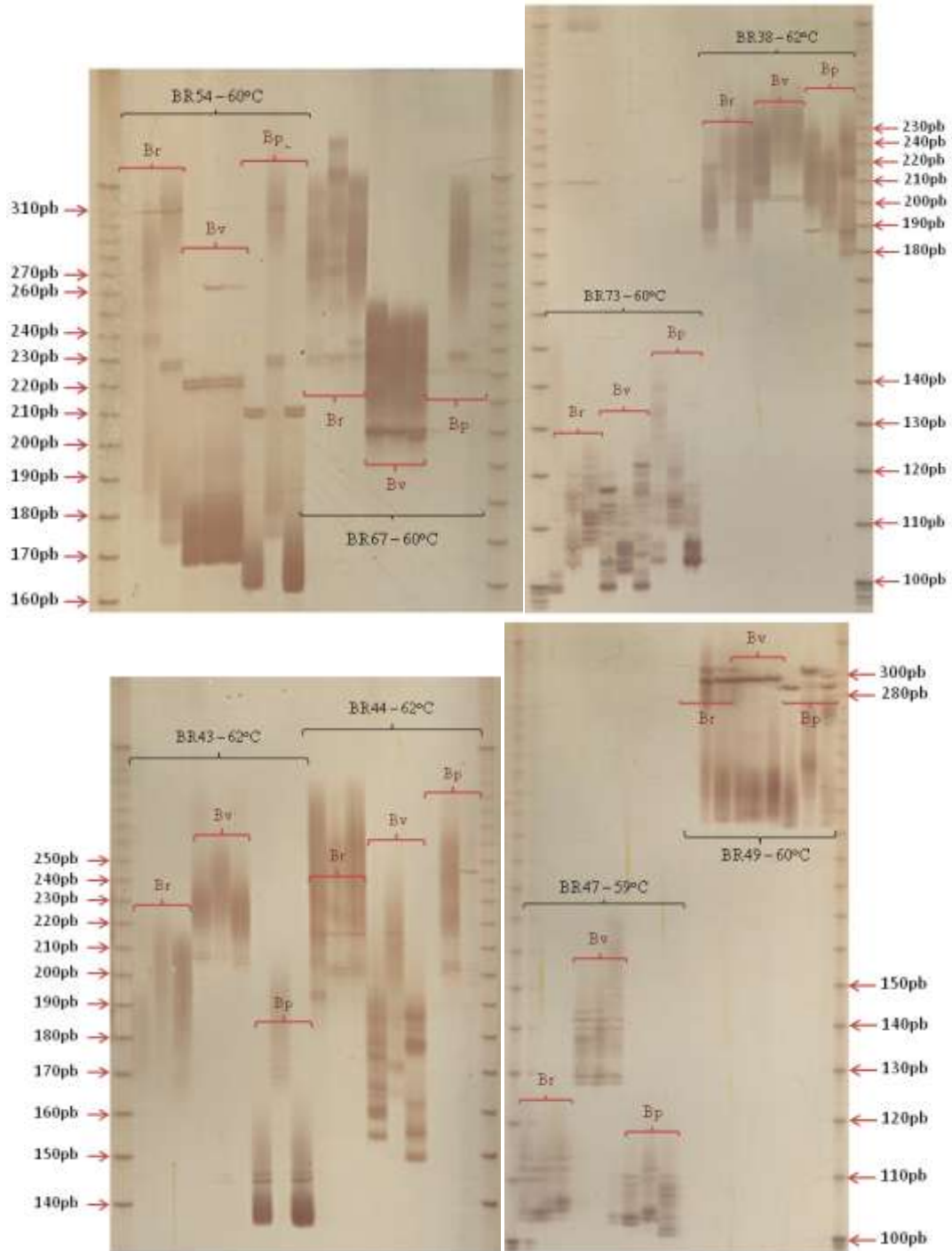
Para os testes de padronização e transferibilidade dos marcadores microssatélites foram necessários a realização de ajustes na quantidade de DNA na reação de PCR, uma vez que os resultados gerados em gel de poliacrilamida estavam apresentando muitos borrões e arrastes, que é indicativo de excesso de DNA nas reações. O resultado parcial obtido para os testes de padronização de amplificação desses marcadores microssatélites para as espécies *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Brachyplatystoma vaillantii*, *Brachyplatystoma platynemum* e

*Pseudoplatystoma fasciatum*, demonstrando alguns perfis eletroforéticos com produtos de ampliações dos testes realizados para os 26 locos microssatélites em Peixes do rio Madeira estão descritos nas **Figuras 3 e 4**.

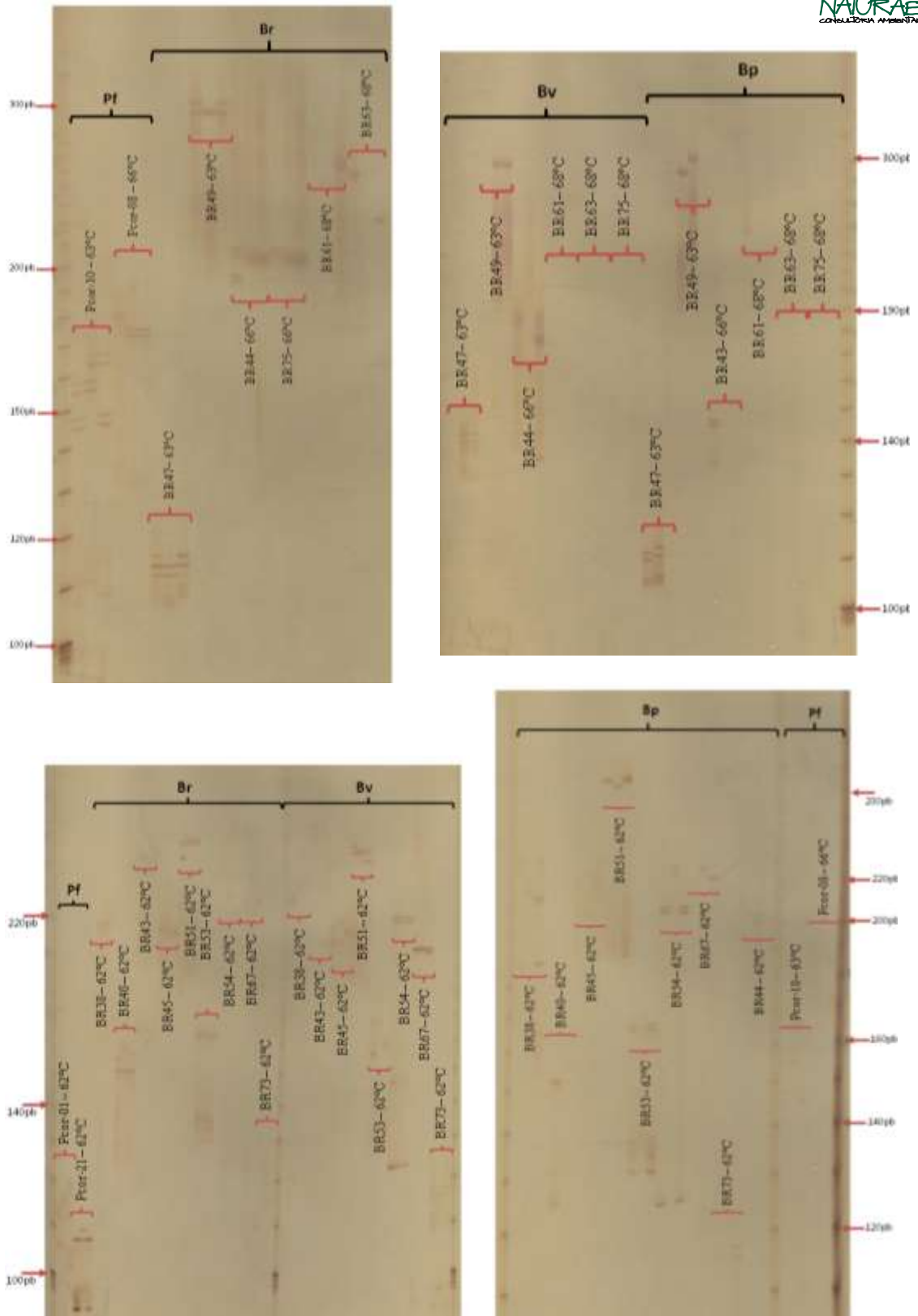


**Figura 3.** . Geis desnaturantes de poliacrilamida 6% demonstrando a amplificação de três indivíduos da espécie *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pf-01(C), Pf-02(C) e Pf-05(C)) com os *primers* Pcor-01, Pcor-02, Pcor-05, Pcor-07, Pcor-08, Pcor-10 e Pcor-21.

Com a diminuição da quantidade de DNA na reação de PCR, de 5 $\mu$ L para 3 $\mu$ L, o perfil eletroforético apresentou-se um pouco mais nítido, sem muitos arrastes, confirmando a hipótese de excesso de DNA nas amostras, o que pode ser verificado na **Figura 5**, que apresenta alguns resultados desta modificação na quantidade de DNA.



**Figura 4.** Geis desnaturantes de poliacrilamida 6% demonstrando a amplificação de alguns dos primers Br (Br38, Br-40, Br-43, Br-44, Br-45, Br-47, Br-49, Br-50, Br-51, Br-52, Br-53, Br-54, Br-57, Br-61, Br-63, Br-67, Br-73, Br-75, Br-76) usando três indivíduos das espécies *B. rousseauxii*, *B. platynemum* e *B. vaillantii* (Br-01 (C), Br-04 (O1) e Br-15 (O1); Bv-01 (C), Bv-02 (C) e Bv-03 (C); Bp-01 (C), Bp-02 (C) e Bp-02 (O1)).



**Figura 5.** Geis desnaturantes de poliacrilamida 6% demonstrando a amplificação dos alguns primers nas espécies *B. rousseauxii*, *B. platynemum* e *B. vaillantii*; e de alguns dos primers Pcor na espécie *P. fasciatum*.

A relação dos locos testados com as temperaturas de anelamento (TA) para os testes realizados durante o segundo trimestre de trabalho, seguido da faixa de variação do tamanho dos alelos encontrados como resultado de cada teste realizado para as espécies *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Brachyplatystoma vaillantii* e *Brachyplatystoma platynemum* estão descritos nas **Tabelas 9, 10, 11 e 12**, respectivamente. Os testes para a espécie *Brachyplatystoma filamentosum* ainda não foram iniciados em função do número insuficiente de indivíduos amostrados.

**Tabela 9.** Relação dos locos testados com as temperaturas de anelamento (TA) para os testes, seguido da faixa de variação do tamanho dos alelos encontrados como resultado de cada teste realizado para a espécie *Pseudoplatystoma fasciatum*. T.A. = Temperatura de anelamento; sp. = Espécie; Pf = *Pseudoplatystoma fasciatum*; V = variável entre os indivíduos; Curva = Para o próximo passo deve-se fazer uma curva com MgCl<sub>2</sub>; +- = Quase otimizado; ~ = Aproximadamente; < = Diminuir temperatura de anelamento; > = Aumentar temperatura de anelamento ou maior que...; ? = Dúvida; N = Não amplificou; RG = Repetir Gel. A temperatura inicial foi designada com base na temperatura descrita por Revaldaves *et al.* (2009) para Br.

Nº	Primer	Codificação 14/08/10			Codificação 18/08/10			Codificação 08-20-24/09/10			Codificação 06 e 18/10/10		
		T.A. °C	sp.Pf	Status	T.A. °C	sp.Pf	Status	T.A. °C	sp.Pf	Status	T.A. °C	sp.Pf	Status
1	Pcor-1	60	90-120 V	> 62	62	107-118	Curva +- ?	62	Ruim	R 62	62	Vários	RG / > 64
2	Pcor-2	58	222-222 V	OK	*	*	*	*	*	*	58	± 220	> 60
3	Pcor-5	60	145-160 V	> 63	63	?	?	63	N	< 60	60	140 - 160	> 62
4	Pcor-7	60	230-250 V	OK	*	*	*	*	*	*	60	225 - 260	> 62
5	Pcor-8	60	173-220 V	> 62	62	173-220 V	> 64	64	Vários	> 66	66	174 - 192	RG/ok? >67
6	Pcor-10	60	165-155 V	> 63	63	?	?	63	Ruim	R 63	63	148 - 168	RG / > 65
7	Pcor-21	60	?	> 62	62	108-110	Curva +-	62	Ruim	R 62	62	108 - <100	> 64
												Teste para todos com menor quantidade de DNA	

**Tabela 10.** Relação dos locos testados com as temperaturas de anelamento (TA) para os testes, seguido da faixa de variação do tamanho dos alelos encontrados como resultado de cada teste realizado para a espécie *Brachyplatystoma rousseauxii*. T.A. = Temperatura de anelamento; sp. = Espécie; Pf = *Pseudoplatystoma fasciatum*; V = variável entre os indivíduos; Curva = Para o próximo passo deve-se fazer uma curva com MgCl<sub>2</sub>; +- = Quase otimizado; ~ = Aproximadamente; < = Diminuir temperatura de anelamento; > = Aumentar temperatura de anelamento ou maior que...; ? = Dúvida; N = Não amplificou; RG = Repetir Gel. A temperatura inicial foi designada com base na temperatura descrita por Batista *et al.* (2009) para Br.

Nº	Loco	T.A (°C) do artigo	Nº de alelos (ref. Artigo para Br)	Codificação 24/08/10			Codificação 08-20-24/09/10			Codificação 06 e 18/10/10		
				T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status
1	BR38	62	16	62	200-220	Curva				62	200 - 220	RG / > 64
2	BR40	58	11	58	132-152	> 60 +-	60	135-155	> 62	62	150 - 160	> 64
3	BR43	62	8	62	170-170	Curva				62		RG / ok? 0,8MgCl <sub>2</sub>
4	BR44	62	8	62	193-215	> 64	64	> 330	> 66	62	196 - 208	> 68

**Tabela 10.** Continuação.

N°	Loco	T.A (°C) do artigo	N° de alelos (ref. Artigo para Br)	Codificação 24/08/10			Codificação 08-20-24/09/10			Codificação 06 e 18/10/10		
				T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status
5	BR45	62	9	62	210-220	Curva				62	210 - 220	> 64
6	BR47	59	5	59	105-115	> 61 +-	61	100-110	> 63	63	114 - 118	> 65
7	BR49	60	9	60	290-300	> 61 +-	61	280-290	> 63	63	290 - 300	> 65
8	BR50	60	16	60	170-180	< 58	58	90-162	> 56	56	?	> 60
9	BR51	60	8	60	265-280	> 62 +-				62	265 - 280	> 64
10	BR52	64	17a	64	248->330	? Curva	64	320-> 330	< DNA	64	> 330	> 66
11	BR53	60	8	60	?	> 62 +-				62	160 - 170	> 64
12	BR54	60	19	60	230-240	> 62 +-				62		RG / > 64
13	BR57	58	22	58	210-210	OK	*	*	*	58	210 - 240	> 60
14	BR61	65	13a	65	240-255	> 67 +-	67	Variável	> 68	68	240 - 270	< 67 Apagou
15	BR63	65	11	65	220-245	> 67 +-	67	Variável	> 68	68	222 - 248	< 67 Apagou
16	BR67	60	13a	60	230-238	> 62 +-				62		RG / > 64
17	BR73	60	11	60	?	> 62				62		RG / > 64
18	BR75	64	14	64	95-108	> 66 +-	95			66	202 - 208	> 68
19	BR76	64	18	64	?	Curva				64	165 - 250	> 66
										Teste para todos - Menor quantidade de DNA		

**Tabela 11.** Relação dos locos testados com as temperaturas de anelamento (TA) para os testes, seguido da faixa de variação do tamanho dos alelos encontrados como resultado de cada teste realizado para a espécie *Brachyplatystoma vaillantii*. T.A. = Temperatura de anelamento; sp. = Espécie; Pf = *Pseudoplatystoma fasciatum*; V = variável entre os indivíduos; Curva = Para o próximo passo deve-se fazer uma curva com MgCl<sub>2</sub>; +- = Quase otimizado; ~ = Aproximadamente; < = Diminuir temperatura de anelamento; > = Aumentar temperatura de anelamento ou maior que...; ? = Dúvida; N = Não amplificou; RG = Repetir Gel. A temperatura inicial foi designada com base na temperatura descrita por Batista *et al.* (2009) para Br.

N°	Loco	T.A (°C) do artigo	Altura do loco (ref. Artigo para Br)	Codificação 24/08/10			Codificação 08-20-24/09/10			Codificação 06 e 18/10/10		
				T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status
1	BR38	62	242-250	62	200-200	Curva				62		RG / > 64



Tabela 11. Continuação.

N°	Loco	T.A (°C) do artigo	Altura do loco (ref. Artigo para Br)	Codificação 24/08/10			Codificação 08-20-24/09/10			Codificação 06 e 18/10/10		
				T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status
2	BR40	58	140-152	58	132-152	< 56	56	N	< 54	54	115-152/200->	> 56
3	BR43	62	201-205	62	208-208	Curva				62		RG / 0,8 MgCl2
4	BR44	62	172-186	62	?	> 64	64	105-120	> 66	66	178-210	> 68 ou 0,8MgCl2
5	BR45	62	214-230	62	205-220	Curva ?				62		RG / > 64
6	BR47	59	137-151	59	130-142	> 61	61	120-135	> 63	63	144-152	> 65 ou 0,8MgCl2
7	BR49	60	293-297	60	295-295	> 61 +-	61	280-290	> 63	63	290	> 65
8	BR50	60	N	60	180-180	> 62	62	N	< 60	60	170-180	> 62
9	BR51	60	267-269	60	270-290	> 62 +-				62	260-270	> 64
10	BR52	64	317-329	64	320 ->330	Curva +-	64	320->330	R 64 < DNA	64	> 330	> 66
11	BR53	60	159-167	60	?	> 62 +-				62		RG / > 64
12	BR54	60	N	60	220-260	> 62 +-				62	225	> 64
13	BR57	58	N	58	N	< 56	56	N	> 54 ou Excl.	54	Sem padrão	> 56 ou Excl.
14	BR61	65	239-277	65	250-?	> 67 +-	67	Variavel	R 67 < DNA	68		< 67 Sumiu
15	BR63	65	N	65	240-258	> 67 +-	67	240-260	OK	68	—	< 67 Sumiu
16	BR67	60	N	60	198-200	> 62 +-				62	200	> 64
17	BR73	60	104-116	60	?	> 62				64	?	> 66
18	BR75	64	239-255	64	80-90	> 66 ?	66	80-90	> 68	68	—	< 66 Sumiu
19	BR76	64	91	64	?	Curva				64		Repetir
										Teste para todos - Menor quantidade de DNA		

**Tabela 12.** Relação dos locos testados com as temperaturas de anelamento (TA) para os testes, seguido da faixa de variação do tamanho dos alelos encontrados como resultado de cada teste realizado para a espécie *Brachyplatystoma platynemum*. T.A. = Temperatura de anelamento; sp. = Espécie; Pf = *Pseudoplatystoma fasciatum*; V = variável entre os indivíduos; Curva = Para o próximo passo deve-se fazer uma curva com MgCl<sub>2</sub>; +- = Quase otimizado; ~ = Aproximadamente; < = Diminuir temperatura de anelamento; > = Aumentar temperatura de anelamento ou maior que...; ? = Dúvida; N = Não amplificou; RG = Repetir Gel. A temperatura inicial foi designada com base na temperatura descrita por Batista *et al.* (2009) para Br.

N°	Loco	T.A (°C) do artigo	Altura do loco (ref. Artigo para Br)	Codificação 24/08/10			Codificação 08-20-24/09/10			Codificação 06 e 18/10/10		
				T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status	T.A °C	Altura do loco	Status
1	BR38	62	226-238	62	188-210	Curva				62	?	RG > 64
2	BR40	58	152-160	58	132-152	> 60	60	148-152	> 62	62	?	RG > 64
3	BR43	62	143	62	145-170	> 64	64	145-170	> 66 +-	66	?	Repetir 66
4	BR44	62	N	62	200-245	Curva				62	Variável	RG > 64 ou 0,8MgCl <sub>2</sub>
5	BR45	62	218-234	62	205-220	Curva ?				62	?	RG > 64
6	BR47	59	105-109	59	100-112	> 61	61	98-110	> 63 +-	63	100-110	> 65
7	BR49	60	289-291	60	290-300	> 61 +-	61	270-290	> 63	63	290-300	> 65
8	BR50	60	N	60	N	< 58	58	N	< 56 ou Excl.	56	Variável	> 58
9	BR51	60	269-285	60	280-290	> 62 +-				62	270-285	> 64
10	BR52	64	309-349	64	310-330	Curva +-	64	220->230	< DNA	64	305-330	> 66 ou 0,8MgCl <sub>2</sub>
11	BR53	60	159-169	60	?	> 62 +-				62	?	> 64
12	BR54	60	192-202	60	210-230	> 62 +-				62	210-230	> 64
13	BR57	58	235	58	N	< 56	56	N	< 54	54	?	> 56 ou 0,8MgCl <sub>2</sub>
14	BR61	65	235-251	65	240-255	> 67 +-	67	Variável	> 68	68	?	Repetir 68
15	BR63	65	190	65	220-248	> 67 +-	67	220-230	> 68	68	220-240	< 66
16	BR67	60	N	60	220-232	> 62 +-				62	220-230	RG ok? > 64
17	BR73	60	112-122	60	?	> 62				62	?	RG > 64
18	BR75	64	237	64	95-108	> 66 ?	66	95-110	> 68	68	90 - 105	< 65
19	BR76	64	77-121	64	170-235	Curva				64	230-240/150-170	> 66
Teste para todos - Menor quantidade de DNA												

## CONSIDERAÇÕES

Considerando os resultados existentes até o presente momento, já foi possível observar a presença de alelos bem definidos e locos polimórficos para as espécies *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Brachyplatystoma vaillantii*, *Brachyplatystoma platynemum* e *Pseudoplatystoma fasciatum*.

Corroborando com os resultados descritos por Batista *et al.*, (2009), os *primers* Br-57 e Br-50, não foram transferidos para as espécies *Brachyplatystoma vaillantii* e *Brachyplatystoma platynemum*, respectivamente, e por isso foram excluídos dos testes de padronização e amplificação cruzada dos marcadores microssatélites nessas espécies de peixes do rio Madeira. Em contrapartida, diferente do encontrado por Batista *et al.*, (2009), o loco Br-50 está praticamente padronizado para *Brachyplatystoma platynemum*, e segundo o autor, este loco não foi transferido para esta espécie.

Com relação à temperatura de anelamento do *primers*, houve diferenças em praticamente todos os locos, quando comparados com o descrito na literatura (Batista *et al.*, 2009; Revaldaves *et al.*, 2009). Desta forma, o tempo e os esforços para padronização destes *primers* estão sendo maiores que o esperado.

Além dos *primers* padronizados no primeiro trimestre de atividades laboratoriais (Pcor-02 e Pcor-07), foi possível padronizar, neste trimestre, a amplificação dos *primers* Br-57 e Br-75 para a espécie *Brachyplatystoma rousseauxii*, totalizando 2 (dois) marcadores microssatélites padronizados e transferidos para estudos genético-populacionais em *Pseudoplatystoma fasciatum* e 2 (dois) padronizados para estudos com *Brachyplatystoma rousseauxii*.

Na próxima etapa de atividades pretende-se finalizar esta fase de padronização e amplificação cruzada dos *primers* de regiões microssatélites nas espécies-alvo do Subprograma de Genética de Populações do AHE Jirau e concentrar esforços para a obtenção dos genótipos para todos os indivíduos coletados para essas espécies-alvo, produzindo os dados básicos para a avaliação da diversidade genética existente nas populações naturais ao longo do rio Madeira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATISTA, J. S.; FARIAS, I. P.; FORMIGA-AQUINO, K.; SOUSA, A. C. B.; ALVES-GOMES, J. A. 2009. 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 Genetic Resources*. 2: 5-10.

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.

REVALDAVES, E.; PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA; C. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, 5: 463-465.

Goiânia, 25 de novembro de 2010.



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

