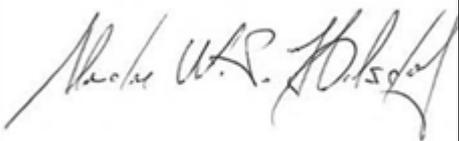


PROJETO BÁSICO AMBIENTAL UHE TELES PIRES

P.26 – Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

4º Relatório Semestral Fase de Operação

EQUIPE TÉCNICA RESPONSÁVEL PELO DESENVOLVIMENTO DAS ATIVIDADES DO PROGRAMA			
INTEGRANTES	CONSELHO DE CLASSE	CTF IBAMA	ASSINATURA
Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf	CRMV/Z 356/Z - D		

Janeiro – 2017

ÍNDICE

1. Introdução.....	4
2. Descrição das atividades realizadas no período	5
2.1 Tamanho amostral	5
2.2 Verificação da qualidade e pureza do DNA por meio de espectrofotometria de microvolume	5
2.3. Preparo das bibliotecas genômicas para GBS.....	7
2.4. Preparo da biblioteca genômica para busca por microssatélites	10
3. Demonstração de conformidade (comparação do realizado com o previsto)	10
4. Discussão de resultados (análise dos resultados).....	10
5. Programação para o período seguinte.....	10
6. Referências Bibliográficas.....	11

LISTA DE SIGLAS

DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

1. Introdução

A genética de populações é uma área das ciências biológicas cujos objetivos principais são estimar propriedades genéticas e demográficas das populações abrangidas no estudo. Deste modo, informações como taxas de recombinação, mutação e migração servem como base para o cálculo de tais estimativas (Wang et al., 2003).

Estimativas como a variabilidade genética fornecem dados valiosos sobre o status de uma ou várias populações selvagens, tais como se as populações estão em expansão ou se sofreram uma redução súbita. Estes dados, por sua vez, auxiliam no direcionamento de ações de manejo para conservação destas espécies. Flutuações no tamanho populacional ocorrem naturalmente nos mais diversos ambientes, entretanto o monitoramento da diversidade genética permite inferir se estas flutuações não são drásticas o suficiente para impedir a restauração das populações. Quando se tem por objetivo a preservação de populações, levantar tais dados a respeito das populações atuais e do histórico evolutivo das mesmas é de fundamental importância (Peter et al., 2010).

A detecção de padrões de estruturação genética entre as espécies depende do uso dos chamados marcadores moleculares, isto é, sequências de DNA (*Desoxyribonucleic Acid*) variáveis no genoma cujas diferenças podem ser mensuradas por métodos de biologia molecular (Yue, 2014). A quantidade e natureza destas diferenças fornecem informações de parentesco, fluxo gênico, histórico evolutivo e outras informações sobre os indivíduos analisados. Os tipos de marcadores mais utilizados em estudos de genética de populações são os SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e microssatélites, cada qual com suas vantagens e limitações.

Marcadores do tipo microssatélite consistem em sequências repetidas *in tandem* de dois a seis nucleotídeos que se encontram ao longo do genoma dos organismos, em regiões que não são codificadas. A facilidade no desenvolvimento dos microssatélites é, atualmente, uma de suas grandes vantagens. Já os marcadores SNP são mutações pontuais, isto é, a troca de uma única base na sequência de DNA. Este é o marcador encontrado com maior abundância no genoma dos organismos. Os SNPs estão presentes tanto em regiões não codificadas quanto em regiões codificadoras dos genes, podendo causar alterações funcionais nas proteínas (Sachidanandam et al., 2001). A enorme quantidade de marcadores SNP gerada por meio de tecnologias NGS fez com que este marcador venha sendo extensivamente utilizado em estudos populacionais nos mais diversos organismos.

Para os objetivos do programa, utilização dos dois marcadores moleculares considerados mais informativos para estudos populacionais consiste em uma enorme vantagem uma vez que será capaz de gerar grande quantidade de informações genéticas em um curto período de tempo. Com o conhecimento gerado a respeito da dinâmica genética entre as populações à jusante e à

montante do reservatório da UHE Teles Pires, as ações de manejo mais adequadas para cada espécie poderão ser desenvolvidas.

2. Descrição de atividades realizadas no período

As atividades realizadas no segundo semestre de 2016 incluem a extração, visualização e quantificação do DNA das amostras recebidas, além do preparo das bibliotecas genômicas que serão submetidas aos sequenciamentos visando à obtenção de marcadores moleculares do tipo SNP e microssatélite. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura da Universidade de Mogi das Cruzes, bem como no Laboratório de Biotecnologia da USP/Piracicaba.

2.1 Tamanho amostral

Para as análises genéticas, são necessários 60 indivíduos de cada espécime, de modo que 30 tenham sido coletados à jusante e 30 à montante. O total resultará em um número amostral de 180 indivíduos considerando as 6 espécies estudadas. Até o segundo semestre de 2016, as espécies que atingiram o número mínimo à montante foram *Brycon falcatus* (matrinxã), *Pseudoplatystoma punctifer* (cachara), *Zungaro Zungaro* (jaú) e *Prochilodus nigricans* (curimba). A espécie que já atingiu o número amostral à jusante foi *Brycon falcatus* (matrinxã).

2.2 Verificação da qualidade e pureza do DNA por meio de espectrofotometria de microvolume

As amostras de DNA tiveram seu DNA avaliado quanto à qualidade e pureza por meio do equipamento Nano Vue™ (GE Healthcare) e podem ser observadas na Tabela 01.

Tabela 01. Qualidade e pureza dos ácidos nucleicos de cada amostra avaliada por meio de espectrofotometria de microvolume com equipamento Nano Vue™.

AMOSTRA	ESPÉCIE	260/280	260/230
283	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,7	1,3
284	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,6
271	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,9
280	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,4	0,4
242	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,9
243	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,6
244	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,3
248	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,8
249	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,6	0,6
253	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	2
254	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,7	1,3
259	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,6
261	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,5
262	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,3
263	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,8	1,7
245	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	2,1
246	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,9
247	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	1
250	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,8
251	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,8
252	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	2
255	<i>Zungaro zungaro</i>	1,5	1,6
256	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	2,1
257	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	2,6
258	<i>Zungaro zungaro</i>	1,5	1,4
260	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	2,1
264	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	1,3
265	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	1,6
266	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	2,2
267	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	2
268	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,8
270	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,9
272	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,7
273	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	2,1
274	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	1,6
275	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,9
276	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,8
278	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,4
279	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	2,2
281	<i>Zungaro zungaro</i>	1,6	0,9
282	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,9
285	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,7	1,6
286	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	1,7
287	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,7	1,3
288	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	1,9
289	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	1,9

AMOSTRA	ESPÉCIE	260/280	260/230
290	<i>Zungaro zungaro</i>	1,7	1,8
242	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,80	2,00
253	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	1,80	2,00
86	<i>Prochilodus nigricans</i>	1,70	1,7
91	<i>Prochilodus nigricans</i>	1,70	1,80
101	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	1,50	1,70
268	<i>Zungaro zungaro</i>	1,80	1,70
270	<i>Zungaro zungaro</i>	1,70	1,70
107	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	1,60	1,30
197	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	1,70	1,70
122	<i>Zungaro zungaro</i>	1,70	1,80
121	<i>Zungaro zungaro</i>	1,80	1,80
119	<i>Zungaro zungaro</i>	1,30	1,30
118	<i>Zungaro zungaro</i>	1,70	1,30
117	<i>Zungaro zungaro</i>	1,70	1,10
116	<i>Zungaro zungaro</i>	1,80	1,30
113	<i>Zungaro zungaro</i>	1,50	1,30
172	<i>Brycon falcatus</i>	1,80	0,30
173	<i>Brycon falcatus</i>	1,80	0,70
174	<i>Brycon falcatus</i>	2,00	0,70
175	<i>Brycon falcatus</i>	1,70	0,30
176	<i>Brycon falcatus</i>	1,70	0,30
277	<i>Zungaro zungaro</i>	1,8	1,9

2.3. Preparo das bibliotecas genômicas para GBS

Para que se desenvolva marcadores moleculares do tipo SNP, as amostras devem ser submetidas à técnica de GBS (*Genotyping-by-sequencing*). Deste modo, duas bibliotecas genômicas deverão ser montadas, uma contendo 15 indivíduos de cada espécie coletados à jusante e outra contendo 15 indivíduos de cada espécie coletadas à montante. Das 180 amostras necessárias para as análises por GBS, 77 já estão avaliadas e aptas para serem submetidas à técnica. Para o início das análises, entretanto, é necessário um número mínimo de 90 indivíduos.

Uma vez separadas, tais amostras foram submetidas a novos testes para verificação de qualidade e para padronização da concentração de ácidos nucleicos de cada amostra, etapas que foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da USP. As amostras foram quantificadas no equipamento Qubit™ (ThermoFisher Scientific), e os resultados podem ser visualizados na Tabela 02.

Tabela 02. Quantificação das amostras por meio de espectrofotometria de microvolume com equipamento Qubit™.

AMOSTRA	ESPÉCIE	CONCENTRAÇÃO
1	<i>Brycon falcatus</i>	70,3
2	<i>Brycon falcatus</i>	49,7
3	<i>Brycon falcatus</i>	83,5
4	<i>Brycon falcatus</i>	60,5
5	<i>Brycon falcatus</i>	72,3
18	<i>Brycon falcatus</i>	68,3
19	<i>Brycon falcatus</i>	142
20	<i>Brycon falcatus</i>	74,1
27	<i>Brycon falcatus</i>	65
32	<i>Brycon falcatus</i>	81,9
36	<i>Brycon falcatus</i>	78,8
37	<i>Brycon falcatus</i>	49,2
46	<i>Brycon falcatus</i>	64,1
47	<i>Brycon falcatus</i>	50,7
48	<i>Brycon falcatus</i>	81,3
59	<i>Prochilodus nigricans</i>	84,9
60	<i>Prochilodus nigricans</i>	82,8
62	<i>Prochilodus nigricans</i>	102
63	<i>Prochilodus nigricans</i>	90,1
64	<i>Prochilodus nigricans</i>	87,4
65	<i>Prochilodus nigricans</i>	69,5
66	<i>Prochilodus nigricans</i>	90
68	<i>Prochilodus nigricans</i>	54,4
70	<i>Prochilodus nigricans</i>	680
71	<i>Prochilodus nigricans</i>	77,3
73	<i>Prochilodus nigricans</i>	68,5
72	<i>Prochilodus nigricans</i>	431
85	<i>Prochilodus nigricans</i>	91
88	<i>Prochilodus nigricans</i>	96,3
89	<i>Prochilodus nigricans</i>	93,2
245	<i>Zungaro zungaro</i>	99
246	<i>Zungaro zungaro</i>	91,5
247	<i>Zungaro zungaro</i>	590
250	<i>Zungaro zungaro</i>	116
251	<i>Zungaro zungaro</i>	109
252	<i>Zungaro zungaro</i>	250
255	<i>Zungaro zungaro</i>	147
256	<i>Zungaro zungaro</i>	87,8
257	<i>Zungaro zungaro</i>	393
258	<i>Zungaro zungaro</i>	230
260	<i>Zungaro zungaro</i>	89,2
264	<i>Zungaro zungaro</i>	107
265	<i>Zungaro zungaro</i>	64
266	<i>Zungaro zungaro</i>	91,6
267	<i>Zungaro zungaro</i>	112

As amostras foram então diluídas de modo que cada microtubo contivesse 20ng de DNA em 50µL de água. Feito isso, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação da integridade e quantidade do DNA (Figura 1), cuja legenda encontra-se na Tabela 05.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de amostras de *Brycon falcatus*, *Prochilodus nigricans* e *Zungaro zungaro*.

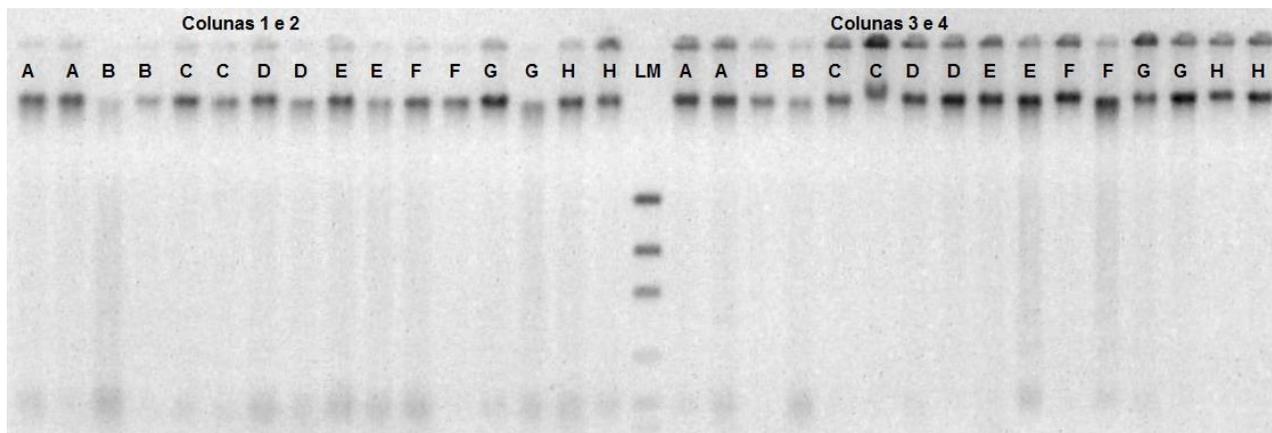


Tabela 03. Amostras de *Brycon falcatus*, *Prochilodus nigricans* e *Zungaro zungaro* submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%.

	1	2	3	4	5	6
A	1	27	60	71	247	260
B	2	32	62	73	250	264
C	3	36	63	72	251	265
D	4	37	64	85	252	266
E	5	46	65	88	255	267
F	18	47	66	89	256	
G	19	48	68	245	257	
H	20	49	70	246	258	

Numeração das amostras de acordo com Tabela 04.

2.4. Preparo da biblioteca genômica para busca por microssatélites

Os marcadores do tipo microssatélite serão desenvolvidos a partir do sequenciamento do genoma de cada espécie. A biblioteca genômica para esta finalidade já foi iniciada e contém 4 indivíduos, sendo eles *Brycon falcatus* (matrinxã), *Prochilodus nigricans* (curimba), *Brachyplatystoma filamentosum* (piraíba) e *Zungaro zungaro* (jaú). A princípio a espécie *Pseudoplatystoma punctifer* (cachara) não será incluída no preparo desta biblioteca visto que já existe marcadores do tipo microssatélite descritos na literatura para esta espécie. Caso estes marcadores não sejam adequados para o estudo genético do programa, então estes indivíduos serão incluídos para que se desenvolva tais microssatélites.

3. Demonstração de conformidade

Os experimentos estão de acordo com o prazo previsto no programa.

4. Discussão de resultados

Os ácidos nucleicos absorvem a luz em comprimento de onda de 260 nanômetros, enquanto que as proteínas a absorvem em comprimento de onda de 280 nanômetros. Deste modo a relação entre a absorção de luz 260/280nm fornece resultado quanto ao grau de pureza do DNA. O ácido nucleico é considerado com elevado grau de pureza quando apresenta este valor entre 1,8 e 2,0. Valores abaixo disso indicam algum tipo de contaminação por proteínas. Já a razão entre os comprimentos de onda 260/230nm são uma medida secundária de avaliação da pureza e qualidade dos ácidos nucleicos. É comum que este número seja ligeiramente elevado. Neste caso, testa-se a presença de contaminantes que absorvam luz em uma faixa de 230 nanômetros. De modo geral, pode-se observar que a grande maioria das amostras apresenta elevado grau de pureza. As amostras que não serão submetidas a protocolos de sequenciamento podem apresentar este grau de pureza ligeiramente menor, uma vez que a técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), às quais serão submetidas, não é inibida tão facilmente quanto as técnicas de sequenciamento.

5. Programação para o período seguinte

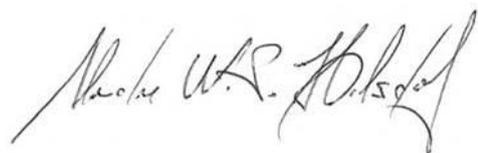
No semestre seguinte os primeiros dados relativos aos sequenciamentos serão obtidos. Um intenso trabalho de bioinformática será realizado para tratamento das seqüências obtidas, isto é, a busca por marcadores do tipo microssatélite e SNP. Uma vez determinados os marcadores moleculares mais adequados e informativos para o programa, estes serão então analisados nas amostras restantes, isto é, as que não foram submetidas aos sequenciamentos.

6. Referências Bibliográficas

PETER, B. M.; WEGMANN, D.; EXCOFFIER, L.; Distinguishing between population bottleneck and population subdivision by a Bayesian model choice procedure. **Molecular Ecology**, n. 19, p. 4648-4660, 2010.

WANG, J.; WHITLOCK, M. C.; Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. **Genetics**, n. 163, p. 429-446, 2003.

YUE, G. H.; Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture. **Fish and Fisheries**, v. 15, p. 376-396, 2014.



Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf
Oliveira Leite Coordenador e Resp.Técnico pelo Projeto

Luiz Carlos Jorge de
Diretor Presidente da FAEP