

FLÁVIA DIAS LADEIRA

Isolamento e caracterização de regiões de marcadores
moleculares de *Prochilodus lineatus* e *Salminus brasiliensis*
para análise genética de populações

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado
em Genética do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Genética

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte

Novembro de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

O SAL DA TERRA
(Beto Guedes)

“Anda,
quero te dizer nenhum segredo
Falo desse chão, da nossa casa,
vem que tá na hora de arrumar

Tempo,
quero viver mais duzentos anos
Quero não ferir meu semelhante,
nem por isso quero me ferir

Terra,
és o mais bonito dos planetas
Tão te maltratando por dinheiro,
tu que és a nave nossa irmã”

AGRADECIMENTOS

Por se tratar de uma conquista acadêmica, devo agradecer primeiramente a todos os funcionários da UFMG que permitiram que minha passagem por aqui. Desde os funcionários dos “Serviços Gerais” aos honrosos Pós-Doutores aqui presentes que, mesmo com o sucateamento do ensino público, continuam lutando para manter esta Universidade como referência de ensino. Vocês tem feito um bom trabalho.

Em segundo, gostaria de agradecer ao meu querido Professor e Orientador Evanguedes por nunca ter me decepcionado como referência profissional. Seus exemplos foram os melhores ensinamentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares presentes (Tati, Carol PUC, Bruno, Carol Campolina, Isa, Ana Paula, André, Anderson, Andréa e Marcão), passados (Thais, Higgor, Marcelo, Gabriel, Ana Luiza, Sibele, Flávia) e futuros (Liliam) por fazerem minhas horas de luta serem muito mais prazerosas. Aos alunos da Cleusa pelas conversas na sala de computador. Ao pessoal “vizinho de laboratório” pelas risadas. Um obrigado especial para a minha amiga Denize por fazer com que tudo estivesse no lugar certo e na hora certa.

A todos os professores do programa de Mestrado em Genética, em especial ao Professor Eduardo por me mostrar o caminho para solucionar minhas dúvidas e ao Professor Vasco pelo “puxão de orelha” quando estava desistindo o que me deu mais força para continuar.

Ao Professor Gilmar (PUC) por me auxiliar na zoologia e ecologia do nosso Curimba e ao pessoal do Centro de Transposição de Peixes (ICB/UFMG) pelo nosso Dourado.

Aos meus queridos alunos da Escola Municipal Professora Luiza Maria de Souza que tive que abandonar no último semestre do Mestrado. No futuro nos encontraremos e terei orgulho de vocês.

A Priscila, meu braço esquerdo (direito, pernas e cabeça) por ter aguentado a barra no CAPE (ex-Sophia) desempenhando um excelente papel de mim.

Aos meus irmãos e amigos por terem feito o caminho muitas vezes mais fácil e algumas vezes mais difícil. Nunca conseguimos agradar a todos.

Aos meus pais por terem proporcionado uma educação de qualidade e em especial a minha mãe por estar ao meu lado me ajudando a levantar quando caía.

Aos pais do Felipe por serem iluminados por essa mistura genética e ao Felipe por entender todos os meus momentos de ausência nesses últimos meses.

Ao responsável pela diversidade genética objeto de estudo desse trabalho.

ÍNDICE

1. AGRADECIMENTOS.....	II
2. ÍNDICE.....	III
3. LISTA DE FIGURAS	V
4. LISTA DE TABELAS	VI
5. LISTA DE ABREVIATURAS	VII
6. RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
<i>Bacia do Rio Pará</i>	<i>5</i>
<i>Hidrelétricas e o impacto na população de peixes</i>	<i>9</i>
<i>Marcadores moleculares</i>	<i>11</i>
<i>Análise de populações e microsatélites</i>	<i>12</i>
<i>Bancos de dados de DNA</i>	<i>13</i>
2. OBJETIVO	16
<i>Objetivos específicos</i>	<i>16</i>
3. FLUXOGRAMA DE TRABALHO	17
4. MATERIAS E MÉTODOS	18
<i>Amostras.....</i>	<i>18</i>
<i>Extração de DNA genômico</i>	<i>19</i>
<i>Digestão do DNA genômico com a enzima Sau 3AI e do vetor pUC18 com a enzima de restrição Bam HI</i>	<i>19</i>
<i>Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor pUC18</i>	<i>20</i>
<i>Transformação em bactérias Escherichia coli eletrocompetentes dos plasmídeos.....</i>	<i>21</i>
<i>Seleção pelo plaqueamento utilizando o indicador IPTG-Xgal e ampicilina.....</i>	<i>21</i>
<i>Extração de plasmídeos por lise alcalina.....</i>	<i>22</i>
<i>Triagem dos clones positivos</i>	<i>22</i>
<i>Transformação dos plasmídeos selecionados na triagem com sonda radioativa em bactérias Escherichia coli eletrocompetentes</i>	<i>23</i>
<i>Extração de plasmídeos por lise alcalina.....</i>	<i>24</i>
<i>Seqüenciamento.....</i>	<i>24</i>
<i>Análise do seqüenciamento.....</i>	<i>25</i>
<i>Padronização de PCR.....</i>	<i>26</i>
<i>Extração de DNA</i>	<i>27</i>
<i>Reação de Nested PCR.....</i>	<i>27</i>

<i>Sub-clonagem do produto de PCR em plasmídeo pCR®2.1 Invitrogen</i>	27
<i>Transformação dos plasmídeos pCR®2.1 (Invitrogen) em Escherichia coli eletrocompetentes</i>	29
<i>Extração dos plasmídeos pCR®2.1 (Invitrogen) por lise alcalina</i>	29
<i>Análise do seqüenciamento para verificação da variabilidade dos loci</i>	29
<i>Análise genômica das sequências obtidas</i>	30
5. RESULTADOS	31
<i>Transformação de plasmídeos em E. coli e extração de plasmídeos por lise alcalina</i>	31
<i>Seqüenciamento e análise dos clones de Prochilodus lineatus em banco de dados (NCBI)</i>	33
<i>Seqüenciamento e análise de Salminus brasiliensis em banco de dados (NCBI)</i>	44
<i>Padronização de PCR</i>	49
<i>Sub-clonagem do produto de PCR em plasmídeo pCR®2.1 Invitrogen</i>	52
<i>Análise do seqüenciamento para verificação da variabilidade dos loci</i>	53
6. DISCUSSÃO	54
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO I	Error! Bookmark not defined.
<i>Seqüenciamento dos clones de Prochilodus lineatus</i>	Error! Bookmark not defined.
ANEXO II	Error! Bookmark not defined.
<i>Seqüenciamento dos clones de Salminus brasiliensis</i>	Error! Bookmark not defined.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – <i>P. lineatus</i> – Curimatá.....	4
Figura 1.2 – <i>S. franciscanus</i> – Dourado.....	4
Figura 1.3 – Comitês das Bacias Hidrográficas do Estado de Minas Gerais	6
Figura 1.4 – Barragens hidrelétricas e Hidrografia de de Minas Gerais.....	8
Figura 1.5 – Dinâmica de variabilidade em microssatélites causadas pela formação de um grampo na fita que está sendo formada (à esquerda da figura) aumentando o número de repetições ou na fita molde (à direita da figura) diminuindo o número de repetições durante a replicação do DNA na região do microssatélite (Adaptado de ELLEGREN, 2004).....	12
Figura 1.6 – Crescimento da colaboração de seqüências de nucleotídeos no Banco de Dados Internacional (GeneBank). Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html	14
Figura 4.1 – mapa do vetor pUC18, evidenciando o Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS) no gene reporter lacZ e o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina (bla).....	20
Figura 4.2 – mapa do vetor pCR 2.1, evidenciando o sítio de inserção do produto de PCR dentro do gene reporter lacZ e o gene que confere resistência aos antibióticos ampicilina e kanamicina.	28
Figura 5.1 – autoradiografia dos clones de <i>S. brasiliensis</i> exemplificando os resultados obtidos na varredura por sonda radioativa	31
Figura 5.2 – Gel de agarose 1% com plasmídeos dos clones 2T22, 2T10 e 2T15. Canaletas: 1 a 4 – 2T22 1 a 4 respectivamente; 5 a 8 – 2T10 1 a 4 respectivamente, 9 a 12 – 2T15 1 a 4 respectivamente. Em destaque os clones selecionados para seqüenciamento: 2T22 1 e 2 (canaletas 1 e 2 respectivamente); 2T10 1 e 2 (canaletas 5 e 6 respectivamente); 2T15 1 e 2 (canaletas 9 e 10 respectivamente)	32
Figura 5.3 – Homologia entre as seqüências de <i>P. lineatus</i> do nosso grupo e as existentes no banco de dados NCBI.....	39
Figura 5.4 – Gráfico de proporção entre as seqüências de <i>P. lineatus</i> que possuem microssatélites e as que não possuem.....	44
Figura 5.5 – Gráfico de proporção entre os motivos dos microssatélites de <i>P. lineatus</i>	44
Figura 5.6 – Homologia entre as seqüências de <i>S. brasiliensis</i> do nosso grupo e as existentes no banco de dados NCBI.....	46
Figura 5.7 – Gráfico de proporção entre as seqüências de <i>S. brasiliensis</i> que possuem microssatélites e as que não possuem.....	49
Figura 5.8 – Gráfico de proporção entre os motivos dos microssatélites de <i>S. brasiliensis</i>	49
Figura 5.9 – Gel de acrilamida 6% com a padronização das PCRs. Iniciadores Proli 1, canaletas: 1 – Padrão 200 pb, 2 a 4 – temperatura de anelamento 56º C e 58º C, 5 a 7 – temperatura de anelamento 58º C e 60º. Tampões IB, IC, IVB nas canaletas 2 e 5, 3 e 6, 4 e 7 respectivamente. Iniciadores Proli 2, canaletas: 8 – Padrão 200 pb, 9 a 11 – temperatura de anelamento 56º C e 58º C, 12 a 14 – temperatura de anelamento 58º C e 60º. Tampões IB, IC, IVB nas canaletas 9 e 12, 10 e 13, 11 e 14 respectivamente. . 50	
Figura 5.10 – Gel de acrilamida 6% com a padronização das PCRs. Iniciadores Proli 3, canaletas: 1 – Padrão 200 pb, 2 a 4 – temperatura de anelamento 56º C e 58º C, 5 a 7 – temperatura de anelamento 58º C e 60º. Tampões IB, IC, IVB nas canaletas 2 e 5, 3 e 6, 4 e 7 respectivamente. Iniciadores Proli 4, canaletas: 8 – Padrão 200 pb, 9 a 11 – temperatura de anelamento 56º C e 58º C, 12 a 14 – temperatura de anelamento 58º C e 60º. Tampões IB, IC, IVB nas canaletas 9 e 12, 10 e 13, 11 e 14 respectivamente. . 50	
Figura 5.11 - Gel de agarose 0,8% exemplificando a extração de DNA realizada nos indivíduos de <i>P. costatus</i> do Rio Pará.....	51
Figura 5.12 - Gel de poliácridamida 6% exemplificando análise de polimorfismos de microssatélites anteriores realizada nos indivíduos de <i>P. costatus</i> do Rio Pará.....	52
Figura 5.13 - Gel de acrilamida 6% representando as Nested PCRs realizadas na população de <i>P. costatus</i> . Canaletas: 1 – Padrão 200 pb, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 – primeira reação do Nested PCR com os iniciadores Proli 5, Canaletas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 – segunda reação do Nested PCR com os iniciadores Proli 3, canaleta 16 – padrão 25pb. A seta a direita indica a banda de 125 pb e a reta, 150 pb. O tamanho do fragmento gerado pelos iniciadores Proli 3 são de 150 pb e pelos iniciadores Proli5, 699 pb.....	52
Figura 5.14 - Alinhamento das sequencias dos indivíduos C16, I39 e do clone 2U7 2 realizado no programa ClustalX 2.0 disponível em ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/clustalw2	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Clones de <i>P. lineatus</i> utilizados no trabalho: primeira coluna – denominação dos clones utilizados, segunda coluna – quantos seqüenciamentos de colônias diferentes foram realizados. Alguns clones tiveram mais que um seqüenciamento realizado devido a presença de mais que uma colônia por tubo coletada.....	32
Tabela 5.2 – Clones de <i>S. franciscanus</i> utilizados no trabalho: primeira coluna – denominação dos clones utilizados, segunda coluna – quantos seqüenciamentos de colônias diferentes foram realizados.	33
Tabela 5.3 – Dados dos iniciadores desenhados para os clones com microssatélite.	34
Tabela 5.4 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados da NCBI	35
Tabela 5.5 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI	36
Tabela 5.6 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI	37
Tabela 5.7 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI	38
Tabela 5.8 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI	39
Tabela 5.9– Dados dos iniciadores desenhados para os clones com microssatélite.	45
Tabela 5.10 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados da NCBI.....	45
Tabela 5.11 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI.....	45
Tabela 5.12 – PCRs padronizadas para iniciadores escolhidos	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

mM – mili Molar

μ L – microlitro

mg – miligrama

mL – mililitro

pH – potencial hidrogeniônico

RPM – rotações por minuto

M – Molar

ng - nanograma

° C – grau Celsius

g – grama

q.s.p – quantidade suficiente para

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

NaOH – hidróxido de sódio

cm – centímetro

mCi – miliCurie

NaCl – cloreto de Sódio

pmol – picomol

mm – milímetro

μ g – microgramas

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

NCBI - National Center for Biotechnology Information

pb – pares de bases

IPTG – Isopropil- β -tiogalactopiranosídeo

Xgal – 5-bromo-4cloro-3indolil- β -galactopiranosídeo

SSC – NaCl, citrato de sódio pH 7,2 (standard saline-citrate)

RESUMO

Estudos genéticos sobre peixes podem auxiliar importantes decisões de manejo, principalmente em áreas modificadas ou de forte influência humana, como por exemplo as represas. No estado de Minas Gerais uma área que merece atenção engloba os Rios São Francisco, Paraopeba e Rio das Velhas. No presente trabalho descrevemos a busca por marcadores de DNA para as espécies de peixe *Prochilodus lineatus* (Curimba) e *Salminus brasiliensis* (Dourado). A escolha das espécies foi baseada na sua importância econômica, social e ambiental. Utilizando bibliotecas genômicas feitas com o DNA de cada espécie e buscas realizadas com oligonucleotídeos marcados, analisamos por meio de sequenciamento de DNA dezenas de clones positivos para o sinal radioativo que possivelmente indicava uma região de microssatélite. Aproximadamente 34% dos clones positivos apresentaram regiões de microssatélites com potencial de uso para estudos de genética populacional; sendo 36% de *P. lineatus* e 64% de *S. brasiliensis*. A seqüência de DNA dos clones isolados foram também analisadas em bancos de dados de DNA e proteína e os resultados enriquecem o conhecimento "genômico" das duas espécies de peixes utilizadas. Mesmo analisando a variabilidade genética em um pequeno número de indivíduos, podemos sugerir que os iniciadores Proli 3 amplificam uma região de microssatélite variável que poderá ser utilizada pelo nosso grupo para análise populacional de *P. costatus*.

ABSTRACT

Genetic studies about fish may help to make important decisions about “handling” in areas modified or with human influence (like reservoir). In Minas Gerais the region of São Francisco, Paraopeba e Rio das Velhas rivers needs a special attention. In this work we described the for DNA marker for *Prochilodus lineatus* (Curimba) and *Salminus brasiliensis* (Dourado). We choose this species because of they economic, social and ambient importance. Using genomic libraries made with the DNA of each specie and “sweepings” made with marked oligonucleotides, we analized the DNA sequence of the positive clones. Approximately 34% of the clones have microsatellites regions with potencial use for studies of population genetic. The DNA sequence are analized in DNA and protein database and the results enhanced the genomic knowledge about the two species.

Analyzing the variability in a small number of individuals, we can suggest that the primers Proli 3 amplify a region of changeable microsatellite that could possibly be used by our group for population analysis of *P. costatus*.

INTRODUÇÃO

Prochilodus lineatus (Figura 1.1) é um peixe de clima subtropical encontrado em diversas bacias como Bacia Amazônica, Araguaia-Tocantins, Prata e São Francisco. Pertencente a família Prochilodontidae, ordem Characiforme, é conhecido popularmente por Curimatá, Curimba, Corumbatá ou Grumatã (FishBase – <http://www.fishbase.org>). Apresentam hábito alimentar iliófago, ou seja, alimentam-se de lodo e de detritos que estão ao fundo de lagos e rios. O *Salminus franciscanus* (Figura 1.2), por sua vez, é um peixe endêmico da Bacia do Rio São Francisco e é popularmente conhecido como Dourado do São Francisco. Da família Characidae e pertencente a mesma ordem do Curimba (FishBase – <http://www.fishbase.org>), o *S. franciscanus* era anteriormente conhecido como *S. brasiliensis*, mas em recente revisão, LIMA (2007) identificou características morfológicas que separavam o *S. franciscanus* de outras espécies do gênero. Tanto o Curimba quanto o Dourado são peixes de piracema, ou seja, fazem grandes deslocamentos em cardumes para desovarem em condições mais favoráveis ao desenvolvimento da prole.

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO – <http://www.fao.org>), aproximadamente 15% de toda proteína animal consumida no mundo é proveniente da pesca e aquicultura, o que torna essas atividades de grande importância para a segurança alimentar global. Existe um grande interesse comercial no Curimatá por servir de alimento para a população de baixa renda, pela sua abundância em certos ambientes naturais e ainda por suas ótimas características para piscicultura como: grande prolificidade (uma única fêmea pode desovar mais de um milhão de óvulos por temporada), seu alimento é barato, desenvolve-se com relativa facilidade e sua reprodução artificial já

é bem controlada por profissionais da área. Já o Dourado do São Francisco apresenta dificuldades para a piscicultura por sua piscivoria, mas é extremamente procurado para a pesca comercial e para a pesca esportiva por ser uma espécie agressiva.

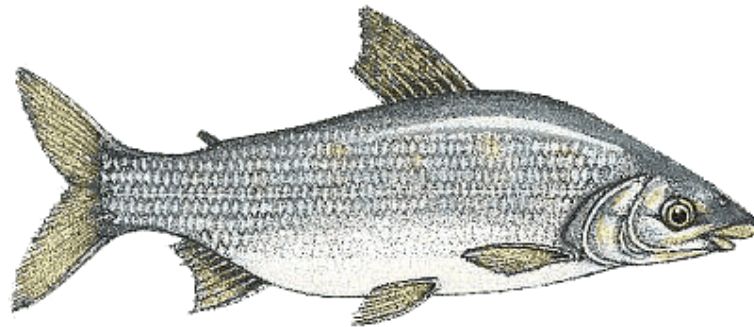


Figura 1.1 – *P. lineatus* – Curimatá
(<http://www.ambientebrasil.com.br/images/agua/peixes/doce/curimbata.gif>)



Figura 1.2 – *S. franciscanus* – Dourado
(<http://www.ambientebrasil.com.br/images/agua/peixes/doce/dourado.gif>)

Existem espécies de peixes que realizam grandes migrações para fins alimentícios ou reprodutivos em quase todos os rios da América Latina (AGOSTINHO, 2003). No Rio Pará, os gêneros *Prochilodus* e *Salminus* são conhecidos por suas migrações que acontecem após as enchentes anuais em direção a montante para oviposição. A migração para a área reprodutiva começa em Agosto-Setembro coincidindo com as primeiras chuvas e um aumento da

temperatura (CAPELETI, 2006), mas o surgimento de usinas hidrelétricas teve um grande efeito sobre as migrações por modificar a movimentação natural desses animais.

Com o crescimento da população humana surgiu a necessidade da construção de novas usinas hidrelétricas. No Brasil calcula-se que até 2009 cerca de 73% da energia elétrica será proveniente de hidrelétricas (<http://www.itaipu.gov.br/2sepocho/boletim1.htm>). Em Minas Gerais, nos últimos quatro anos, foi registrado um crescimento de aproximadamente 613.000 novos consumidores de energia elétrica, totalizando 6.240.218 consumidores em 2006 (<http://www.cemig.com.br/>). Cerca de 18% da área represada para hidrelétricas brasileira estão na Bacia do Rio São Francisco que é constituída pelos rios São Francisco, Pará, Itapecerica, Paropeba, das Velhas, Paracatu, Urucuia, Verde Grande, Carinhanha e seus afluentes.

Bacia do Rio Pará

O Instituto Mineiro de Gestão de Águas (IGAM) instituiu os Comitês de Bacias Hidrográficas que são responsáveis pelo gerenciamento dos recursos hídricos (Figura 1.3). Em 22 de Setembro de 1998, foi publicado no Diário Oficial do Estado de Minas Gerais o Decreto Estadual Nº 39 913 instituindo o Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Pará como órgão de Governo deliberativo e normativo para discutir as questões das águas na Bacia do Rio Pará (<http://www.cbhpara.org.br>).

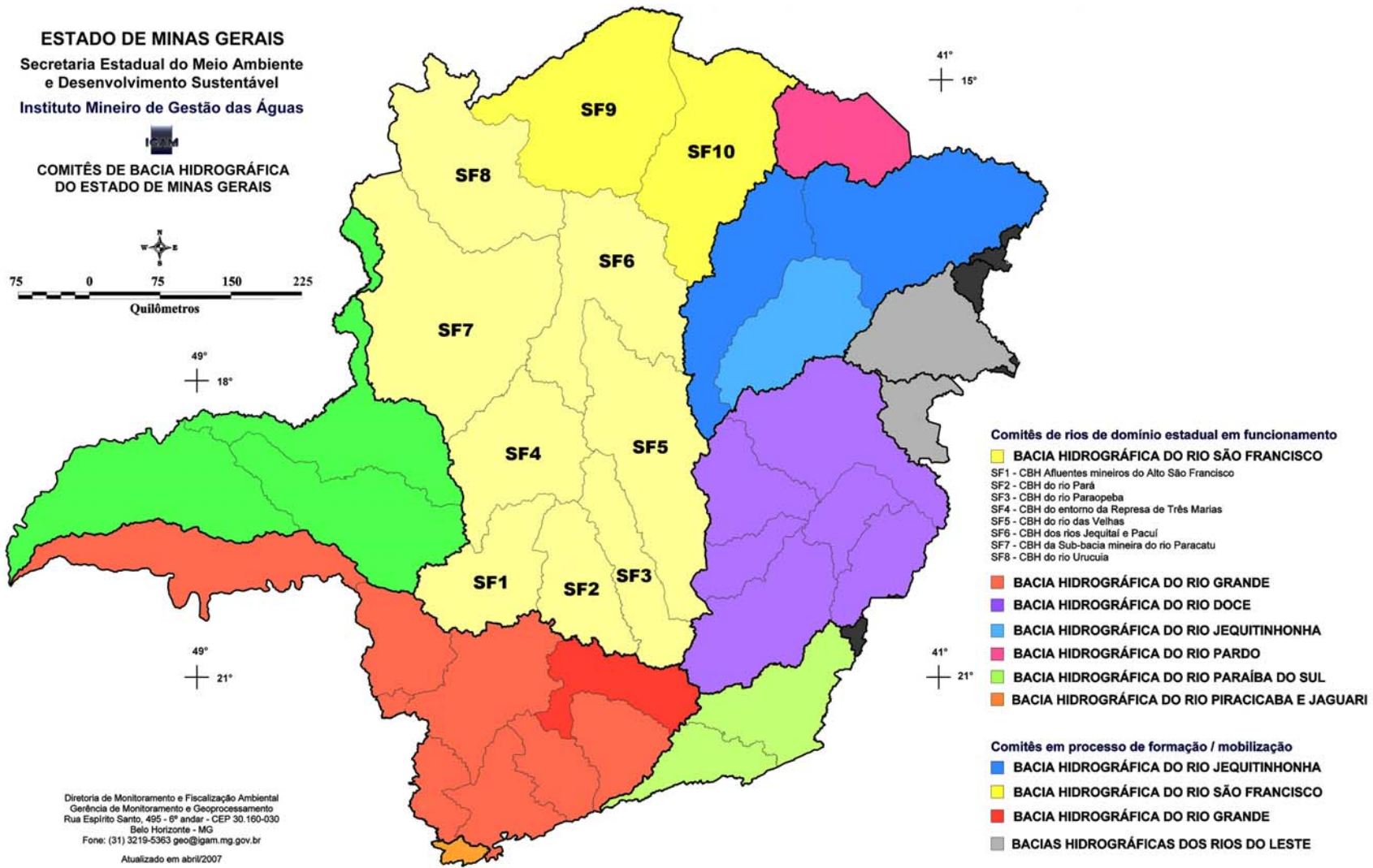


Figura 1.3 – Comitês das Bacias Hidrográficas do Estado de Minas Gerais
 (http://www.igam.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=120&Itemid=180)

O rio Pará nasce no município de Resende Costa e compreende uma área de drenagem de 12.262 km², atingindo uma extensão de 310,6 km. A bacia abrange um total de 38 municípios, atendendo a uma população estimada de 650 mil habitantes. A atividade minerária é desenvolvida em toda a bacia, com predomínio da extração de minerais não-metálicos. No alto e médio curso do rio Pará destaca-se a extração de areia e granito, enquanto que na sub-bacia do rio do Peixe, baixo curso, verifica-se a exploração de ardósia. O parque industrial é diversificado, abrangendo os ramos metalúrgico, têxtil e alimentício, além da produção de calçados, de fogos de artifício e dos curtumes. O Índice de Qualidade das Águas (IQA), que mede a qualidade da água para consumo humano, na bacia do rio Pará apresentou-se predominantemente no nível Médio em 2005. Entretanto, é necessário destacar o IQA Ruim verificado no Ribeirão Paciência e no Ribeirão Diamante e o IQA Muito Ruim apresentado pelo Ribeirão da Fartura ou Gama (http://www.igam.mg.gov.br/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=154).

O desnível total da bacia do São Francisco, onde o Rio Pará está situado, é de 1.600 metros com 14 grandes reservatórios para fins hidrelétricos (ANA – Agência Nacional de Águas). O reservatório de Sobradinho, maior lago artificial do Brasil com 4.200 km², está localizado nessa bacia além de outros como os de Gafanhoto com 500 m² e 25 metros de altura e de Cajuru com 25,5 km² e 22 metros de altura ambos situadas no Rio Pará (AGOSTINHO, 2007) (Figura 1.4).

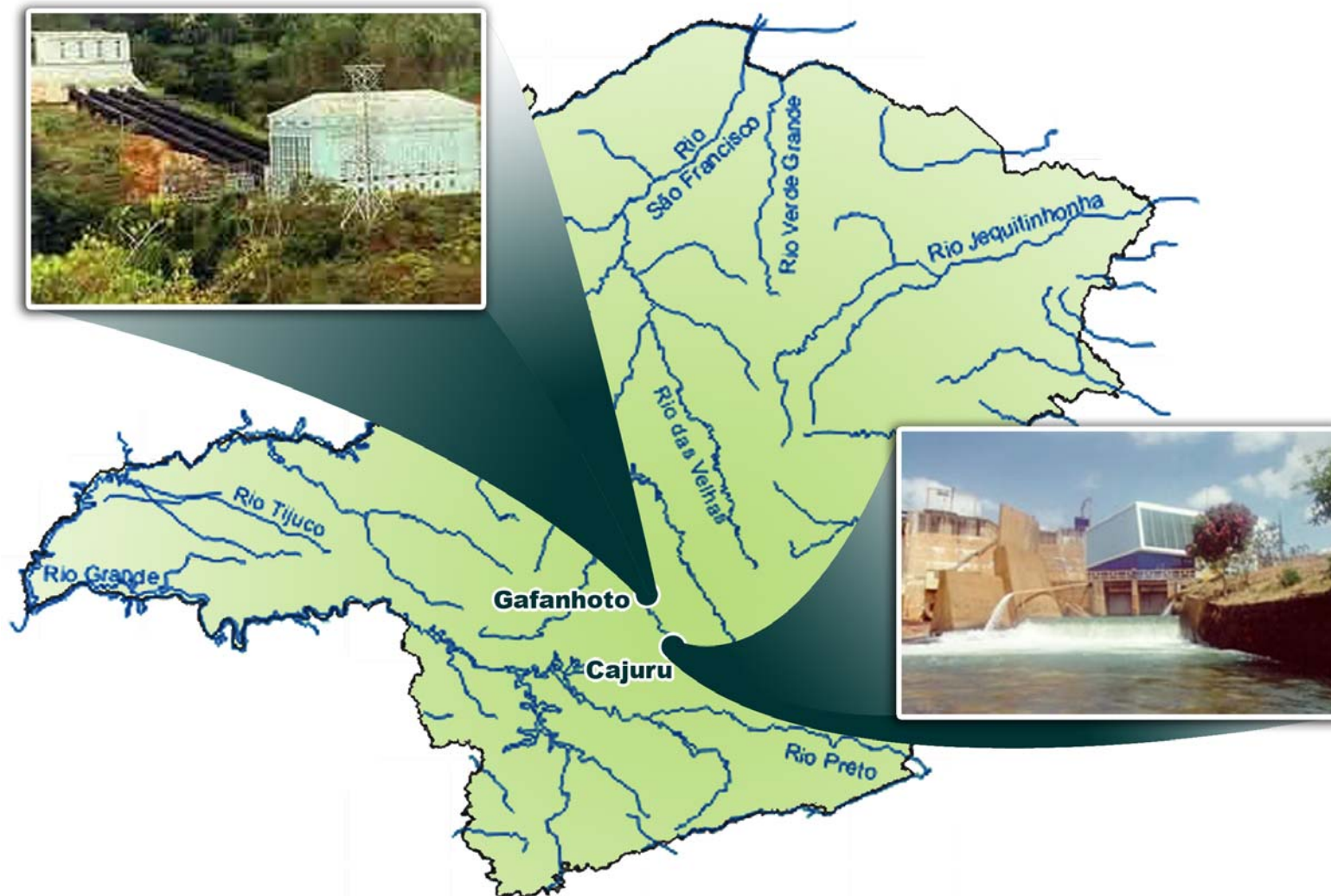


Figura 1.4 – Barragens hidrelétricas do Rio Para e Hidrografia de Minas Gerais.
(Adaptado de www.cemig.com.br e <http://www.ambientebrasil.com.br/estadual/hidrografia/hmg.html>)

Hidrelétricas e o impacto na população de peixes

Geralmente, após a construção da hidrelétrica há um declínio da população local de peixes que realizam piracema devido à mudança do ambiente e também pelo isolamento dos locais de desova e alimentação. Se habitats críticos forem perdidos ou se tornarem inacessíveis à espécie, esta poderá ser levada a uma extinção local (GODINHO, 1994; NERAAS, 2001). As populações de peixes também podem ser alteradas pois as barragens impedem o fluxo de indivíduos entre as populações e, conseqüentemente, a troca de genes que levaria a homogenização das frequências alélicas. É importante avaliar também o nível de heterozigosidade na população pois ela está relacionada com parâmetros importantes na sobrevivência das espécies, como a eficiência reprodutiva e resistência a doenças (MATIOLI, 2001). Se os níveis de heterozigosidade de espécies ameaçadas de extinção e de espécies semelhantes não ameaçadas forem comparados pode-se concluir que as primeiras apresentam níveis de heterozigosidade bem inferiores (SPIELMAN, 2004). Se as barreiras das hidrelétricas levarem ao isolamento reprodutivo haverá diminuição do tamanho efetivo da população, o que aumenta as chances de deriva e conseqüentemente a perda de variabilidade genética (VRIJRNHOEK, 1998). Além disso, pode haver um aumento de endogamia podendo levar a depressão endogâmica.

Segundo o parágrafo primeiro, artigo 22 do Decreto número 43.713, de 14 de janeiro de 2004, para o licenciamento ambiental de construção de novas barragens, reservatórios e represas para usinas hidrelétricas poderá ser exigida, a critério do órgão competente, a construção de estações de hidrobiologia ou mecanismos de transposição que propiciem a realização do fenômeno da piracema. Programas de manejo e conservação em espécies sujeitas a fragmentação por impacto do homem

só serão realmente eficazes considerando os fatores genéticos (FRANKHAM, 2003). As estratégias de aumento de tamanho populacional e de fluxo gênico entre populações devem ser realizadas com cuidado para que se possa reduzir o risco de deriva genética e de depressão endogâmica.

Na tentativa de minimizar os efeitos causados por barragens, duas principais estratégias de manejo vêm sendo utilizadas pelas companhias hidrelétricas: os sistemas de transposição de indivíduos através de escadas e elevadores e os programas de repovoamento. Qualquer estratégia de manejo utilizada deve ser cautelosa pois deve-se levar em consideração as condições naturais. A estrutura genética de uma população é a informação mais importante para uma espécie que necessita de manejo (HILLIS, 1996). Estudos genéticos das populações a montante e a jusante de barragens devem ser feitos para que seja verificado a distância genética: caso fassam parte da mesma população a comunicação genética entre elas é indicada, mas caso elas sejam geneticamente diferentes, o mais indicado é que cada uma permaneça em sua área evitando assim uma depressão exogâmica. Caso seja constatado a necessidade do fluxo entre as populações deve-se decidir qual das estratégias será utilizada: para que as escadas e elevadores sejam construídos de maneira eficaz é necessário um estudo prévio das populações que os utilizarão e para o repovoamento deve ser feito um estudo para que a variabilidade genética do ambiente natural seja mantida aumentando a chance de sucesso adaptativo em um ambiente com contínuas alterações.

O repovoamento pode ser feito pela coleta e transposição de peixes adultos acumulados abaixo das barragens na época da migração ou introdução de alevinos de estações de piscicultura. A introdução de genes de estoques selvagens nos cativeiro de reprodução deve ser feita com base em um planejamento genético para

evitar problemas de seleção e cruzamento de poucos indivíduos (*bottleneck*). O monitoramento da diversidade para evitar a perda de alelos raros pode ser feito através de marcadores moleculares (VRIJENHOEK, 1998).

Marcadores moleculares

Entende-se por marcadores moleculares todo fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA que pode ou não estar ligado à uma característica fenotípica (FERREIRA, 1996). Os marcadores moleculares são ferramentas importantes no estudo e avaliação genética de populações de peixes selvagens e em cativeiro (HILSDORF, 1998) e com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, novos marcadores vêm sendo localizados em regiões do genoma nuclear e mitocondrial. O uso de marcadores moleculares genéticos se difundiu entre os biólogos evolucionistas e a escolha da técnica para análise de um marcador depende do nível de variabilidade, a natureza da informação (dominância, co-dominância, ploidia) e os equipamentos disponíveis em laboratório para sua realização (ANNE, 2006).

Microssatélites são marcadores moleculares genéticos com repetições em tandem de pequenas seqüências de DNA com o motivo de um a seis pares de base. Essas repetições podem ser perfeitas ou imperfeitas (com inserções, substituições e deleções de bases no meio da repetição) e simples ou compostas (com mais de um motivo de repetições). Os microssatélites são as regiões com as seqüências mais variáveis do genoma (HILLIS, 1996). Essas variações acontecem pela formação de um grampo na fita molde (diminuindo o número de repetições) ou na fita que está sendo formada (aumentando o número de repetições) durante a replicação do DNA na região do microssatélite (Figura 1.5). É sabido que o número de repetições

dessas seqüências pode variar entre indivíduos sendo as variações no tamanho da seqüência mais significativas do que as variações na seqüência primária (ELEGREN, 2004). Com microssatélites curtos com 5 repetições já observamos uma taxa de alterações no número de cópias bem elevada (HILLIS, 1996).

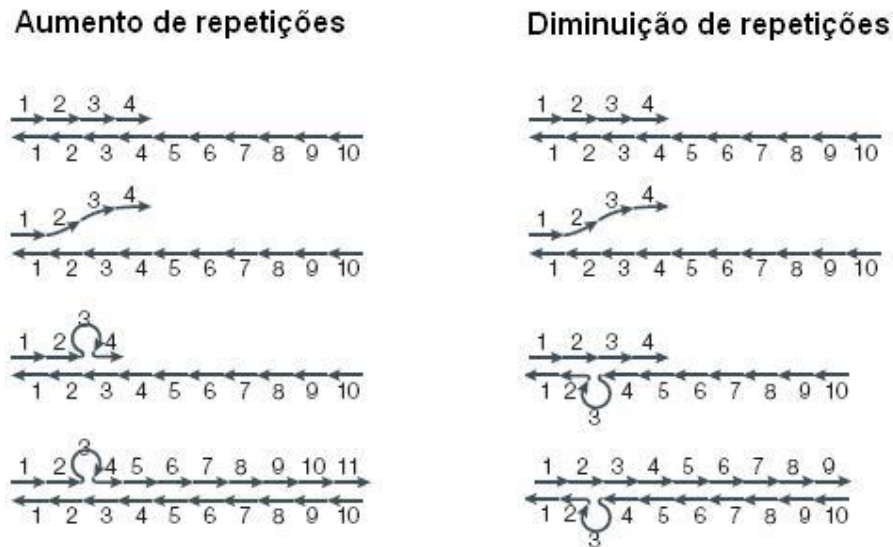


Figura 1.5 – Dinâmica de variabilidade em microssatélites causadas pela formação de um grampo na fita que está sendo formada (à esquerda da figura) aumentando o número de repetições ou na fita molde (à direita da figura) diminuindo o número de repetições durante a replicação do DNA na região do microssatélite (Adaptado de ELLEGREN, 2004).

Análise de populações e microssatélites

Nas últimas décadas os microssatélites se tornaram os marcadores genéticos mais populares e a análise desses marcadores está sendo utilizada em genética de populações. O alto grau de polimorfismo deste tipo de marcador é a maior vantagem, pois dessa forma os *loci* poderão ter uma grande heterozigosidade (SCHLÖTTERER, 2000). Quando a mutação ocorre em regiões codificantes rapidamente são eliminadas por seleção. A região dos microssatélites, por não ser codificante, poderá acumular essas mutações o que irá gerar um grande polimorfismo do *locus*. O desenvolvimento de técnicas que permitem o

seqüenciamento de produtos de reação em cadeia da polimerase (PCR) simplificou a geração de dados para análise da população (HILLIS, 1996).

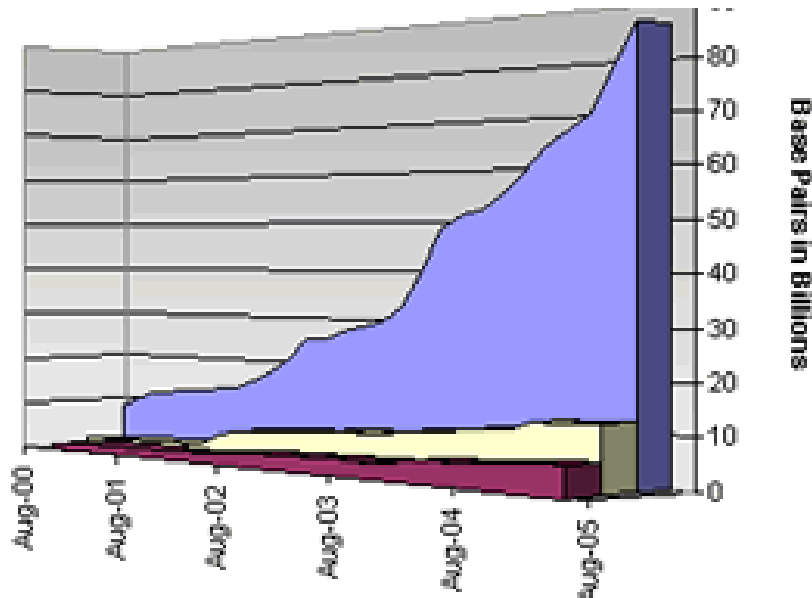
A biologia da conservação incorporou muitas tecnologias, incluindo a análise de microssatélites, para acelerar e aumentar a exatidão das decisões tomadas para a conservação (DESALLE, 2004). A análise de DNA é uma ferramenta importante no estudo de evolução, ecologia, genética de populações e sistemática (HILLIS, 1996).

A avaliação do impacto ambiental das barragens de hidroelétricas nas populações de peixes migratórios da região poderá ser realizada através do isolamento e análise das regiões de microssatélites. Com essa análise pode-se ainda verificar quais estratégias de conservação e manejo seriam adequadas para a região. Para o repovoamento com alevinos essa análise será de extrema importância pois as características genéticas da população local e da população introduzida deverão ser conhecidas antes do repovoamento.

Bancos de dados de DNA

Existe um crescente interesse pelo seqüenciamento do DNA por esse se tratar da unidade básica de informação codificada por um organismo e os dados gerados serem altamente informativos. O GeneBank é um banco de dados para seqüências de DNA mantido pelo Centro Nacional de Informações de Biotecnologia na Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América. De 1990 à 1995 o GeneBank triplicou a quantidade de nucleotídeos em seu banco de dados mostrando o crescente interesse por seqüências (HILLIS, 1996). O aumento do número de seqüências, que hoje chega a 100 Gigabases (http://www.nlm.nih.gov/news/press_releases/dna_rna_100_gig.html) (Figura 1.6) se deve ao aumento do número de laboratórios que têm acesso a coleta de dados de

seqüências de nucleotídeos e ao contínuo avanço nas tecnologias de seqüenciamento.



Base Pairs contributed by GenBank®— EMBL— DDBJ—
Figura 1.6 – Crescimento da colaboração de seqüências de nucleotídeos no Banco de Dados Internacional (GeneBank). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.

A análise de seqüências pode ser feita selecionando uma região alvo que possua uma quantidade suficiente de variações (como os microssatélites) entre os indivíduos, algumas cópias são isoladas e purificadas de cada indivíduo a ser analisado, o DNA purificado é seqüenciado e as seqüências são alinhadas. Esse seqüenciamento pode ser feito diretamente no DNA alvo quando sabemos a seqüência de nucleotídeos ou poderá ser feita clonando a seqüência em plasmídeos bacterianos e/ou virais para então ser seqüenciado.

O genoma de um indivíduo pode ser utilizado para construir uma biblioteca genômica onde praticamente todo o DNA do organismo é clonado em pedaços em um plasmídeo. Iniciando com uma quantidade qualquer de DNA, é possível

amplificar a seqüências alvo em quantidade e qualidade suficiente para o seqüenciamento (HILLIS, 1996).

O Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares da Universidade Federal de Minas Gerais tem experiência em construção de Bibliotecas Genômicas, incluindo a biblioteca de *P. lineatus* objeto de estudo neste projeto. A biblioteca foi construída com o DNA nuclear de *P. lineatus* clonado em plasmídeo pUC18 (Figura 4.1). Essa clonagem gerou cerca de nove mil e quatrocentos plasmídeos com insertos chamados de clones. Os clones foram triados com sonda radioativa com motivos GATA, TATC, GACA, GGAT, TATT, TACT, CGGA, GTCA, CCGT, GAGG, GATT, CATG, CCAG, CATG, CCAG, CTTG, CAGC, TATG, TAGT, AAGT, AAGT, CAT, CAC, GTA, GAA, AAT, CTT, CAC, CCG, CAG, CA, CT e TA para verificação de possíveis microssatélites gerando aproximadamente três mil e seiscentos clones com sinais positivos. Experimentos anteriores realizados com a mesma biblioteca mostraram um grande percentual de correlação entre clones positivos na triagem radioativa e a presença de microssatélites após o seqüenciamento. Essa experiência em construção de bibliotecas genômicas serviu como base para a construção de novas bibliotecas como a de *S. franciscanus* descrita no presente trabalho.

OBJETIVO

Esse projeto teve como objetivo localizar e caracterizar marcadores moleculares tanto em *P. lineatus* (Curimba) e quanto em *S. franciscanus* (Dourado).

Objetivos específicos

1. Obtenção de regiões de DNA de *P. lineatus* e *S. franciscanus* com potencial prático para análise aplicada à Genética de População.
2. Análise preliminar da caracterização do microssatélite em populações de *P. costatus* da região das Hidrelétricas de Gafanhoto e Cajuru.
3. Iniciar um banco genômico de *P. lineatus* e *S. franciscanus*.
4. Testar a eficiência do método de sub-clonagem de produto de PCR seguido de seqüenciamento para análise de variabilidade do microssatélite.

MATERIAS E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos do trabalho as etapas seguidas foram:

1. Varredura de biblioteca genômica
2. Eletrotransformação de plasmídeos de clones selecionados na triagem radioativa.
3. Extração e seleção de plasmídeos que serão seqüenciados.
4. Seqüenciamento das possíveis regiões de microsatélites encontradas pelas sondas radioativas.
5. Análise de seqüências e seleção de microsatélites.
6. Desenho de iniciadores de PCR para amplificar as regiões de microsatélites.
7. Padronização de PCR para *loci* de microsatélites.
8. Extração de DNA de indivíduos do Rio Para entre as hidrelétricas de Gafanhoto e Cajuru.
9. Análise da variabilidade dos *loci* de microsatélites em indivíduos coletados entre as hidrelétricas Gafanhoto e Cajuru no Rio Pará.
10. Análise genômica das sequências obtidas em bancos de dados especializados.

Amostras

Foram coletadas amostras das nadadeiras de *P. costatus* pelo Professor Doutor Gilmar Bastos Santos e de *S. brasiliensis* pelo Centro de Transposição de Peixes (ICB/UFMG) coordenado pelo Professor Doutor Alexandre Godinho. As amostras foram conservada em etanol 70% à -20°C.

Extração de DNA genômico

Indivíduos jovens, sem víceras, de *S. brasilienses* foram triturados em gelo seco. O produto da trituração foi ressuspensionado em TEN9 (Tris-HCl pH=9 50 mM, EDTA 100 mM e NaCl 200 mM) e agitado por 10 minutos. Foi adicionado 500 µL de SDS 20% e novamente agitado por 10 minutos. 500 µL de proteinase K (10 mg/mL) foi adicionada e agitado por 5 minutos. O tubo foi incubado por 8 – 20 horas a 37°C com agitação suave.

Após a incubação, 1 volume de fenol (pH 7,5) foi adicionado e o tubo foi agitado por 60 minutos. A amostra foi centrifugada a 13200 rpm por 10 minutos e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. À solução foi adicionado 1 volume de fenol-clorofórmio e novamente agitado manualmente por 60 minutos. A amostra foi centrifugada a 13200 rpm por 10 minutos e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 50 mL. Foi adicionado 1 volume de clorofórmio à fase aquosa e a solução foi misturada manualmente por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 13200 rpm por 10 minutos e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A seguir, foram adicionados 1/5 do volume de Acetato de Amônio 10 M e 1 volume de isopropanol. A solução foi misturada lentamente até o DNA precipitar e o mesmo foi retirado utilizando-se um bastão de vidro. O DNA foi lavado em etanol 70% e ressuspensionado em água.

Digestão do DNA genômico com a enzima *Sau 3AI* e do vetor pUC18 com a enzima de restrição *Bam HI*

O plasmídeo selecionado para a ligação do DNA extraído de *S. franciscanus* foi o pUC 18 (Figura 4.1) digerido pela enzima de restrição *Bam H I* (2 U/µg de

vetor). O vetor foi desfosforilado pela enzima fosfatase alcalina (Promega). O DNA foi digerido com a enzima *Sau* 3AI (2U/ µg de DNA)

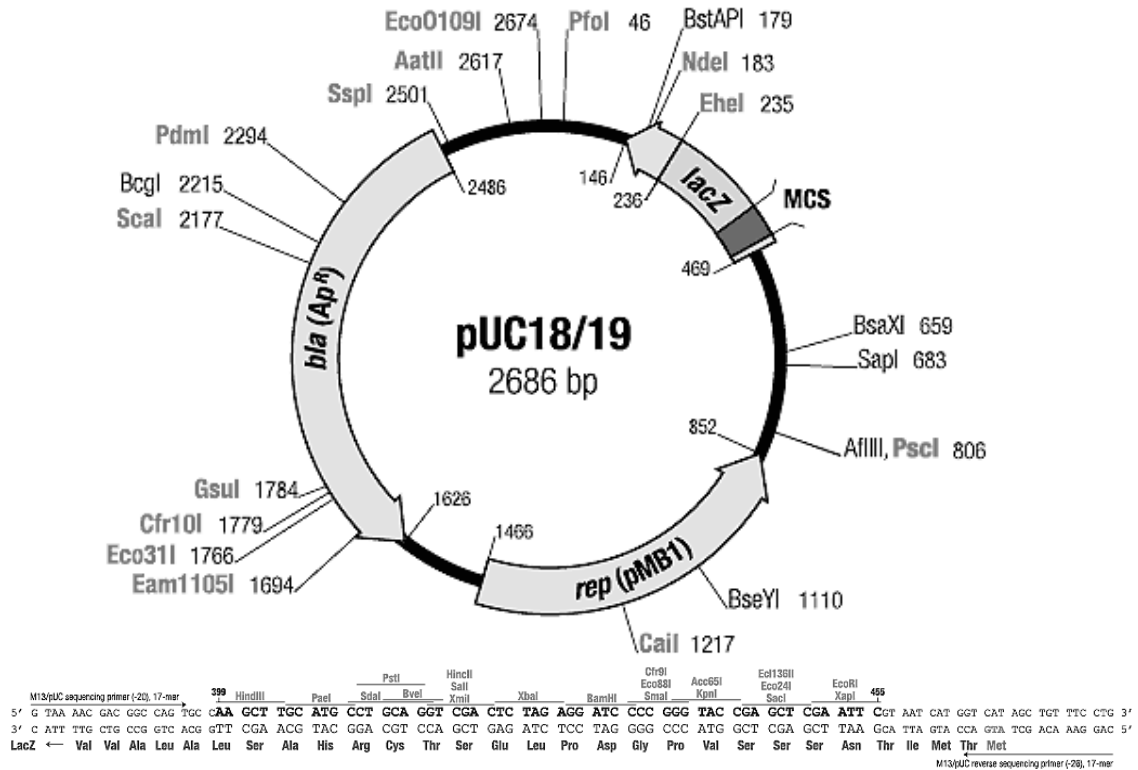


Figura 4.1 – mapa do vetor pUC18, evidenciando o Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS) no gene repórter lacZ e o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina (*bla*).

Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor pUC18

Foi utilizado 50 ng do vetor pUC18 digerido pela enzima *Bam* H I e 4 U de T4 DNA ligase para cada 10 ng de DNA digerido. O material foi incubado a 14°C por 18 horas e em seguida foi precipitado utilizando 2 volumes de etanol 100% e 1/5 do volume de acetato de sódio 3 M.

Transformação em bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes dos plasmídeos

Os plasmídeos precipitados após a reação de ligação foram ressuspensos em 10 µL de água bidestilada autoclavada (Phoneutria) e incubados com 100 µL de bactérias eletrocompetentes (*Escherichia coli*, linhagem TOPO10, lavadas em glicerol 10% e armazenadas a -80° C) por 1 minuto no gelo.

A solução de bactéria e plasmídeo foi então transferida para uma cubeta que foi submetida a um pulso de 2 kV (quilovolt) no eletroporador de pulso Micropulser da Bio-Rad. Após o choque foi adicionado 1 mL de solução SOC Phoneutria (20 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose) e após a homogeneização com a bactéria foi transferido para tubos de 1,5 mL que ficavam incubados por 1 hora a 37° C. Essa solução foi então transferida para outro tubo de 50 mL contendo meio 2XYT (5 g de NaCl, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, H₂O q.s.p. 1 L, pH 7.5) e ampicilina (1 µL de ampicilina/ mL de meio) que ficava à temperatura ambiente por cerca de 14 horas. A ampicilina foi utilizada para selecionar apenas as bactérias que tivessem o plasmídeo uma vez que o plasmídeo pUC18 confere resistência a este antibiótico.

Seleção pelo plaqueamento utilizando o indicador IPTG-Xgal e ampicilina

As bactérias que sofreram a eletrotransformação foram plaqueadas em meio LB ágar (10g de NaCl, 10g de bactotripton, 5g de extrato de levedura, 20g de ágar, água destilada q.s.p 1 L pH 7,5) com ampicilina (1 µg/mL de meio), IPTG (Isopropil-β-Tiogalactopiranosídeo) (4 µL) e Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β galactopiranosídeo) (400 µg) passando assim por duas seleções: ampiciliana para verificar a presença do plasmídeo na bactéria e IPTG/Xgal para verificar a presença

do inserto no plasmídeo. Como o fragmento de DNA é inserido dentro do gene LacZ os plasmídeos com inserto não produzem a β -galactosidase não conseguindo assim digerir Xgal permanecendo incolor. Os plasmídeos que não possuem inserto produzem a β -galactosidase, digerem o Xgal liberando um produto de coloração azul. O IPTG estimula a produção de β -galactosidase. As colônias brancas foram coletadas e transferidas para tubos contendo 1 ml de 2XYT com ampicilina e incubadas a 37°C por cerca de 14 horas.

Extração de plasmídeos por lise alcalina

Os tubos que continham as bactérias que estavam sendo incubadas por 14 horas em meio 2XYT com ampicilina a 37°C foram centrifugados por 5 minutos a 8.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Eram então adicionados 300 μ L de Solução I (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0), o *pellet* era ressuspendido e então eram adicionados 300 μ L de Solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%), 300 μ L de Solução III (acetato de potássio 3 M, 11,5% ácido acético glacial) e deixado por 5 minutos no gelo. Centrifugava-se então por 10 minutos a 13.200 rpm, transferia o sobrenadante para um novo tubo, adicionava 600 μ L de isopropanol e aguardava 15 minutos agitando esporadicamente. Os tubos eram centrifugados a 13.200 rpm por 10 minutos, descartava-se o sobrenadante, adicionava-se 1 mL de etanol 70%, centrifugava-se a 13.200 rpm por 10 minutos, descartava-se o sobrenadante e deixava secar a temperatura ambiente.

Triagem dos clones positivos

Os plasmídeos eram ressuspendidos em 20 μ L de TE (Tris-EDTA) com 0,06% de azul de bromofenol antes de serem aplicados 0,2 μ L em membranas de 11 x 14

cm de *nylon* carregadas positivamente (Biorad) seguindo a ordem de 35 colunas nomeadas de 1 a 35 em 27 linhas nomeadas de A a Z. Cada membrana foi numerada. Portanto o clone 2M13 está na membrana 2, linha M, coluna 13.

Foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos de 16 pares de bases marcadas com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP radioativo (10 mCi/mL – GE *Healthcare*) com os temas GATA, TATC, GACA, GGAT, TATT, TACT, CGGA, GTCA, CCGT, GAGG, GATT, CATG, CCAG, CATG, CCAG, CTTG, CAGC, TATG, TAGT, AAGT, AAGT, CAT, CAC, GTA, GAA, AAT, CTT, CAC, CCG, CAG, CA, CT e TA. A marcação radioativa foi feita na extremidade 5' pela enzima T4 quinase (5' *Labelling kit* – GE *Healthcare*).

Era realizada a hibridização dos oligos marcados com o DNA e 14 horas depois era feita a pré-hibridização bloqueando a membrana com BLOTO diluído 10x (leite em pó desnatado a 0,5%) e SSC 6x (NaCl 0,9 M, Citrato de Sódio 0,09 M). A hibridização foi realizada com 5 ng de sonda/mL de solução por 14 horas e então foram feitas lavagens de controle aumentando a estringência utilizando sal (SSC 6X, 5X e 3X) e aumentando a temperatura (48°C, 52°C e 55°C). As membranas eram expostas a chapas radiográficas (35 x 43 cm de filme Kodak T-Mat G/RA) entre cada lavagem por dois períodos diferentes (4 e 16 horas) a -80°C. As chapas foram então reveladas e fixadas.

Transformação dos plasmídeos selecionados na triagem com sonda radioativa em bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes

Os clones que tiveram resultado positivo na triagem com sonda radioativa tiveram seus plasmídeos precipitados com 10% do volume de acetato sódico a 3 Molar e 2 vezes o volume de etanol 100%, centrifugados por 10 minutos a 13.200 rpm, o sobrenadante foi retirado e então foi acrescido 200 μL de etanol 70%. Foram

novamente centrifugados a 13.200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi novamente retirado e então foi acrescentados 200 µL de etanol 70% novamente. Após a centrifugação a 13.200 rpm por 4 minutos, o sobrenadante foi novamente retirado e esperavamos a evaporação total do etanol. Os plasmídeos foram então ressuspensos em 10 µL de água bidestilada autoclavada (Phoneutria) e incubados com 100 µL bactérias eletrocompetentes (*E. coli*, linhagem TOPO10, lavadas em glicerol 10% e armazenadas a -80°C) para então serem transformados como descrito anteriormente (página 21).

Extração de plasmídeos por lise alcalina

Os tubos que continham as bactérias que estavam sendo incubadas por 14 horas em meio 2XYT com ampicilina a 37°C tiveram seus plasmídeos extraídos conforme descrito anteriormente (página 22).

Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento eram utilizados entre 100 e 200 ng de plasmídeo, 0,3 µL de BigDye Terminator v3.1 Cycle da Applied Biosystems, 1,6 pmol de iniciador do plasmídeo pUC18 (M13 direto 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' ou reverso 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'), 1,77 µL de Tampão de seqüenciamento BigDye Terminator v1.1, v3.1 da Applied Biosystems e H₂O q.s.p. 10 µL. Essa reação era depois ciclada no termociclador onde era realizado o programa padronizado para o seqüenciador 3130 Genetic Analyzer da Applied Biosystem (ver início da página seguinte):

96°C por 1 minuto
96°C por 15 segundos }
50°C por 15 segundos } 40 ciclos
60°C por 4 minutos }

O produto do termociclador era então precipitado com 40 µL de isopropanol 50%, deixado 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 13.200 rpm por 25 minutos a 25°C. O isopropanol era então removido e o *pellet* lavado com 300 µL de etanol 60%, centrifugado a 13.200 rpm por 5 minutos, o etanol era removido e esperava-se evaporar para então ser guardado à -20°C. Esse precipitado era então encaminhado para seqüenciamento no Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares do ICB/UFMG.

Análise do seqüenciamento

Após o seqüenciamento, as análises eram realizadas para confirmamação da existência de microssátélites e iniciadores para a PCR eram desenhados.

Para os seqüenciamentos realizados com o iniciador M13 reverso a seqüência era apresentada no sentido 3'-5'. Para conseguir a fita complementar no sentido 5'-3' era utilizado o programa Reverse Complement (disponível em http://bioinformatics.org/sms/rev_comp.html).

Eram excluídos das análises a região da seqüência que correspondia a do plasmídeo de clonagem pUC18. Para indentificar o vetor era utilizado o programa VecScreen (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) e a confirmação visual do resultado.

Era utilizado o programa Microsatellite Repeats Finder (disponível em http://biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php) para localização dos microssatélites.

Para desenho dos iniciadores das seqüências que continham microssatélites era utilizado o programa Primer3 v. 0.4.0 (disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/>) de onde eram selecionados aqueles que mais se enquadravam com os objetivos que eram aproximadamente 60% de bases C e G e temperatura média de anelamento entre 54°C e 60°C.

Para todos os programas utilizados os resultados obtidos foram criteriosamente analisados para verificação de possíveis erros.

Padronização de PCR

Após os iniciadores serem desenhados, as reações de PCR eram padronizadas de tal forma que fosse obtido uma quantidade suficiente de DNA de qualidade para o seqüenciamento (ver páginas 34 e 45). Para padronização variava-se a temperatura de anelamento dos iniciadores desenhados iniciando sempre pela Temperatura Média que corresponde a temperatura na qual metade dos potenciais sítios de ligação possivelmente terão iniciadores ligados a eles. Para calcular a Temperatura Média foi utilizado a fórmula $T_m = 4(G+C)+2(A+T)$ onde G, C, A e T são as bases nitrogenadas (HILLIS, 1996).

Eram variados também o número de repetições do ciclo de desnaturação, temperatura de anelamento dos iniciadores, tipo de tampão, além das quantidades de DNA molde e iniciadores.

Extração de DNA

Com as reações padronizadas, o DNA de 30 indivíduos *P. costatus* coletados ao longo do Rio Pará entre as represas de Cajuru e Gafanhoto foram extraídos pelo método de Chelex-Proteinase K (NELSON, 1998). Colocava-se 2 mm² de tecido da nadadeira dos indivíduos em 200 µL da solução de extração (5% de resina Chelex 100 em água e 0,1% de Tween-20) e 2 µL de proteinase K (10 mg/mL). Incubava-se as amostras a 60°C por 15 minutos e depois 95°C por 5 minutos. O material era armazenado a -20°C.

Apesar da biblioteca construída ser de *P. lineatus* as regiões de marcadores moleculares tem se mostrado conservada entre as espécies *P. costatus* e *P. lineatus*.

Reação de *Nested* PCR

A reação de *Nested* PCR consiste em realizar duas reações de PCR consecutivas (uma PCR é realizada com o produto de outra PCR) sendo a primeira realizada com iniciadores mais externos do que a segunda, otimizando assim os resultados obtidos. Foi realizado o *Nested* PCR dos indivíduos que tiveram seu DNA extraído.

Sub-clonagem do produto de PCR em plasmídeo pCR®2.1 Invitrogen

Para sub-clonagem os produtos da *Nested* PCR foram quantificados em gel de agarose 2%.

Para a ligação ao vetor foi utilizado 10 ng de produto de PCR, 50 ng do vetor pCR 2.1 (Figura 4.2), 1 µL de tampão de ligação 10x, 4 unidades de T4 ligase e água estéril suficiente para 10 µL de reação e foi incubado por 4 horas a 14°C.

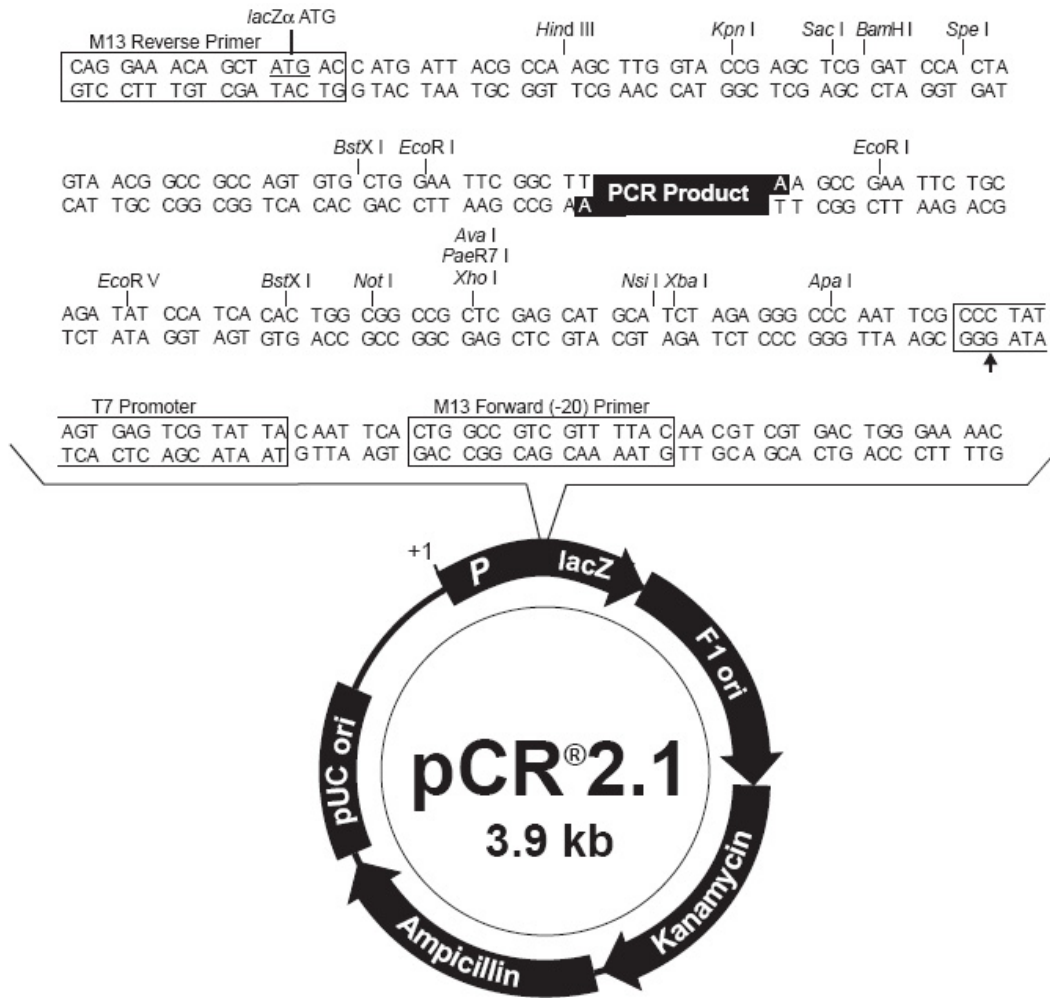


Figura 4.2 – mapa do vetor pCR 2.1, evidenciando o sítio de inserção do produto de PCR dentro do gene repórter lacZ e o gene que confere resistência aos antibióticos ampicilina e kanamicina.

O plasmídeo foi precipitado utilizando acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol 100%, e então deixado a -80°C por duas horas. O material foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante retirado. O *pellet* foi lavado acrescentando 200µL de etanol 70%, centrifugando por mais 5 minutos a 13.200 rpm, retirando o sobrenadante, acrescentando novamente 200 µL de etanol 70%, centrifugando por 4 minutos a 13.200 rpm, retirando o sobrenadante e deixando a temperatura ambiente até todo o etanol evaporar. Após esse procedimento o plasmídeo era ressuscitado em água e estava pronto para a transformação.

Transformação dos plasmídeos pCR®2.1 (Invitrogen) em *Escherichia coli* eletrocompetentes.

Os plasmídeos após a sub-clonagem eram incubados com 100 µL bactérias eletrocompetentes (*E. coli*, linhagem TOPO10) por 1 minuto no gelo e a transformação realizada como descrito na página 21.

Para seleção das bactérias que continham o plasmídeo, estas, após a transformação, foram plaqueadas em meio LB ágar, com ampicilina (1 µL de ampicilina/ mL de meio) e kanamicina (1 µL de ampicilina/ mL de meio). Após incubação das placas por 14 horas a 37°C, eram coletadas as colônias que cresceram pois essas possuíam o plasmídeo que as tornavam resistentes aos antibióticos. As colônias foram incubadas em 3 mL de meio 2XYT com ampicilina e kanamicina a 37°C com agitação por cerca de 14 horas para que as bactérias multiplicassem.

Extração dos plasmídeos pCR®2.1 (Invitrogen) por lise alcalina

Os tubos que continham as bactérias que estavam sendo incubadas tiveram seus plasmídeos extraídos conforme o descrito na página 22.

Após a extração do plasmídeo por lise alcalina, o plasmídeo era ressuspendido em 50 µL de RNase 10 µg/µL, esperava-se agir por 1 hora a 37°C para eliminação do RNA, era aplicado 1 µL da suspensão em um gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo para quantificar a extração dos plasmídeos que seriam seqüenciados como descrito na página 24.

Análise do seqüenciamento para verificação da variabilidade dos *loci*

Após o seqüenciamento, eram feitas análises para confirmar a existência de microssátelite conforme descrito anteriormente (página 25) e então eram feitas as análises da população selecionada como modelo para padronização da metodologia.

A variabilidade do *loci* foi analisada através do programa ClustalX 2.0 (LARKIN, M. A., 2007) (disponível em <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/clustalw2>).

Análise genômica das sequências obtidas

As sequências geradas nesse trabalho e por todo o grupo de pesquisa até a presente data, foram analisadas pelo programa BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sendo utilizado o MegaBALST para a verificação de similaridades à outros seres e à *P. lineatus*, *S. brasiliensis* e ao gênero *Salminus*. Foram analisadas também as similaridades entre as seqüências e as possíveis proteínas depositadas no banco de dado NCBI utilizando BLASTx.

RESULTADOS

Triagem dos clones positivos por sonda radioativa

Foram gerados 5000 clones de *S. brasiliensis* sendo que 530 apresentaram sinal positivo na varredura por sonda radioativa. A biblioteca já existente para *P. lineatus* possui 13000 clones sendo 667 positivos na varredura por sonda radioativa (Figura 5.1).

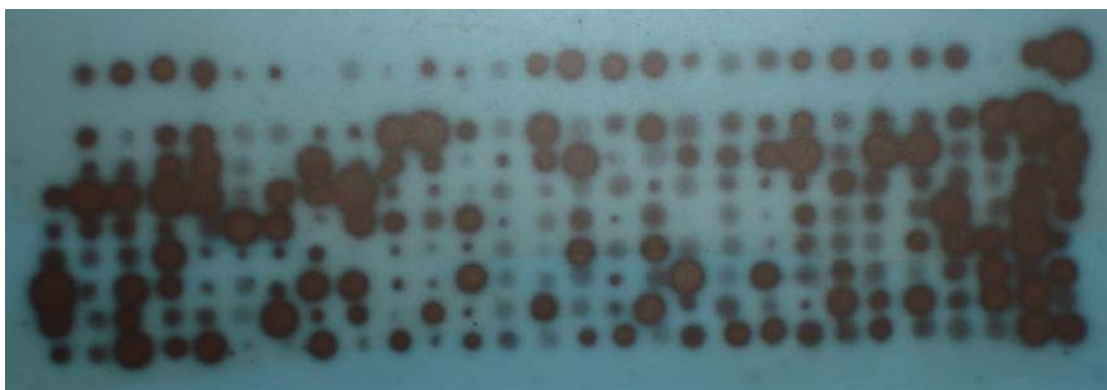


Figura 5.1 – Auto-radiografia dos clones de *S. brasiliensis* exemplificando os resultados obtidos na varredura por sonda radioativa

Transformação de plasmídeos em *E. coli* e extração de plasmídeos por lise alcalina

Para os clones com sinais positivos foi realizada a eletrotransformação. Foram selecionados 100 clones para este trabalho, após a análise em gel de agarose (Figura 5.2), que geraram 101 seqüências sendo 87 de *P. lineatus* (Tabela 5.1) e 14 de *S. brasiliensis* (Tabela 5.2). As tabelas 5.1 e 5.2 representam os clones que foram trabalhados e quantos seqüenciamentos foram realizados de cada clone. Para *P. lineatus* foi realizado mais que um seqüenciamento por clone pois, como foram gerados muitas colônias positivas na seleção por IPTG/Xgal e ampicilina na criação da biblioteca, foram coletadas mais que uma colônia por tubo, tendo assim mais que uma região do DNA em cada clone analisado na varredura.

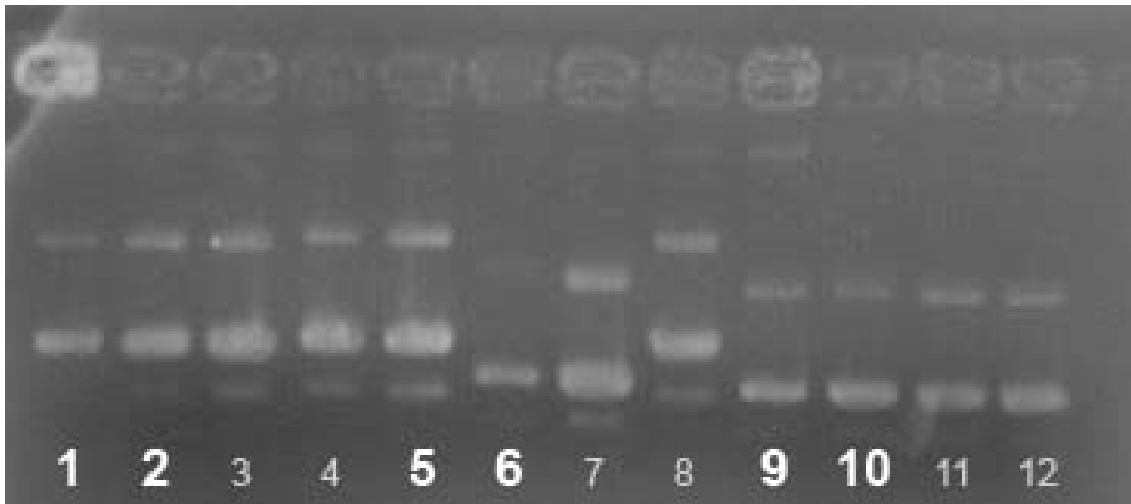


Figura 5.2 – Gel de agarose 1% com plasmídeos dos clones 2T22, 2T10 e 2T15. Canaletas: 1 a 4 – 2T22 1 a 4 respectivamente; 5 a 8 – 2T10 1 a 4 respectivamente, 9 a 12 – 2T15 1 a 4 respectivamente. Em destaque os clones selecionados para seqüenciamento: 2T22 1 e 2 (canaletas 1 e 2 respectivamente); 2T10 1 e 2 (canaletas 5 e 6 respectivamente); 2T15 1 e 2 (canaletas 9 e 10 respectivamente)

Tabela 5.1 – Clones de *P. lineatus* utilizados no trabalho: primeira coluna – denominação dos clones utilizados, segunda coluna – quantos seqüenciamentos de colônias diferentes foram realizados. Alguns clones tiveram mais que um seqüenciamento realizado devido à presença de mais que uma colônia por tubo coletada.

Clone	Seqüências	Clone	Seqüências	Clone	Seqüências	Clone	Seqüências
2M8	2	2X8	2	6C30	2	6H3	1
2M18	1	2X24	3	5T25	1	1E10	1
2N19	2	2Z1	0	5T22	1	1F10	1
2N30	1	2Z3	0	5R13	3	3A16	0
2N32	2	2Z14	0	5S31	2	3A23	0
2O12	0	3A2	0	2N15	2	6B9	1
2O19	2	3A8	0	2M3	2	6B30	1
2O29	1	3B11	0	6A10	2	6A18	0
2O35	2	3B21	0	2U32	2	6A35	0
2P3	2	3B28	0	2U14	2	6B14	0
2P30	2	3C7	0	2Z2	1	6B34	1
2R16	2	3C11	0	2Z11	1	6D8	1
2R17	2	3C26	0	1B12	1	6D15	1
2R33	1	3C31	0	2A11	1	6D28	0
2S1	0	3D19	0	6D1	1	6E17	1
2S11	1	3D34	0	1H7	1	2U16	2
2S33	1	3E12	0	1B8	1	2U23	2
2T10	2	3E27	0	3A2	1	2W1	1
2T15	1	3E32	0	8B7	1	2W12	2
2T22	1	3F5	0	5C3	1	2W17	2
2U7	2	3F16	0	6G3	1	2W22	1
2X5	1	2W33	2				

Tabela 5.2 – Clones de *S. franciscanus* utilizados no trabalho: primeira coluna – denominação dos clones utilizados, segunda coluna – quantos seqüenciamentos de colônias diferentes foram realizados.

Clone	Seqüências
1F24	1
1H14	1
1H23	1
1M35	1
1N15	1
1T18	1
1W11	1

Clone	Seqüências
1W12	1
1X27	1
1Y31	1
1Y33	1
2H1	1
2H2	1
2H3	1

Seqüenciamento e análise dos clones de *Prochilodus lineatus* em banco de dados (NCBI).

Após a seqüenciamento, as seqüências foram analisada, os plasmídeos e microssatélites indentificados e iniciadores desenhados para os microssatélites encontrados (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Dados dos iniciadores desenhados para os clones com microsatélite.

Clone	Microsatélite	Iniciador (direto/reverso)	%GC*	Tm**
2N19	TATC(17)			
2N30	GT(72)	GTTTGGAGGAGATGCGTGAC	55,00	60,67
		TTTCGATAATATAAAAATTTACCAGCA	22,22	58,67
2O19 2	CT(20) GA(5)	TCCTCAGTCGCTCTAGAGGA	55,00	57,84
		GATAGCCACCACCACCAAAC	55,00	60,24
2O35 1	GT(29)	CCTCCAGGTCAGGTAGGTCA	60,00	60,10
		TGAGAACAGAATCAAACCAGGA	40,91	59,71
2P3 1	GA(21)	TCGAAGGTTGCCGTAACAAC	50,00	61,06
		AGACTCATAATCTCTCCCGC	50,00	55,98
2P30 1	GCT(5)	TCTTCCAAAGAGCTCCAGA	50,00	60,07
		ACGGTCAGATGAAGCAAAGG	50,00	60,25
	CTTT(4) TTG(6) TTTG(5)	GTTACGTTTTTGAGCAGACG	50,00	59,49
		CATTGGGTAGGATATGTGTGC	47,62	57,83
2R16 1	GA(173)			
2T10 1	TG(13)	GATTGGCATCAGCTCCATCT	50,00	60,19
		ACTCAGCCAAGGCAGACTTT	50,00	59,09
2U7 2	TCCT(5) TC(12)	TGTATTTCTTGGCATGGTGTG	42,86	59,45
		GCGGACTGAACCTCAGACAC	60,00	60,87
	AG(40)	CAAGGTCATTCCGCCACCT	55,56	59,63
		ATTGATCAGGTCGAGATGTTAGC	43,48	59,63
		TGTATTTCTTGGCATGGTGTG	42,86	59,45
		ATGGCTCTGGCTTTGTGAAC	50,00	60,26
2U23 1	AAC(7)			
2W12 1	AC(13)	CTGTCTGGAAGGCAGCAAAT	50,00	60,40
		GGTATCCTCCCACAGTCCAA	55,00	59,78
2W17 1	CAG(9)	CTGCAGGTAAGCAGCCATC	57,89	59,56
		TGGCTGTGACTCTGATACCG	55,00	59,86
2W33 1	CA(28)	ACGAACTGGAGGAGATGAGG	55,00	59,25
		GGGGACTACGCTGCTTCTCT	60,00	60,92
6D8	TGT(6)			
1B12	GATA(27) ATGG(7)			
2A11	GATA(18)			
6D1	GATA(18)			
1H7	CTAT(11) CTGT(6)	CATGTGGCTTGGTCCAATGAG		
		GCTCAGAAATGGTGACGCACA		
1B8	GATA(25) GATT(9)	TTCTCAGTAATTGGGCTCTATC		
		GTGACGTTCAAACCTGCAT		
3A2	CTAT(35)			
6B7	CA(30)	GCACCATAGCACATTTGTAG		
		GCAGTCAAGAGTAAGGATGTC		

* porcentagem de nucleotídeos G e C do iniciador.

** temperatura na qual metade dos potenciais sítio de ligação possivelmente terão iniciadores ligados a ele (HILLIS, 1996).

Os resultados abaixo foram realizados pela análise MegaBLAST para similaridade entre seqüências de nucleotídeos e Blastx para similaridade entre

seqüências de nucleotídeos e proteínas. A Tabela 5.4 simplifica os resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados da NCBI. As tabelas Tabela 5.5, Tabela 5.6, Tabela 5.7 e Tabela 5.8 simplificam a similaridade entre as seqüências obtidas e as proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI. Os clones que não estão apresentados na tabela não obtiveram similaridade com nenhuma seqüência

Tabela 5.4 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados da NCBI

Clone	Descrição	E value	Acesso
2M8 1	Salvelinus leucomaenis leucomaenis (white-spotted charr) Fok(SLL)-1 gene	3,0E-11	D90293.1
	Salmo salar clone BAC CH15L20, complete sequence	5,0E-09	EF427378.1
	Salmo salar clone BAC CH189M18, complete sequence	5,0E-09	EF427377.1
2M18	Oryzias latipes DNA, MHC class I region	1,00E-120	AB183488.1
	Astatotilapia burtoni clone BAC 20D21 platelet-derived growth factor receptor beta b (pdgfrbb) and colony-stimulating factor 1 receptor b (csf1rb) genes, complete cds	1,00E-95	DQ386647.1
2P30 1	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-199K9 in linkage group 17, complete sequence	3,00E-41	BX005347.5
2U16 2	Rana latastei clone Ca27 microsatellite sequence	9,00E-171	AF327357.1
	Xenopus tropicalis clone CH216-83M4, complete sequence	2,00E-137	AC145804.3
	Oryzias latipes DNA, MHC class I region	5,00E-84	AB183488.1
2W1	Scyliorhinus torazame internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	5,00E-139	AY049854.1
	Centroscyrnus owstonii 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	5,00E-139	AY049821.1
	Callorhynchus milii internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	6,00E-138	AY049812.1
6B30	Prochilodus marggravii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	6,00E-98	AY449633.1
	Heteropneustes fossilis 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2	6,00E-88	AJ876377.1
	Clarias platycephalus 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2	2,00E-87	AJ876400.1
5T25	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-98H23, complete sequence	1,00E-19	BX470267.5
	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-39M14, complete sequence	5,00E-14	AL928671.6
	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-30K6, complete sequence	3,00E-11	AL844141.7
1H7	Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-109H9 in linkage group 18	3,00E-07	BX890602.8

1B8	Hyla saxicola microsatellite P116F-1 sequence	1,00E-129	AY707962.1
	Hyla saxicola microsatellite P116F-2 sequence	4,00E-115	AY707963.1

Tabela 5.5 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI

Clone	Descrição	E value	Acesso
2M8 1	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	0.27	gb AAAY79146.1
2M8 2	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.45	gb AAM47839.1
	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.45	gb AAM47831.1
	PREDICTED: hypothetical protein [Danio rerio]	2,0E-19	XP_001340969.1
2M18	PREDICTED: similar to transposase [Danio rerio]	2,0E-54	XP_001336767.1
	transposase [Salmo salar]	2,0E-52	ABV31710.1
	Tc1-like transporase [Oncorhynchus mykiss]	1,0E-36	BAF37936.1
2N19 1	cytochrome oxidase subunit I [Prochilodus lineatus]	0.091	gb AAM47819.1
	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAAY79146.1
	putative DNA-mediated transposase [Helicoverpa zea]	2,0E-06	ABH09251.1
2N19 2	hypothetical protein CNI00730 [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	0.90	XP_572751.1
	hypothetical protein CNBH0710 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	0.90	XP_774025.1
2N32 1	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	0.59	gb AAAY79146.1
	autogenous vein graft remodeling associated protein 2 [Homo sapiens]	0.90	ABC94726.1
2N32 2	putative neurotransmitter receptor protein [Danio rerio]	3,0E-04	CAN88546.1
	putative neurotransmitter receptor [Takifugu rubripes]	0.062	AAC96117.1
	trace amine associated receptor 1 [Saimiri sciureus]	0.081	ABQ41117.1
2O19 3	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.59	gb AAM97388.1
	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAAY79146.1
	hypothetical protein, conserved [Leishmania infantum JPCM5]	0.53	XP_001464730.1
2O29	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAAY79146.1
2O35 3	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.018	gb AAM97388.1
	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	0.27	gb AAAY79146.1
	hypothetical protein LOC_Os11g17040 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	0.081	AAX94952.1
2P3 2	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	0.59	gb AAAY79146.1
	fork head domain protein [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAW50296.1
2P30 3	cell cycle control protein, putative [Plasmodium vivax]	0.048	XP_001613919.1
2P30 4	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	0.30	gb AAAY79146.1
2X24 1	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	0.77	gb AAAY79146.1

2X24 4	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.20	gb AAM47839.1
--------	-----------------------------------------------------	------	---------------

Tabela 5.6 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI

Clone	Descrição	E value	Acesso
2R17 1	PREDICTED: similar to polyprotein [Monodelphis domestica]	2,0E-11	XP_001371969.1
	reverse transcriptase	2,0E-09	AAA79247.1
	pol protein	2,0E-09	AAA39757.1
2SS3	minus transposase [Drosophila hydei]	4,0E-05	CAP09075.1
	vacuolar protein sorting 52 [Salmo salar]	0.001	ABQ59678.1
	predicted protein [Ajellomyces capsulatus NAm1]	0.005	XP_001541067.1
2T10 2	cytochrome b [Prochilodus lineatus]	1.0	gb ABO32645.1
	Hypothetical protein CBG08669 [Caenorhabditis briggsae]	0.016	XP_001673358.1
	PREDICTED: hypothetical protein [Rattus norvegicus]	0.035	XP_001079474.1
2T15 1	PREDICTED: similar to dachsous 1 [Danio rerio]	4,0E-50	XP_682805.2
	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	8,0E-44	CAG00444.1
	PREDICTED: similar to dachsous 1 [Gallus gallus]	7,0E-33	XP_417264.2
2U7 1	NADH dehydrogenase subunit 4 [Prochilodus lineatus]	0.45	gb AAM47807.1
	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AA79146.1
	NADH dehydrogenase subunit 4L [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAM47843.1
2U7 4	fork head domain protein [Prochilodus lineatus]	0.45	gb AAW50296.1
	NADH dehydrogenase subunit 4 [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAM47807.1
2U16 3	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.16	gb AAM97388.1
	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	0.59	gb AA79146.1
	PREDICTED: similar to transposase [Danio rerio]	4,0E-08	XP_001336836.1
2U23 1	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AA79146.1
2U23 2	cytochrome oxidase subunit I [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAM47819.1
	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	0.10	CAF99968.1
	PREDICTED: similar to Protein arginine methyltransferase 3 [Gallus gallus]	0.50	XP_420907.2
2W12 3	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	0.27	gb AA79146.1
	NADH dehydrogenase subunit 4 [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAM47807.1
2W1 3	rRNA promoter binding protein [Rattus norvegicus]	4,0E-51	NP_671477.1
	PREDICTED: similar to LRRG00134, partial [Ornithorhynchus anatinus]	3,0E-36	XP_001518513.1
	PREDICTED: hypothetical protein, partial [Monodelphis domestica]	7,0E-25	XP_001371696.1
2W17 3	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.16	gb AAM97388.1
2W33 2	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAM47839.1
2X5	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.20	gb AAM47839.1

	lineatus]		
2X8 1	reverse transcriptase [Anguilla japonica]	0.001	BAD72127.1

Tabela 5.7 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI

Clone	Descrição	E value	Acesso
6D8	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.20	gb AAM47839.1
6D15	cytochrome oxidase subunit I [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAM47819.1
6 E 17	COG2334: Putative homoserine kinase type II (protein kinase fold) [Burkholderia dolosa AUO158]	0.67	ZP_00983471.1
	aminoglycoside phosphotransferase [Burkholderia vietnamiensis G4]	0.67	YP_001116548.1
6B30 1	fork head domain protein [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AAW50296.1
	hypothetical protein LOC100037352 [Danio rerio]	2,0E-28	NP_001082975.1
	PREDICTED: similar to Ac1147 [Gallus gallus]	2,0E-26	XP_001231536.1
6C30 8	MbtE [Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K-10]	0.88	NP_961107.1
5T25 1	hypothetical protein LOC570286 [Danio rerio]	0.002	NP_001082893.1
	BTB (POZ) domain containing 8, isoform CRA_c [Homo sapiens]	0.002	EAW73104.1
	camphor resistance protein CrcB [Nocardia farcinica IFM 10152]	0.40	YP_120670.1
5T25 6	novel protein [Danio rerio]	8,0E-05	CAK10721.1
	BTB (POZ) domain containing 8, isoform CRA_c [Homo sapiens]	0.002	EAW73104.1
	camphor resistance protein CrcB [Nocardia farcinica IFM 10152]	0.40	YP_120670.1
5R13 8	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.16	gb AAM97388.1
	hypothetical protein LOC571141 [Danio rerio]	6,0E-34	NP_001093511.1
	PREDICTED: similar to bloodthirsty, partial [Danio rerio]	3,0E-32	XP_698325.2
5R13 10	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.16	gb AAM97388.1
	hypothetical protein LOC571141 [Danio rerio]	2,0E-34	NP_001093511.1
	novel protein similar to bloodthirsty (bty) [Danio rerio]	9,0E-33	CAN88303.1
5S31 4	cytochrome b [Prochilodus lineatus]	0.59	gb ABO32645.1
5S31 6	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.77	gb AAM47839.1
	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.77	gb AAM47831.1
2M3 2	cytochrome oxidase subunit I [Prochilodus lineatus]	0.27	gb AAM47819.1
2M3 7	cytochrome oxidase subunit I [Prochilodus lineatus]	0.27	gb AAM47819.1
2M3 9	cytochrome oxidase subunit I [Prochilodus lineatus]	0.27	gb AAM47819.1
2U32 1	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	1.0	gb AA79146.1
1B12	NADH dehydrogenase subunit 2 [Prochilodus lineatus]	0.45	gb AAM97388.1
6D1	hypothetical protein EUBVEN_00811 [Eubacterium ventriosum ATCC 27560]	0.88	ZP_02025558.1
1H7	hypothetical protein PC401526.00.0 [Plasmodium chabaudi chabaudi]	0.001	XP_738775.1
	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	0.003	CAG13317.1

	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	0.016	CAG02631.1
1B8	hypothetical protein THERM_00045000 [Tetrahymena thermophila SB210]	0.23	XP_001014594.1

Tabela 5.8 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI

Clone	Descrição	E value	Acesso
3A2	recombination activating gene 2 [Prochilodus lineatus]	0.77	gb AAAY79146.1
	Protein kinase domain containing protein [Tetrahymena thermophila SB210]	0.52	XP_001022626.1
	hypothetical protein PFL2170c [Plasmodium falciparum 3D7]	0.67	XP_001350838.1
5C3	PREDICTED: similar to SET domain containing 2 [Danio rerio]	1,0E-14	XP_001334112.1
	PREDICTED: similar to gag-pol polyprotein, partial [Strongylocentrotus purpuratus]	2,0E-08	XP_795333.2
	reverse transcriptase - silkworm transposon Pao >gb AAA75005.1 reverse transcriptase	6,0E-08	S33901
6H3	reverse transcriptase [Anguilla japonica]	2,0E-12	BAD72127.1
	hypothetical protein LOC568735 [Danio rerio] >dbj BAE46430.1 reverse transcriptase [Danio rerio]	1,0E-06	NP_001032317.1

87% das seqüências obtidas, não possuíam similaridade com nenhum outro organismo, sendo que apenas 1% apresentou similaridade com *P. lineatus* (Figura 5.3).

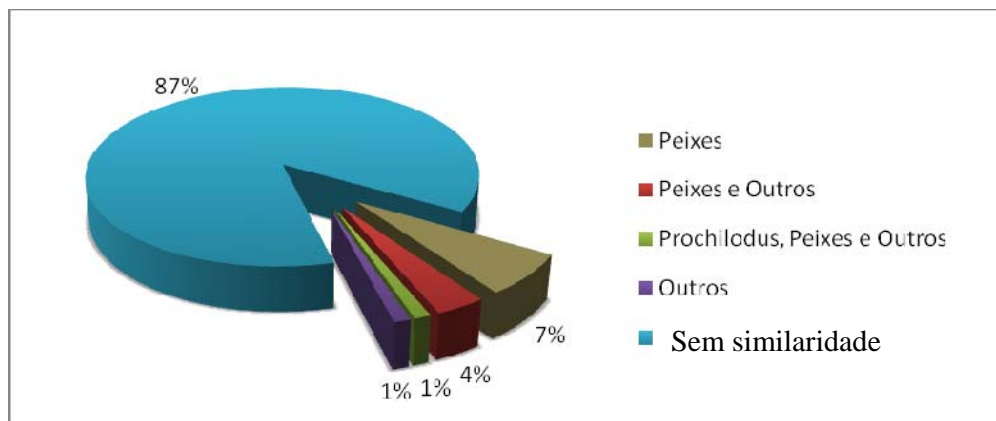


Figura 5.3 – Homologia entre as seqüências de *P. lineatus* do nosso grupo e as existentes no banco de dados NCBI

Abaixo seguem apenas as seqüências que possuem microssatélites, as seqüências sem microssatélites obtidas no projeto estão disponíveis no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (ICB/UFMG). As regiões correspondente ao plasmídeo pUC18 e, portanto, sem importância para a análise, foram indicadas

2U23 1

tcgatctagaggtcTATCGAACCAATCAAGAATGGGCCCTCCCTTTTCACCTGATTTGTGAGCTGAGCAATTCGT
ATCTGGATGTGGGCGGTTCTTAGTCCAGAGACTGGCGAACAAACATGTAAAAACAACATGGCGGAACATGTTCTTT
CTTCAGCAGAACCCTGATGGGTCATTTTGTGCTGCTTTCAATGTTTTACGGATTGGCCTGATTTTTTTTTTAGG
TGAATTTTCGAGGTGAGGCCAGTGCCAATGCCAGTGCCATACCTCTTTGCCACTTGTATCACGGGTTCAAGGGTT
CCAGACCAGCACAGATACTGGCCAGCAAACCAGTGGTTTTTTTTTTTTGCAATGTGATTTTTGCACCGGCACCC
GACCCCATGATGGTGAAAAAGACTACAGTATTTCTTAATCAGTCATAAACATCATGTCTCACCCCTCTCCCC
ATGAAAAACTCATTCAATCCAAAAGTGCTGAAGTCTGGCTGGCAAGCCTTTCTTATTTAATATTAGCTCATTAG
TGTCACTCGATTACCCCGCCACCGAAATAGCTGACATGTGAGGCTCGAAATGCTTGCCAGACAGTGCAGATATAG
GTGTACACTGTTACTGTTATGCTAGTCTACCAATACGATTGACCCACCTACCAATAACAAGCTAAAATATCAGCT
GGCTAGCCAGTTAGCTGTAGATTGCTGTTGGTAACCCAGCTGACGTGAGCGGATCCTAGCTAAAGTACAGCTGT
CAAGAACAAACAGCAACAACAACGTGCTTGTCTCATGACTAAGCCCTGTCACTGAACCTCCTTTCTGAGCTCC
ATGGCGTGCACACATACTGATGTTTCAAGTGTGTTAGAGACTGCAGGCTGATGATGCTGTGAGAATGCTTCTGAT
ACAGTTGTGATAAAGGTGAGGTTTCAAGGGAGACTAAATGGACCCTTCAAGTGAACGTCCGCCAAGCGGTTCTT
CGACAGTCTTTAAGAACAGAGAGAGAAGGAAGGAGAAATCCGGGTAAC

2W12 1

GTCATTACTIONTCTCAGTGGTAGACGTCTGTTTACATTTTACATTCATTCATGAGCCCAAAAAGTCATGGTATT
CTTTTAAACAGGGCTGGCTGTGAACCTGCTGTTGTTAAGTTAGAAATACAGTAACTAAATTCCTAATATATAAAT
GATATTTAGGCCAAAACCTAATGTAATGTTGATATAAAGTTTTGCACAGCCTATAATAGCTAACACGTAATGGAAG
CTCATAACTTAGCATGTAGCACTGGGCAAACCTGCATGCACACTGGCCAGGGGTGCCATTGGTTTGCCAGATGTAG
TCCACTTCCGATGCTATGTGGCAGGAATTAACCAGGGGTGAGGTTACGGGACCTGAATCGTGTGCCAGGT
ATCTGATTTGAATACACAACAATCCACACGAATGGAGCTTCATACTATCTACAGATAGGAATCAATTTTTAAACC
ACTCCACTTTTTAGCCATCCATATACAGTATGGCATCGCCTCCGTCTCTCCAGAACCAGAGCTAGCCCCGGTGG
TGTATTTATGTTTTGGCTATTGGGCTATAATAAAAATGCTCCCAAATGACTTGTAAATCAGACCTTTTTTACATTC
ATTTATTCTTTTTATAAGCCGCTGGAGGGCACTGTCTGGAAGGCAGCAAAATGCCATGGGCATGCTACCATTACAT
GGCAGACACACAGACATATACACACACACACACACACACACACTATGGGAAATTAAGCATCACCAGTCTGCC
TGGCTTTGGACTGTGGGAGGATAACGGAGAACCTGGAGGAAACCCATGCAGACTTGAAGAGAAATATCCACACAG
GATGTCCCCGGTACCGAGCCCGAAAG

2W17 1

tcgactctagaggateTTCTGTCTCTTGCAGAGCGCCCCCTGCAGGTAAGCAGCCATCCTGCAGTCTTTATCCAC
ACTGAGTAACTCCTCGTTCTCATCAGCAGCAGCAGCAGCATCAGTCACTCGGTATCAGAGTACAGCCAAACTG
TAACGCCTCCAACCTCAGACTCCTCCTTCTGCAGCTGAAGCTCTGCCTCCTCTAAAGCCTGGACAGGGAGAACTG
CTGTTAGGCGTGTGAAATAAAGAGTCCCCGGTACCGAGCTCCAATC

2W33 1

caagcttgcatgcctgcaggtggactctagaggatcATCGTATGGGGTGAGGTATTTACTGGGGCACAGTGATAA
AGGACAAGAAAACAAAATCATGGCTGGAGGAGGAAGAGTCAACAATGAGCATCGCCGTGACCTTCTGAAGACTGGAG
TGACTAATGACGAACCTGGAGGAGATGAGGGGTGCAGTTTATTTATTTATTAACCCACACACACACACACACAC
ATACACACATACACACACACACACACACACACAGGCACTTCTGATACGCAAGCTGTATCTACCTCATTGCT
CTATCCATTCTCCACTATGCAGCTAGAGAAGCAGCGTAGTCCCCGGTACCGAGCTCGAAC

6D8

gcaggtcgatctagaggtcCAATATTAACACCTGATGTTGTTGTTGTTGCCAAAACCAAGTGAGTGTGTTGTTTT
AGGAAGTGGTGTGACCCGTTTCAGCAGCAATGGCTTCAACCAAACAGTTTCTGTAGATGTGGAACAGCCCGGCAC
ACTGACCTGGAGGAATCTTAGCTGGTCTCTTAAACATCAACCCGGCACACTGACCTGGAGGAATCTCGGCCCTG
GGCTCCTTACCATCAGCCCGGCACACTGACCTGGAGGAATCTCAGCCCGGTTCTCCTTACCATCAGCCCGGCAC
ACTGACCTGGAGGAATCTCGGCCTGGGCCTCCTTACCATCAGCCCGGCACACTGACCTGGAGGAATCTCAGCCTG
GCACACTGACCTGGAGGATCTCAGCCCGGCACACTGACCTGGAGGAATCTCGGCCTGGGCCTCCTTACCATCAG
CCCGGCACACTGACCTGGAGGAATCTCAGCCTGGCACACTGACCTGGAGGatccccgggt

1B12

ctagCTCTGACTTCTTACACACAATTGTAGGTTCTCAAGGCTTCTTACCACACCACGTACACACACAGGTTTGTT
TTTTACAATAACGGGACGTGTGCTCATAACATGTCTGCTAAAAGCACTTTGTTATGCTGAATGACCAGTTTGTTTA
TTTTTGTACATACCAGACCAACAACTTGCCAGTAGGCTGGTATACCATCCTTGTTAGATAGATAGATAGATAAAT
GGATGGATGGATGGATGGATGGATGGATAGATGGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA
TAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATACTTTATTgatc

2A11

TTAGAGATGAAAAGGGTACAGTAATGAAAGTAAGGTTTTCATGCTGCACCTCCTTCAGCAGGCGGAGCAGCATCA
GCAGGAGGAGCAGCATCAGCAGGAGGAGGCGCATTTCACCAGACTTCTTCTTCAGAGCCCCTATAAAATAAATA
TTATCATAAAGTACATGAAGAAACATAGCCATTATTAATAAATAATTAGCAAAATAACACAAAAGTTTTTAAAGT
TAAAAATAAATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAT
AGATAGATACTTTATTgatc

6D1

gataCTACTTGTGAGTCGGCACCAAGCGTTGAAACACTTCTAAATCACCAGAATTTGGATTAATAAATCTGATAAA
GACTGGTTTCTGTCAACACCACTGTGAATAAATCTGACTACTTCTAGTTTTCTCTAGAGCGCCACATTTTCACACCA
GAGCACTCTGAATGACCAGTTTAAACATCTTAACTGAAATCCTCCAGAAAGACTGAAGAATAGTTGGAATCCACT
TCAGATATTTGTCTATTGCCACTGTCTTATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA
GANAAGATAGATAGATAGACAGACAGATACTTTATTgatc

1H7

ctagAGGACTGGAGGCATGTGGCTTGGTCCAATGAGTCATGGTACCAGTTGTTCTGGGCCGATGGTCTATCTATCT
ATCTATCTATCTGTCTGTCTGTTTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTAT
GATGATATAGTAAATATTTTCTGAAATAAATTTCTTTTTCTTTCTGGACAGTTTTTCTGATGCTAATCTATA
ATCTGAGGTCATCATGCATTTTAAATAAATCTTTTGTGCTTTACATCGACACTGGCTCAGAAATGGTGACGC
ACAAGTGTGTGTTTGTGCTTGTAACTCACGTGGGAAGTTGTACATGAAGCATGCCTGAGCAGCTATgatc

1B8

NCTTTATTAATTACATTGTTATTTATTTATTTTTCAGACTTTTATTTTCTCAGTAATTTGGGCTCTATCATTTTATT
ACATTTTATTACTATTGTTATTGTTATTCTTTTAAAGTTATCAGCTAATTTAACTTAGAAGTTATTAATAAATTTAC
ATGATGATGATGATGATGATTATGTTATTGACTCCCACAATACAGCCTACACAGTAAACAAGGGTGTCCCTGAGTG
TACCCTGCATGTCTCTGAGTCTAAATAAGTTGACTGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA
AANAATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATTGATTGATTGAT
TGATTGATTGATTGATTGATTGAAGTGACGTTCAAATGCATGCATGGTC

3A2

ctagAGGACTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT
CTTCCAACCAAGTGTGGACATTTCTGGCCAGGCAACATGTCGATTGTTTTGCTGGAGGGTCCCATCTGCCCCAG
AGAAGACAATCAGCATGTATGAGTGTACATGACCTGCAGGGATGGATTCCCTACCTAAATCGATTGAGAGTGTCTT
CCACATGGATAAGTGGTATCAGAGACTGCTACGAGTTCGTGGTTTTCCCTTCATGAGCTATGCGCTGCCGACTGTC
GAAAGTAGGAAGTgatc

6B7

AGTTGTGTANCATGTGATGCACCATAGCACATTTGTAGTAGAAGGCCACACACACACACACACACACACACAC
ACACACACACACACACACACACACACACACACACTTCTACACTGCAGTCAAGAGTAAGGATGTCTCTACAGTGAGA

CACTGTTTTTTTTTNAACAGCGGAACAGTANTNAAATATTCCGCCAAGAAGGACAAAAATAAAATGCNATGNTA
CATTAGAATTNGAACANAGAATATTGTAGGATAAANTATGCAAGctagcata

24% das seqüências obtidas possuíam microsatélites (Figura 5.4), sendo apenas 17% de microsatélites com motivos trinucleotídeos e 41% e 42% de motivos tetra e dinucleotídeos respectivamente (Figura 5.5).

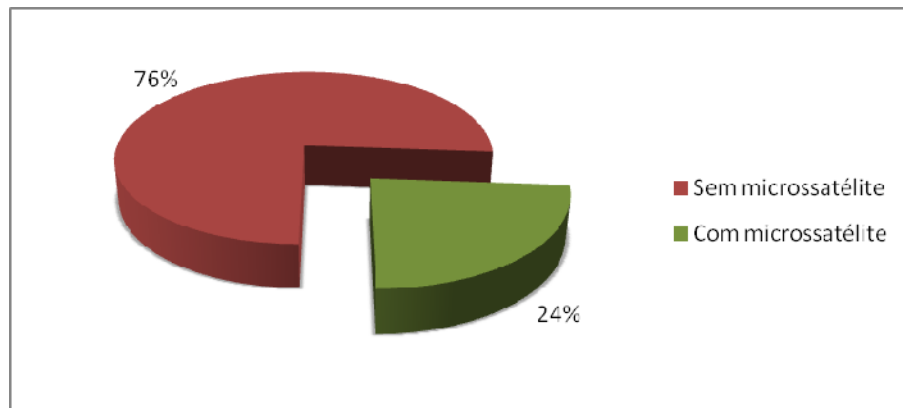


Figura 5.4 – Gráfico de proporção entre as seqüências de *P. lineatus* que possuem microsatélites e as que não possuem.

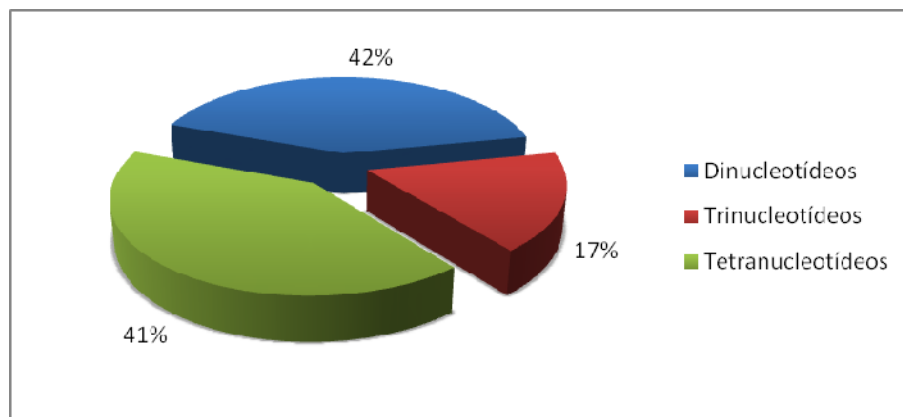


Figura 5.5 – Gráfico de proporção entre os motivos dos microsatélites de *P. lineatus*.

Seqüenciamento e análise de *Salminus brasiliensis* em banco de dados (NCBI).

Após o seqüenciamento, as seqüências foram analisadas, foram identificados os plasmídeos e microsatélites e então foram desenhados os iniciadores (Tabela 5.9) para os microsatélites encontrados.

Tabela 5.9– Dados dos iniciadores desenhados para os clones com microssatélite.

Clone	Microssatélite	Iniciador (direto/reverso)	Tamanho do fragmento
1F24	GAG (5) CCT (9)	GTTGGAAGAAACCAGCTC	236 pb
		GCTGCTCATCCCTGCCA	
1H23	ATTT (8)	CTGAACTGTACGCTAC	180 pb
		GGGCCTAACATAACAGC	
1N15	CA (5)	CTATTGTTTATTGTG	147 pb
		GTTCACTCCAACCC	
1T18	TTC (25)	GAGTTGTAGGAAAGTG	669 pb
		CCACAAAAACAGATTTC	
1X27	CT (5) ATT (5)	ACGATGTCCAACCCTGG	190 pb
		GAACTACCATCTCTCTTTC	
1Y33	TAA (4) GA (5)	GAACTACCATCTCTCTTTC	216 pb
		CCACGACCAGTGATCG	

Os resultados abaixo foram realizados pela análise MegaBLAST para similaridade entre seqüências de nucleotídeos e Blastx para similaridade entre seqüências de nucleotídeos e proteínas. A Tabela 5.10 simplifica os resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados da NCBI. A Tabela 5.11 simplifica a similaridade entre as seqüências obtidas e as proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI. Os clones que não estão apresentados na tabela não obtiveram similaridade com nenhuma seqüência

Tabela 5.10 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados da NCBI

Clone	Descrição	E value	Acesso
2H2	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-69C19 in linkage group 4, complete sequence	5,00E-10	BX088538.26

Tabela 5.11 – Tabela simplificada dos resultados encontrados para similaridade entre as seqüências dos clones e as seqüências de proteínas disponíveis no banco de dados da NCBI

Clone	Descrição	E value	Acesso
1T18	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	4,0E-72	CAG02965.1

hypothetical protein LOC553299 [Danio rerio]		
>gb AAI35008.1 LOC553299 protein [Danio rerio]	2,0E-70	NP_001077285.1
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	3,0E-57	CAF89235.1

Pelas análise foi observado que 93% das seqüências não possuíam similaridade com nenhum outro organismo sendo que apenas 7% apresentaram similaridade com outros peixes. Não foi encontrado similaridade com *S. brasiliensis* ou qualquer outra espécie do gênero *Salminus* (Figura 5.6).

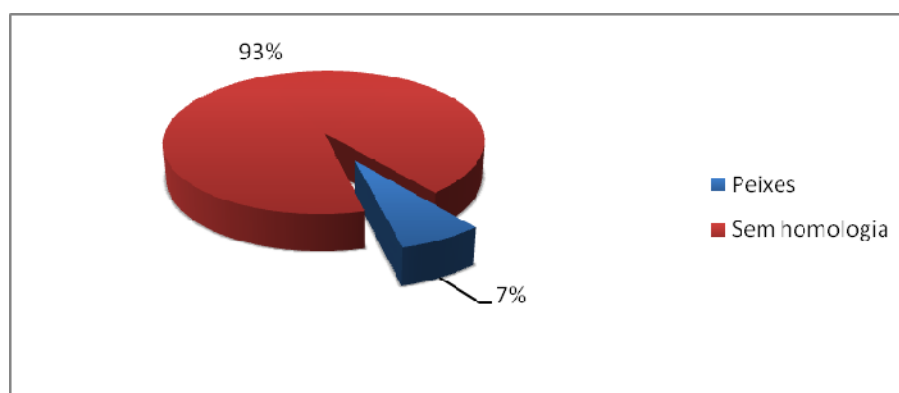


Figura 5.6 – Homologia entre as seqüências de *S. brasiliensis* do nosso grupo e as existentes no banco de dados NCBI.

Abaixo seguem apenas as seqüências que possuem microssatélites, as seqüências sem microssatélites obtidas no projeto estão disponíveis no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (ICB/UFMG). As regiões correspondente ao plasmídeo pUC18 e, portanto, sem importância para a análise, foram indicadas com letra minúscula e em cor cinza claro. As seqüências correspondentes ao DNA do nosso objeto de estudo estão escritas com letras maiúsculas e em preto. As regiões de microssatélites foram marcadas em negrito e com sombreamento. Para aqueles microssatélites selecionados para análise na população, as regiões dos iniciadores foram sublinhadas e destacadas com sombreamento.

1F24

ccgtccgggctcgatctagaggtcTCAAATTAATGTAAAGCCCTGGTTGTTAACTGCGGACCTGGAAGCCTGGCTC
AGTTTAATAAATTAGCTGACAATGTTTTGTATACTTTATTGCATCATACTAGACTAGAGTACTAAAATTTAAACATA
CCCTGATTGGTAGAAAGCCTTTACGTTATGTGTAGGTTCTTTAAACCTATAAAACTTTCTTAACACTCACAGCTT
AAATATTGTATTTCAAGGAGCTAAAAGTGGCGGCATCACTCAAGGAACCCGTGTGAGTCTTTCTTCTAAGAGCC
CAAGTCACAGGAAATGTGATAGAAAGAACTGGATAAAACACACCCTCTCAAGATGAGACAATCAGGGCAATCAGG
AAGTGGTGTCTCTCACTGGTGGGTGGTCTTAAAGTGAAGAAAAACCCTATGCTGTACCCAAAACCAGAGCGTGG
ACCAATCAGGCTTCAACAGATGTCTTCAGCGTCATCAGCCACTCCATCAGTCAGATGTAGTTTCTTCTTATCACTC
TCAAATGTAAGTAATCTTTTATATCTGTTTCATTTTTCTCTTGTAACTTTCACTTTATCTTGTAGCACAAAATCAG
GTAGAAACATCATTACTGTTTGTATCAGTAGGTCAGATCAGCTCATATGTTTTCTTCTCAGGTCCAGTGATGAA
GAGGAGGGCGAGGAGTTGGAGAAAACCAGCTCGGAAAGCCATGAGGAGGAGGAGGAGCAGCACACGTCAGAGGAC
GTATCTGATGTTGGCTGCAGCGCTTTCTGCTTTGCTCTTAAAAGCAGAGCACAGAGAGCGTCTGCATCAATTAGA
GGCTGCATTAGGAAGTTATTTCAAACCTCCATCTCACCAGCCTCTTTCTCCTCCTCCTCTTCTTCTGAGGAGGCT
CCAGAAGTGGCAGGGATGAGCAGCCACAAGGGAGACCCCGCTCTGCTCCAGATTTCTCCAGATGGAGAGTCAACC
TTGAGGGTATGTGATGTAACATTTAGTTTGAATAGATTGACTTTTCAAGGTTATTTGGGGGTGGATACGTTT
TTCTTAGGGCTGTAATGTAGATCTGATTTACTTTAAAATGCACCCATTTTTTTGTTCAAGCGTGGTTAGCTCAC

1H23

ctctagaggatcTCAGGATTCAGGAGCGCTTTCATAAATTCCTTAATGTATACATCATGTAGGATAAAATCACC
ATGTGACAACACTGGTAGCGCTATATTGGTACAAGTTTTTTGTTCTAATACTTATACTTAATTGAAATTTATTTA
ACCAAGTAATTGGGAAGAAAAAGATGTGATAAAACATTTAGATACTCTGACAGTGTGTCCCTGTTTCAAGTATTTAA
TACTGACTGAATACTGAACCTGTACGCTACTAATATTGTTTAAACAAAACATATGTGAGGTCAATTACTTCCATCTA
ATCATGACCAGCCACACATTTTCATTGCAGTATTTAGCGAATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAAGA
GTCTTTAATGTATGTTAATGCTAACTGCTGTTATGTTAGGCCCAAGCTAAAAATGTATTCAAATGAATTTACTGG
GTTTGATATTTTTTGGAGCAGTTTTATCAGATTTTAAATGAACTGGTTTCAACTAATCTGAACCTAGTTTTTATAAT
ATTCGAGACCAGTCTGTCCCGGGACCAGCTCGAT

1N15

ATTACCCAGGGGGAGCGCTGCGGTGCTCTAGAGGACTACACCGTAACTTAAATCCACGATGGGACTGAAGCTCG
AGTGATTAAGTCGAAAGACAACTGAAACCCATTTCTGGTGAAATTATTAACCATTTCTATTGTTTATTGTTGTA
AATCACACACACTCAATAATTTCTTGTGTTTTCAGTTTAAACATAATTTCAACATTTCTTGTAAAGTTTAAATC
GTTTCAATAGTTTCGTTCAATCAATCATTCTACTGTTGGCTGGGTTGGAGTGAAC TAGTCGGCTAGCAAGGTGCA
CATGATGGCAGACAATGCTAATATTGTGACCTGAAAAGAGGCAGAAATTTATGTATAAAATAAATTTACAAACTTT
ATGATGTAAGCAGACAATGAGCTTCCCCTCTTTAAAAAGGTGAGCAGCCGCCACTGTAACGTATACTATATTAGA
GCTGAACAGTCTGGAGGTAATCTAATATGCTAGACTATTTTTTTTTATGCCTGACAGCCAGTAAGCTGTGGTTG
TTCCACAACACATGGGGTTTGTGCTCTGTATATACAGGCAGTTTACAAGCTGTGTTATAGGGTCAAATGTC
CCCCTTTAAACTTTTGGACAACATTGCTGACCTACATACTGGAAATACCAGAACATACTTAGTACTTCTACATT
ACTCCTTTTCAATTTTTAATACCAACATTACAAAGTACTGACTTTATTACCATCAGCCTCTACTTTACCTgatcc
ccgggtaccgagctcgaatt

1T18

tatcctgcagtcgatctagaggtcATGTGGACGAGGCTGGCGATGTTAGTGGCTGAAAAGCCTGACTGTAGAGC
AGGTTTTTGGAGAAGAGCTTTGAGTTGTAGGAAAGTGA CTGAGTCTTTCCTCAGACGTGGAGACAAAATCTTTGAGA
GTTCTGTTTCAGGCTGATTTTCACAATGTTGGACACCATCTGAAAGAAGTGAACCATCTTCTCCCCTGCTCCTCC
ACTCTCCCCATGGCATCCATTCCTTTCATTAGCATTTGTATGGTGGTGTAAAGTCTATTTCTTTTCAGTTTACAG
TTTCTCATGTCAATCAGAATGTCAGTCAGTTCTTTTIGATTTTTCTTCATGTTCTCCGCACTTTTCTCATAGATC
TCTTTAGTGCCTCTTTCATTTGAGCTCGGCTCTGTTCTATGCGGAACCTGGCATTCTCTGATGCTATTTTCTGAAGCA
CTTTTCTTTCACACATTTACTTTCTCTCCTTAAACAACATGGGTGGCTTTGGGGTCAAGAGGAGTTTTTTGTAACA
TCTTTGCTTTTGCAGTCAAAGGTACGAGCTGATTTCAAGCAGT TTTCTGATTTTCTCAATTAACCTCGTTTGT TTTCT

TCTTCCTCACATTTCCCCATCTGGTGCATATGTTGCCAG**TTCT**TCACAGATGCTAATCGCCTTTTGACATAACTGC
TGAGCAGTTTTTTTTGGTTTGCATTCTGGGATTTTT**TTCT**TAAGCTGCTGTTGAT**TTCT**TTTGGAAATTGTTTTTCAAG
AAATCTGTTTTTGTGGATTTCTTCTTCTgatccccgggtaccgagctcgattcgtaatcatgtcatagctgttcc

1X27

gcgccgcggaattcgcccttTGACTCATTCCAACCTGGCTTACAAGAATGTCCCTAATAGAAGCAGTCGTCTGTTT
CTTGAGTCATGGGAGACTCATAAGATTAAGGACAGGGCAACAAACCGTTCTAACCACTTACCAAACCTGTACCAC
CATCTCACACGAGCAACACTTACAAAAACACTAAGACAGCAACAAGGGGTTTCCACAACCCCTGGAAATTTCCAA
CAACACCGGGTTTTACAACACAGGGTTTTCCCAACAACATCGAGTTTTTCACTTAAACCA
CTAGTATAAATACGGGCACCTTACACTTTCTCTTTTCACTGCGGTGACAAAGACCATAGGTGATGGTTCGAAACGTC
GCGCTCCTTGGTTGATACTGCACCCGCTTTATCATCAACTCATCGTTTACCACGACCAGTGCATCGAACCATTTG
TACGATGTCCAACCCCTGGTCACTCTCTCTTCTCAGACCTTCAAAGGATAGCTGTTGTTCAAATGTTCAAATTTTA
TTGCTCGCCAATTGGCAATATTGTTCTTGTATCACTACCTTTGTAAATGGGCTAAGCAGCCTTAAACACAAATAA
AG**ATTATTATTATTACT**GAAAC**GAAAGAGAGATGGTAGTTCT**TGTAAAACAGAAAAGTGAACACATCTTGCATT
TTGGAAAATATTTATTTAAAAAGTGATAAAACAATAATGAATCTCGCTTTTTGAAAGAAAGCGCTGCAATGCCACC
TTTAAGTACGTCACTGATTCT

1Y33

GTGGCTAGATTACCCCTACTAAAGGGACTAGTCCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTTTGTATATAAGTAA
GAACAGGTATCGTTTTTAAACGAGAATCAGTGACGTACTTAAAGGTGGCATTGCAGCGCTTTCTTTCAAAAAGCGA
GATTCATTATTGTTTATCACTTTTTAAATAAATATTTCCAAAATGGCAAGATGTTTTCACTTTTCTGGTTTTAC
AGAACTACCATCTCTCTTTCGTTTT**CAGTAATAATAATAAT**CTTTATTTGTGTTAAGGCTGCTTAGCCCATTTACA
AAGGTAGTGATAACAAGAACAATATTGCCAATTGGCGAGCAATAAAATTTGAACATTTGAACAACAGCTATCCTT
TGAAGTCTGAGA**AGAGAGAG**TGACCAGGGTTGGACATCGTACAAATGGTT**CGATCACTGGTTCGTGGT**TAAACGAT
GAGTTGGATGATAAAGCGGGTGCAGTATCAACCAAGGAGCGCGACGTTTTCGACCATCACCTATGGTCTTTGTAC
GCGACTGAAAGAGAAAGTGTAAAGTGCCCGTATTTATACTAGTGGTTAAGTGAAAACTCGATGTTGTTGGGAAT
TCCCTGGTTGTGGGAAACCCCTGTGTTGTAAACCCGGTGTGTTGGGAATTTCCAGGGTGTGGGAAACCCCTTG
TTGCTGTCTTAGTGTTTTTGTAAAGTGTGCTCGTGTGAGATGGTGGTACGAGTTTGGTAAGTGGTTAGAACGGTT
TGTGGCCCTGTCCTTAATCTTATGAGTCTCCCATGACTCAAGAAACAGACGACTGCTTCTATTAGGGACATCTT
GTAAGCCAGTTGGAATGAGTCAAAGGGCGAATTCGCGCCGCTAAATTCATTGCCCTATAGTGAGTTCGTATTAC
AATTCACTGGCCGTCGTATACAACGTCTGACTGGGAAACCCCTGGCGGTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACAT
CCCCTTTCGAGCTGGCGAATAGCAAAGGCCGACCGATCGCCTTTCCAACAGTGCTCACCTAACGTATGCAGTT
AAGTTAACCTATAATGAAAGCGTATCGTCTGTTTGTATGTCAAATGATTATGACCTGGTCACGATGGAATCCTTGA
CCAGTACACGCATATAAGCTACTGCTGACTACCAGAT

43% das seqüências obtidas possuíam microssatélites (Figura 5.7), sendo apenas 11% de microssatélites com motivos tetranucleotídeos e 56% e 33% de motivos tri e dinucleotídeos respectivamente (Figura 5.8).

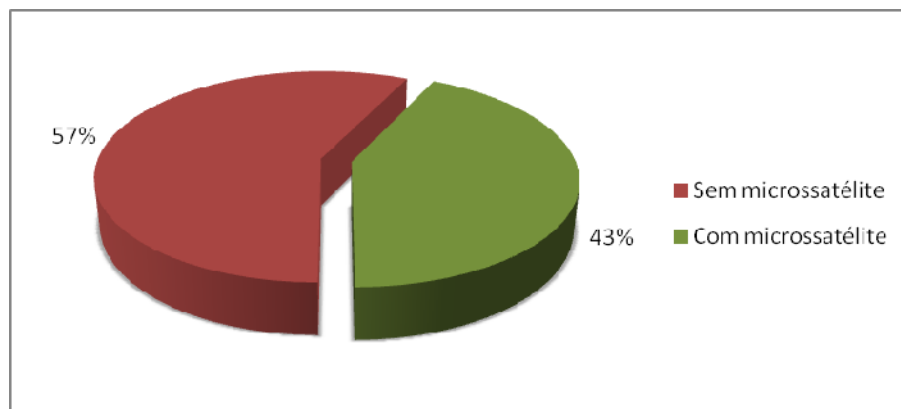


Figura 5.7 – Gráfico de proporção entre as seqüências de *S. brasiliensis* que possuem microsatélites e as que não possuem.

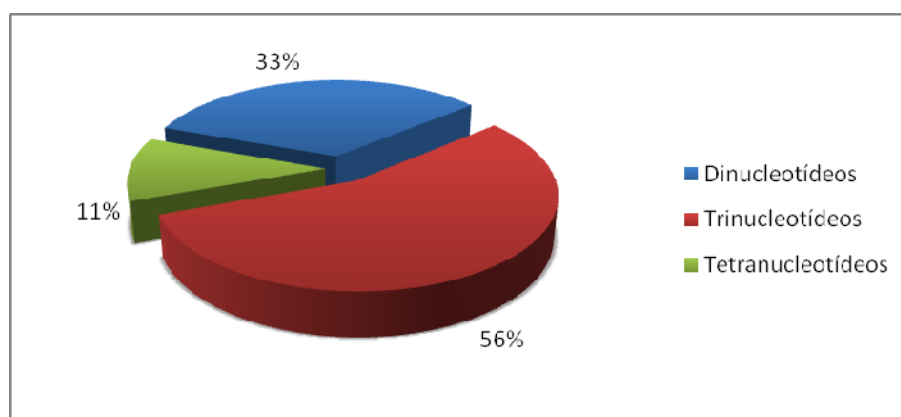


Figura 5.8 – Gráfico de proporção entre os motivos dos microsatélites de *S. brasiliensis*.

Padronização de PCR

A PCR foi padronizada (Tabela 5.12) alterando-se a temperatura de anelamento, quantidade dos iniciadores, o número de ciclos de desnaturamento, anelamento e alongamento, o tampão utilizado e a quantidade de DNA molde.

Tabela 5.12 – PCRs padronizadas para iniciadores escolhidos

Clone	Iniciador	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento	Número de repetições	Tampão
2035 1	Proli 1	244 pb	60° C 58° C	5 25	IC (Phoneutria)
2N30	Proli 2	367 pb	60° C 58° C	5 25	IC (Phoneutria)
2U7 4	Proli 3	150 pb	58° C 56° C	5 25	IC (Phoneutria)
2W33 2	Proli 4	186 pb	60° C 58° C	5 25	IB (Phoneutria)
2U7 4	Proli 5	699 pb	56° C	25	

As análises das padronizações de PCR foram realizadas em gel de poliacrilamida 6% e coradas com prata (Figura 5.9 e Figura 5.10).

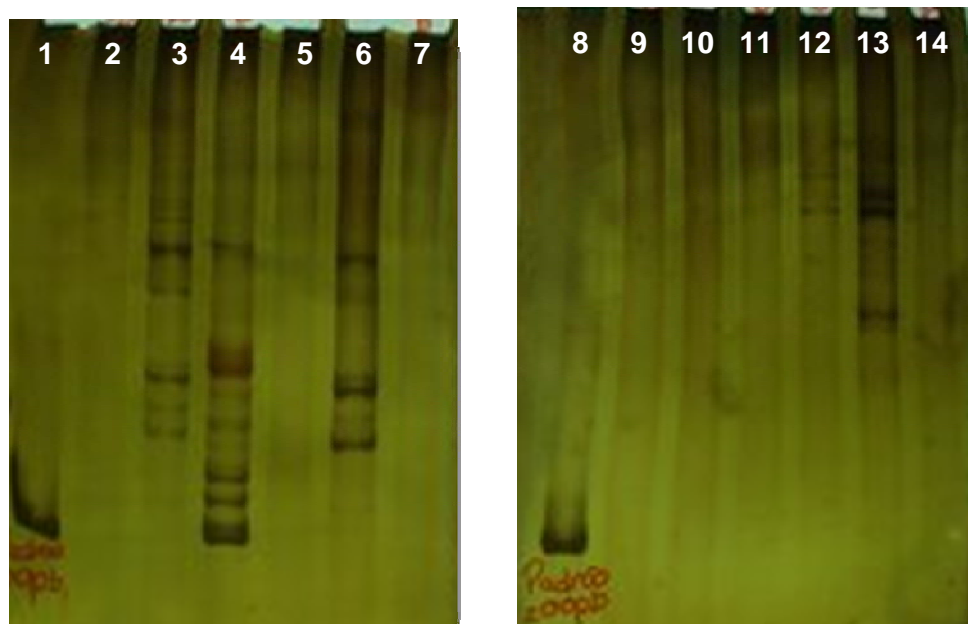


Figura 5.9 – Gel de acrilamida 6% com a padronização das PCRs. Iniciadores Proli 1, canaletas: 1 – Padrão 200 pb, 2 a 4 – temperatura de anelamento 56° C e 58° C, 5 a 7 – temperatura de anelamento 58° C e 60°. Tampões IB, IC, IVB nas canaletas 2 e 5, 3 e 6, 4 e 7 respectivamente. Iniciadores Proli 2, canaletas: 8 – Padrão 200 pb, 9 a 11 – temperatura de anelamento 56° C e 58° C, 12 a 14 – temperatura de anelamento 58° C e 60°. Tampões IB, IC, IVB nas canaletas 9 e 12, 10 e 13, 11 e 14 respectivamente.

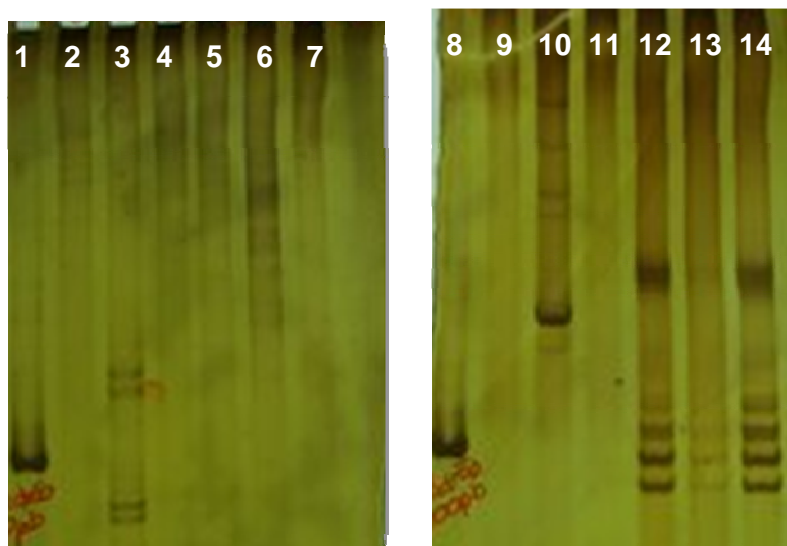


Figura 5.10 – Gel de acrilamida 6% com a padronização das PCRs. Iniciadores Proli 3, canaletas: 1 – Padrão 200 pb, 2 a 4 – temperatura de anelamento 56° C e 58° C, 5 a 7 – temperatura de anelamento 58° C e 60°. Tampões IB, IC, IVB nas canaletas 2 e 5, 3 e 6, 4 e 7 respectivamente. Iniciadores Proli

4, canaletas: 8 – Padrão 200 pb, 9 a 11 – temperatura de anelamento 56° C e 58° C, 12 a 14 – temperatura de anelamento 58° C e 60°. Tampões IB, IC, IVB nas canaletas 9 e 12, 10 e 13, 11 e 14 respectivamente.

Extração de DNA e análise na população das reações padronizadas

Após a extração do DNA (Figura 5.11) e a realização das PCRs nos indivíduos, os resultados foram analisados em gel de poliacrilamida 6%.

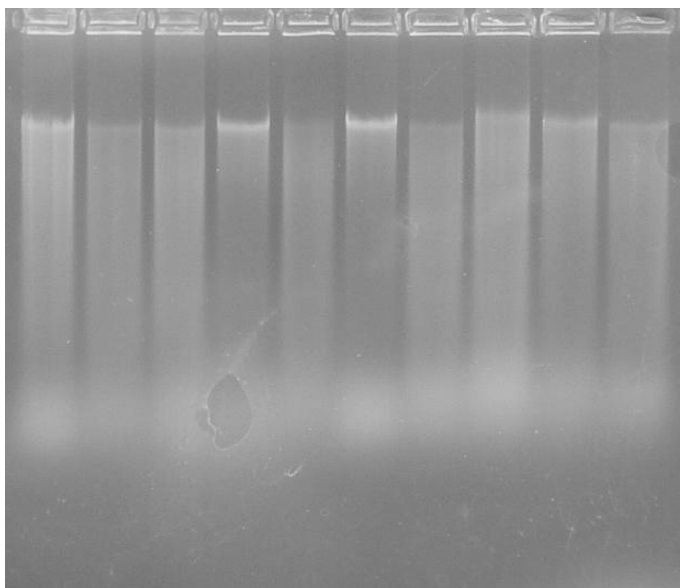


Figura 5.11 - Gel de agarose 0,8% exemplificando a extração de DNA realizada nos indivíduos de *P. costatus* do Rio Pará.

Como resultados anteriores apresentavam baixo polimorfismo de microssatélites na população do Rio Pará (Figura 5.12), foi realizado o Nested PCR nos indivíduos (Figura 5.13) e a sub-clonagem para análise da variabilidade por seqüenciamento.

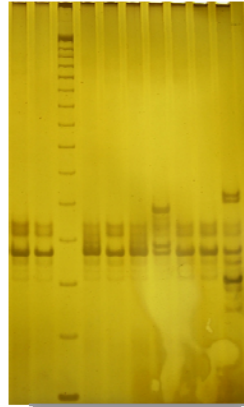


Figura 5.12 - Gel de poliacrilamida 6% exemplificando análise de polimorfismos de microssatélites anteriores realizada nos indivíduos de *P. costatus* do Rio Pará.

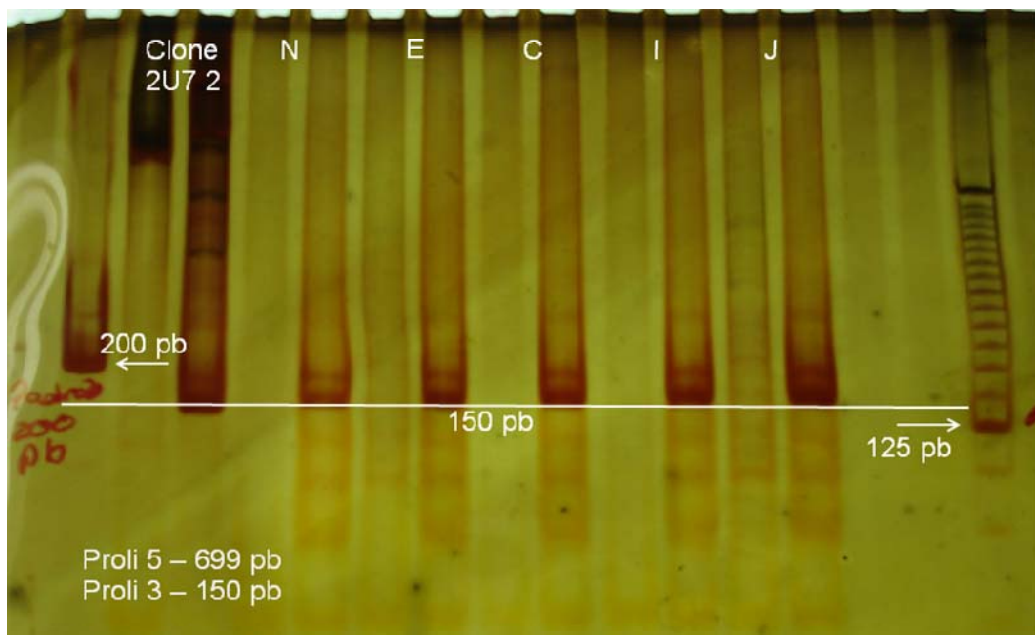


Figura 5.13 - Gel de acrilamida 6% representando as Nested PCRs realizadas na população de *P. costatus*. Canaletas: 1 – Padrão 200 pb, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 – primeira reação do Nested PCR com os iniciadores Proli 5, Canaletas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 – segunda reação do Nested PCR com os iniciadores Proli 3, canaleta 16 – padrão 25pb. A seta a direita indica a banda de 125 pb e a reta, 150 pb. O tamanho do fragmento gerado pelos iniciadores Proli 3 são de 150 pb e pelos iniciadores Proli5, 699 pb.

Sub-clonagem do produto de PCR em plasmídeo pCR®2.1 Invitrogen

Com os produtos do *Nested* PCR a sub-clonagem em plasmídeo pCR®2.1 foi realizada e subsequentemente a transformação em *E. coli* TOPO10 eletrocompetente. Os plasmídeos eram extraídos e os seqüenciamentos realizados.

A região de microsatélite entre os iniciadores Proli 3 foi encontrada em apenas 2 indivíduos.

Análise do seqüenciamento para verificação da variabilidade dos *loci*

Após as seqüências serem alinhadas pelo programa ClustalX (Figura 5.14) foi verificado que, apesar do pequeno número de indivíduos, existe uma variabilidade na repetição do motivo GA do microsatélite interno a região do iniciador Proli 3. O indivíduo utilizado para a construção da biblioteca possuía 40 repetições do motivo GA (Página 41) assim como o indivíduo nominado I39, enquanto o indivíduo C16 possuía 42.

C16

```
agcggccgcccagtgatggatatctgcagaattcggcttCAAGGTCATTGCCACCTCCAGCAGAGAGCGAAAG
AGAGAGAGAGGAGAGAGAGGGGAGAGAGAGAGCAGAGAGCAGAAAAGAGAGAGAGCAGAGAAGAGAGAGAGAGAGCA
GAGAGAGTTTTTCATCAGGCTAACATCTCGACCTGATCAATaagccgaattccagcacactggcggccgttactag
```

I39

```
cgagcggccgcccagtgatggatatctgcagaattcggctTCAAGGTCATTGCCACCTCCAGCAGAGAGCGAA
AGAGAGAGAGGAGAGAGAGGGGAGAGAGAGAGCAGAGAGCAGAAAAGAGAGAGAGCAGAGAAGAGAGAGAGAGAGCA
GAGAGAGTTTTTCATCAGGCTAACATCTCGACCTGATCAATaagccgaattccagcacactggcggccgttactag
```

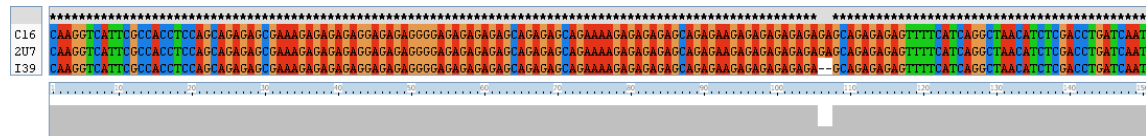


Figura 5.14 - Alinhamento das seqüências dos indivíduos C16, I39 e do clone 2U7 2 realizado no programa ClustalX 2.0 disponível em <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/clustalw2>.

DISCUSSÃO

A construção de hidrelétricas no Brasil acompanha o crescimento populacional e novas leis tentam minimizar os possíveis impactos dessas construções. Para que se possa realizar um repovoamento eficaz deve-se ter conhecimento genético das populações envolvidas. Já é comprovado que os microssatélites são boas ferramentas para o estudo de genética populacional para vários organismos incluindo peixes (SHAW, 1999; ALAM 2005). Pouco se sabe sobre *P. costatus* e *S. franciscanus* (*S. brasiliensis*) peixes migradores presentes no Rio Pará (HYLANDER, 2006; MORAES, 2004; LANGIANO, 2007), mas é crescente o interesse na busca por marcadores genéticos do tipo de microssatélites em peixes (CANINO, 2005; WARD, 2001) para conservação (BLANDOM, 2003; HATANAKA, 2006;) e inclusive com um dos gêneros objeto de estudo do presente projeto (SIVASUNDAR, 2001).

A porcentagem de sequências sem homologia no NCBI encontrada nesse trabalho (87% para *P. lineatus* e 93% para *S. brasiliensis*) mostra o quanto precisamos aprofundar no conhecimento nessas espécies que sofrem diretamente com as hidrelétricas. Para as sequências de *P. lineatus* apenas 1% possuía homologia com sequência do próprio *Prochilodus*, enquanto para as sequências de *S. brasilienses* obtidas nesse trabalho não houve similaridade significativa com nenhuma sequência de Dourado. Isso é o reflexo do pouco conhecimento genético existente sobre essas espécies.

A varredura por sonda radioativa na Biblioteca de *P. lineatus* foi menos satisfatória do que na de *S. brasiliensis* (24% e 43% de microssatélites respectivamente). Isso pode ser devido ao pequeno número de sequenciamentos realizados para Dourado ou devido ao fato dos clones de Curimba não estarem

individualizados em tubos, diminuindo assim a chance de encontrarmos o real positivo para a hibridização com a sonda radioativa. Em *P. lineatus* foi encontrada uma menor frequência de microssatélites com motivo trinucleotídeo (17%) e uma maior frequência de motivos di e tetranucleotídeo (42% e 41%, respectivamente), enquanto para *S. brasiliensis* a maior frequência de microssatélites foi com motivos de trinucleotídeos (56%) em relação aos di e tetranucleotídeo (33% e 11% respectivamente). Analisando na literatura observa-se que para outras espécies de peixes a frequência de microssatélites com motivos dinucleotídeos é maior (75%), em seguida seriam os motivos tetranucleotídeos (40%), os trinucleotídeos seriam apenas 10% e os motivos pentanucleotídeos foram encontrados em apenas 1% dos microssatélites existentes na literatura (BLANDOM, 2003; CANINO, 2005; CARRERAS, 2005; CASAS, 2005; CREER, 2006; CONELL, 2001; FENG, 2006; HATANAKA, 2006; KAMONRAT, 2002; KOKITA, 2006; LAUNEY, 2003; MESQUITA, 2003; PAPETTI, 2006; TRANAH, 2001; VAN HOUDT, 2006; WARD, 2001; WESTERMAN, 2005; YASUDA, 2006).

As regiões de microssatélite encontradas na biblioteca gênômica de *P. lineatus* se mostraram presentes em *P. costatus* levando a concluir que, apesar da alta variabilidade dos microssatélites, as regiões flaqueadoras (onde os iniciadores foram desenvolvidos) permanecem conservadas dentro do gênero. Isso já era esperado, pois iniciadores de regiões de microssatélites desenvolvidos para uma espécie, alguma vezes, amplificam *loci* de microssatélite em outra espécie proximamente relacionada (ESTOUP, 1998; ISLAM, 2007).

Análises preliminares na região do Rio Pará em poliacrilamida verificaram um baixo polimorfismo de regiões de microssatélite para *P. costatus* nessa região (YAZBECK, 2007) e por isso foi testado o método de análise de variabilidade de

regiões de microssatélite por sequenciamento de sub-clonagem de produto de PCR por ser mais sensível. A baixa variabilidade do *loci* encontrada já era esperada pelo tamanho populacional utilizado como teste. Estudos anteriores mostram que a média de número de alelos por *locus* esta diretamente relacionando com o tamanho populacional amostrado (ISLAM, 2007). O método se mostrou altamente eficaz e, mesmo com um pequeno número de indivíduos, pode-se sugerir que os iniciadores Proli 3 amplificam uma região de microssatélite variável que possivelmente poderá ser utilizada para análise populacional de *P. costatus*.

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Conclusão dos sequenciamentos dos clones positivos de *P. lineatus* e *S. brasiliensis*;
2. Padronização de PCRs para os iniciadores que ainda não foram trabalhados;
3. Teste em um maior número de indivíduos para validar a variabilidade da região amplificada pelos iniciadores Proli 3 e de outros iniciadores;
4. Análise populacional de *P. costatus*, *S. brasiliensis* e *S. franciscanus* nas regiões de hidrelétricas da Companhia de Energia de Minas Gerais – CEMIG, bem como nos plantéis utilizados para repeixamento do Rio Pará.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/clustalw2/>> Acesso: 19 de setembro de 2007

<http://bioinformatics.org/sms/rev_comp.html> Acesso: agosto, setembro e outubro de 2007

<http://biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php> Acesso: agosto, setembro e outubro de 2007

<<http://frodo.wi.mit.edu/>> Acesso: setembro de 2007

<<http://www.ambientebrasil.com.br/estadual/hidrografia/hmg.html>> Acesso: 05 de setembro de 2007

<<http://www.ambientebrasil.com.br/images/agua/peixes/doce/curimbata.gif>> Acesso: 26 de outubro de 2007

<<http://www.ambientebrasil.com.br/images/agua/peixes/doce/dourado.gif>> Acesso: 26 de outubro de 2007

<<http://www.cbhpara.org.br>> Acesso: 20 de setembro de 2007

<<http://www.cemig.com.br>> Acesso: 05 de setembro de 2007

<<http://www.fao.org>> Acesso: 16 de fevereiro de 2007

<<http://www.fishbase.org>> Acesso: 26 de outubro de 2007

<http://www.igam.mg.gov.br/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=154>

Acesso: 20 de setembro de 2007

<http://www.igam.mg.gov.br/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=154>

Acesso: 20 de setembro de 2007

<<http://www.itaipu.gov.br/2sepocho/boletim1.htm>> Acesso: 05 de setembro de 2007

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on> Acesso: setembro de 2007

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>> Acesso: 18 de setembro de 2007

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>> Acesso agosto, setembro e outubro de 2007

<http://www.nlm.nih.gov/news/press_releases/dna_rna_100_gig.html> Acesso: 18 de setembro de 2007

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M., 2007. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Editora EDUEM, Maringá, Paraná, Brasil.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; JÚLIO Jr., H. F., 2003. *Migratory fish from the upper Parana river basin, Brazil*. Em: J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross, A. Baer. *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. World Fisheries Trust, British Columbia, Canadá.

ALAM, M. S.; ISLAM, M. S., 2005. *Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers*. *Aquaculture* 246(1–4): 151–160

ANA – Agência Nacional de Águas. Disponível em <<http://www.ana.gov.br/Destaque/docs/d221-BoletimANASF1DEZ04.pdf>> Acesso: 06 de novembro de 2007

ANNE, C., 2006. *Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects*. *Genetica*, 127(1-3):101-120

BEEBEE, TJC., 2005. *Conservation genetic of amphibians*. *Heredity*, 95: 423-427.

BLANDON, I. R.; LEÓN, F. J. G.; WARD, R.; BUSSCHE, R. A. V. D.; NEEDLEMAN, D. S. *Studies in conservation genetics of tarpon (*Megalops atlanticus*) — V. Isolation and characterization of microsatellite loci*. *Molecular Ecology Notes*, 3: 632–634

CANINO, M. F.; SPIES, I. B.; HAUSER, L. (2005) *Development and characterization of novel di- and tetranucleotide microsatellite markers in Pacific cód (Gadus macrocephalus)*. Molecular Ecology Notes doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01109.x

CAPELETI, A. R.; PETRERE JR., M., 2006. *Migration of the curimatá Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall "Cachoeira de Emas" of the Mogi-Guaçu River - São Paulo, Brazil*. Braz. J. Biol., 66(2B): 651-659.

CARRERAS-CARBONELL, J.; MACPHERSON, E.; PASCUAL, M., 2005. *Characterization of 12 microsatellite markers in Serranus cabrilla (Pisces: Serranidae)*. Molecular Ecology Notes doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01193.x

CASAS, L.; MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, L., 2005. *Characterization of microsatellite markers derived from sequence databases for the European flounder (Platichthys flesus)*. Molecular Ecology Notes, 5: 664–665

CREER, D. A.; TREXLER, J. C., 2006. *New polymorphic microsatellite loci in two fish species: bluefin killifish (Lucania goodei) and yellow bullhead (Ameiurus natalis)*. Molecular Ecology Notes, 6: 167–169

CONNELL, S . K . J . M. C.; SKIBINSKI, D. O. F. ;MAIR, G. C. , 2001. *Microsatellite markers from a commercially important South-east Asian cyprinid, the silver barb (Barbodes gonionotus Bleeker)*. Molecular Ecology Notes, 1:135-136

DESALLE, R.; AMATO, G., 2004. *The expansion of conservation genetics*. Nature Reviews Genetics, 5: 702-712

ELLEGREN, H., 2004. *Microsatellites: simple sequences with complex evolution*. Nature Reviews Genetics, 5: 435 - 445

ESTOUP, A.; ANGERS, C. R., 1998. *Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations*. Em: CARVALHO, G., (ed) *Advances in molecular ecology*. IOS Press, Amsterdam, 55–86

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D., 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN.

FENG, J. L. I., F.; YUE, G. H., 2006. *Twelve novel polymorphic microsatellites in a marine fish species, yellow croaker Larimichthys polyactis*. Molecular Ecology Notes, 6: 188–190.

FORSTMEIER, W.; SEGELBACHER, G.; MUELLER, J. C.; KEMPENAERS, B., 2007. *Genetic variation and differentiation in captive and wild zebra finches (Taeniopygia guttata)*. Molecular Ecology, 16(19): 4039–4050

FRANKHAM, R., 2003. *Genetics and conservation biology*. Comptes Rendes Biologies, 326: S23 -S29.

FRIAR, E. A.; CRUSE-SANDERS, J. M.; MCGLAUGHLIN, M.E., 2007. *Gene flow in Dubautia arborea and D. ciliolata: the roles of ecology and isolation by distance in maintaining species boundaries despite ongoing hybridization*. *Molecular Ecology*; 16(19): 4028-38

GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L., 1994. *Ecology and conservation of fish in southeastern brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments*. *Acta Limnologica Brasiliensa*, vol V: 187-197. Workshop: Brazilian programme on conservation and management on inland water.

HATANAKA, T.; SILVA, F. H.; GALETTI, P. M. Jr. (2006) *Population substructuring in a migratory freshwater fish Prochilodus argenteus (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River*. *Genetica* 126:153–159

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K., 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. E.U.A.

HILSDORF, A.; KRIEGER, J. E., 1998. *Biologia molecular na conservação de peixes*. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*, 1(5): 10 - 12.

HYLANDER, L. D.; GRÖHN, J.; TROPP, M.; VIKSTRÖM, A.; WOLPHER, H.; SILVA, E. C.; MEILI, M.; OLIVEIRA, L. J. 2006. *Fish mercury increase in Lago Manso, a new hydroelectric reservoir in tropical Brazil*. *Journal of Environmental Management*, 81(2): 155-166

ISLAM, M. N.; ISLAM, S.; ALAM, S., 2007. *Genetic Structure of Different Populations of Walking Catfish (Clarias batrachus L.) in Bangladesh*. *Biochem Genet.*, 45(9-10): 647-662.

KAMONRAT, W.; MCCONNELL, S . K . J .; COOK, D. I., 2002. Polymorphic microsatellite loci from the Southeast Asian cyprinid, *Barbodes gonionotus* (Bleeker). *Molecular Ecology Notes*, 2: 89–90

KOKITA, T.; MATSUOKA, K.; TOMINAGA, O.; SEIKAI, T., 2006. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in a pelagic-spawning reef fish *Hypodytes rubripinnis*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 210–211

LANGIANO, V. D.; MARTINEZ, C. B. 2007. *Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol* (Epub ahead of print)

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G., 2007. *ClustalW and ClustalX version 2.0*. *Bioinformatics*, doi:10.1093/bioinformatics/btm404.

LAUNEY, S.; KRIEG, F.; MORIN, J.; LAROCHE, J., 2003. Five new microsatellite markers for Northern pike (*Esox lucius*). *Molecular Ecology Notes*, 3: 366–368

LIMA, F. C. T., BRITSKI, H. A., 2007. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 5(3):237-244.

MATIOLI, S. R., 2001. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora.

MARY, J. J.; CATHY, S. B.; CHARLES, K. S. II., 1997. *Increased informativeness of RAPD analysis by detection of microsatellite motifs*. *BioTechniques*, 23: 285-290.

MESQUITA, N.; CUNHA, C.; HÄNFLING, B.; CARVALHO, G. R.; ZÉ-ZÉ, L.; TENREIRO, R.; COELHO, M. M., 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered Portuguese freshwater fish *Squalius aradensis* (Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes*, 3: 572–574

MORAES, G.; CHOUDHURI, J. V.; SOUZA, R. H.; NETO, C. S. 2004. *Metabolic effects of exercise in the golden fish Salminus maxillosus “dourado” (Valenciennes, 1849)*. *Braz. J. Biol.*, 64(3B): 655-660

NELSON, R. J., BECHAM, T. D., SMALL, P. M., 1998. *Microsatellite analysis of the population structure of a Vancouver Island sockeye salmon (Ocorhynchus nerka) stock complex using non-denaturing gel electrophoresis*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7: 312-319.

NERAAS, L. P.; SPRUELL, P., 2001. *Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (Salvelinus confluentus) in the Clark Fork River system.* Molecular Ecology, 10: 1153-1164.

PAPETTI, C.; ZANE, L.; PATARNELLO, T., 2006. Isolation and characterization of microsatellite loci in the icefish *Chionodraco rastrospinosus* (Perciformes, Notothenioidea, Channichthyidae). Molecular Ecology Notes, 6: 207–209

SARTORI, G.; BETTELLI, S.; SCHIROSI, L.; BIGIANI, N.; MAIORANA, A.; CAVAZZA, A.; ROSSI, G., 2007. Microsatellite and EGFR, HER2 and K-RAS Analyses in Sclerosing Hemangioma of the Lung. The American journal of surgical pathology, 31(10):1512-1520.

SCHLÖTTERER, C., 2000. *Evolutionary dynamics of microsatellite DNA.* Chromosoma, 109(6): 365-371.

SHAW, P. W.; TURAN, C.; WRIGHT, J. M.; CONNELL, M. O.; CARVALHO, G. R., 1999. *Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (Clupea harengus), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses.* Heredity 83(4): 490–499

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. *Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers.* Molecular Ecology, 10: 407–417

SPIELMAN, D.; BROOK, B. W.; FRANKHAM, R., 2004. *Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them.* PNAS 2004 October; 101(42): 15261-15264

SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, M.; WOODHEAD, M.; RUSSEL, A.; LOWE, J.; GIBBY, M.; POWELL, W., 2003. *How much effort is required to isolate nuclear microsatellite from plants?* Molecular Ecology, 12:1339-1348.

SU, X.; HAYTON, K.; WELLEMS, T. E., 2007. *Genetic linkage and association analyses for trait mapping in Plasmodium falciparum.* Nature Reviews Genetics, 8: 497-506

TRANAH, G. J.; AGRETI, J. J.; MAY, B., 2001. *New microsatellite loci for suckers (Catostomidae): primer homology in Catostomus, Chasmistes, and Deltistes.* Molecular Ecology Notes, 1: 55-60

VAN HOUTT, J. K. J. ; HELLEMANS, B.; VAN DE PUTTE, A.; KOUUBI, P. ; VOLCKAERT, F. A. M., 2006. *Isolation and multiplex analysis of six polymorphic microsatellites in the Antarctic notothenioid fish, Trematomus newnesi.* Molecular Ecology Notes, 6: 157–159

VRIJENHOEK, R. C., 1998. *Conservation genetics of freshwater fish.* Journal of Fish Biology 53 (Supplement A), 394 - 412.

WARD, R. D.; REILLY, A. (2001) *Development of microsatellite loci for population studies of the pink ling, Genypterus blacodes (Teleostei: Ophidiidae)* Molecular Ecology Notes, 1: 173-175

WESTERMAN, M. E.; BUONACCORSI, V. P.; STANNARD, J. A.; GALVER, L.; TAYLOR, C.; LYNN, E. A.; KIMBRELL, C. A.; VETTER, R. D., 2005. *Cloning and characterization of novel microsatellite DNA markers for the grass rockfish, Sebastes rastrelliger, and cross-species amplification in 10 related Sebastes spp.* Molecular Ecology Notes, 5: 74–76

YASUDA, N.; NAGAI, S.; HAMAGUCHI, M.; LIAN, C. L.; NADAOKA, K., 2006. *Development of microsatellite markers for the crown-of-thorns starfish Acanthaster planci.* Molecular Ecology Notes, 6: 141–143

YAZBECK, G.; KALAPOTHAKIS, E., 2007. *Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish Prochilodus lineatus (Characiformes).* Genetics and Molecular Research, 6(4):1026-1034

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)