

PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA TÉCNICA rDNA 5S, PARA OBTENÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ESPÉCIE-ESPECÍFICOS EM POPULAÇÕES DE *Hypostomus spp.* DO RIO IVAÍ

Paulo Roberto Nunes de Goes¹; Mariana Augusto Monteiro²; Alessandra Valéria de Oliveira³; Alignéia Aparecida de Souza Guedes⁴

RESUMO: Os peixes são os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida, com aproximadamente 20.000 espécies descritas. Os peixes de água doce são responsáveis por 20 a 25% da biodiversidade de vertebrados, no entanto, um percentual de 30 a 40% de toda a diversidade existente na ictiofauna Neotropical, não foi reconhecida. Dentro da família Loricariidae, particularmente no gênero *Hypostomus spp.* há uma grande similaridade morfológica entre os espécimes, o que dificulta sua identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas entre as espécies. Na bacia do rio Paraná, incluindo o rio Ivaí, há mais de 16 espécies de *Hypostomus spp.* que não apresentam um consenso em relação a sua taxonomia, acarretando em estudos para uma correta identificação. As técnicas baseadas em marcadores moleculares tem sido utilizadas na identificação de espécies de peixes neotropicais, entre elas se destacando a técnica do rDNA 5S, que consiste de seqüências que codificam o rRNA 5S e são separadas umas das outras por espaçadores não transcritos. Este trabalho objetivou padronizar condições ideais de amplificação da técnica rDNA 5S para obter marcadores moleculares que possam ser utilizados para a identificação de espécimes de *Hypostomus spp.* Foi possível realizar a amplificação de fragmentos de DNA pela técnica de rDNA 5S para *Hypostomus spp.*, utilizando DNA em uma concentração de 5ng e em temperaturas de desnaturação de 92°C, anelamento de 40°C e extensão de 72°C. Assim esta técnica poderá ser utilizada em futuros estudos de variabilidade e polimorfismo genético desta espécie através de marcadores moleculares obtidos por esta técnica.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiversidade; Identificação de espécies; Taxonomia.

1 INTRODUÇÃO

Os peixes são os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida (Torres, 2008), com aproximadamente 20.000 espécies descritas (Lowe-McConnell, 1999). A descoberta de novas espécies de peixes tem aumentado no país, sendo que na última década este crescimento foi superior a 15%, devido principalmente ao conhecimento da fauna de pequenos peixes de cabeceira e ambientes especializados. Entre as novas espécies encontradas destacam-se aquelas pertencentes à família Loricariidae (73 spp.) (Buckup *et al.*, 2006). Dentro desta família, particularmente no

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária. Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do CESUMAR (PROBIC). prngoos@uol.com.br

² Acadêmica do Curso de Biomedicina. Departamento de Biomedicina Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – Paraná. marianaa.monteiro@yahoo.com.br

³ Docente do Curso de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – Paraná. alessoli@cesumar.br

⁴ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. aligneia@hotmail.com

gênero *Hypostomus spp.* há uma grande similaridade morfológica entre os espécimes, o que dificulta sua identificação e o estabelecimento de relações filogenéticas entre as espécies.

Na bacia do rio Paraná, há mais de 16 espécies de *Hypostomus spp.* que não apresentam um consenso em relação a sua taxonomia, levando a necessidade de mais estudos para uma identificação específica (Agostinho e Júlio Jr., 1999). Embora a ictiofauna do Brasil seja uma das maiores do mundo em diversidade, a quantidade de estudos a cerca de sua biologia, taxonomia e genética ainda é mínima. Estes dados são de grande importância, visto que a ictiofauna constitui um valioso banco genético, e que há uma crescente preocupação quanto à manutenção dos estoques naturais.

As técnicas baseadas em marcadores moleculares tem sido utilizadas na identificação da diversidade das espécies de peixes neotropicais, buscando a preservação de unidades evolutivamente significativas para a manutenção dessa biodiversidade (Ryder, 1986).

Entre as técnicas de análise genética temos o rDNA 5S, que consiste de seqüências que codificam o rRNA 5S e são separadas umas das outras por espaçadores não transcritos (NTS) (Martins e Wasko, 2004). O gene de rDNA 5S é altamente conservado, mas ocorre repetido em tandem com seqüências espaçadoras de tamanho variável conforme a espécie (Céspedes *et al.*, 1999). Nesta família multigênica a alternância de regiões transcritas e não transcritas permite avaliar a variabilidade genética entre espécies próximas e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Martins e Galetti, 2001).

O uso das repetições do rDNA 5S apresenta algumas vantagens sobre os demais marcadores disponíveis, pois a presença de seqüências codificantes, conservadas, flanqueando regiões variáveis dos NTSs, favorece a aplicação da técnica de PCR, e conseqüentemente, o isolamento dos NTSs das mais diferentes espécies sem um conhecimento prévio do genoma da espécie em questão (Martins e Wasko, 2004).

Desta forma este trabalho objetivou padronizar as condições ideais de amplificação da técnica rDNA 5S para obter marcadores moleculares que possam ser utilizados para a identificação de espécimes de *Hypostomus spp.* na bacia do rio Ivaí, o que poderá auxiliar em futuros estudos de ecologia e biologia do gênero na região.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para este trabalho seis exemplares de três espécies do gênero *Hypostomus*, sendo elas *Hypostomus ancistroides*, *Hypostomus regani* e *Hypostomus sp2* que foram coletados no rio Ivaí no período de 2007 a 2008, durante o desenvolvimento de outros projetos de pesquisa.

De cada espécime coletado foram retiradas amostras de tecido muscular, que posteriormente foram fixadas em álcool etílico comercial e estocadas em freezer a -20 °C.

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989). Amostras de tecido muscular retiradas de cada indivíduo foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%), tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Espermidina 0,15 mM) pH 8,0 e proteinase K (20 µg/µL) por 90 minutos em banho-maria a 37°C. Posteriormente, o DNA foi purificado por extração com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio, respectivamente, e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado. O *pellet* foi ressuspenso em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com RNase. Foi feita a quantificação através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, por meio de comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

Cada um dos indivíduos teve seu DNA submetido à amplificação em um termociclador, com a utilização dos *primers* 5S1 e 5S2 descritos por Pendás *et al.* (1995). Além destes também foram utilizados tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM), MgCl₂ 2mM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reação de Taq-polimerase e água suficiente para completar 13 µl. Foram testadas diversas concentrações de DNA genômico (5ng, 10ng, 15 ng e 20ng) na reação, bem como diferentes temperaturas de desnaturação (92° e 94°C), anelamento (40° e 42°C) e extensão (72 e 74°C) durante a amplificação. Após o DNA ser amplificado, foi utilizado para separação de seus fragmentos o gel de agarose 1,4 %, corado com brometo de etídio. A visualização dos fragmentos foi feita em um transluminador sob luz UV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a amplificação do DNA com a técnica rDNA 5S foram realizados testes com os *primers* 5S1 e 5S2 utilizando diferentes concentrações do DNA genômico e diferentes temperaturas de anelamento e extensão.

O tamanho dos fragmentos obtidos através da amplificação do DNA ficou entre 100 e 2100 pares de bases (pb) considerando apenas as bandas nítidas e reproduzíveis. Nesta mesma análise observou-se que o número de fragmentos produzidos através desta técnica nos indivíduos analisados variou de 2 a 6 bandas (Figura 1).

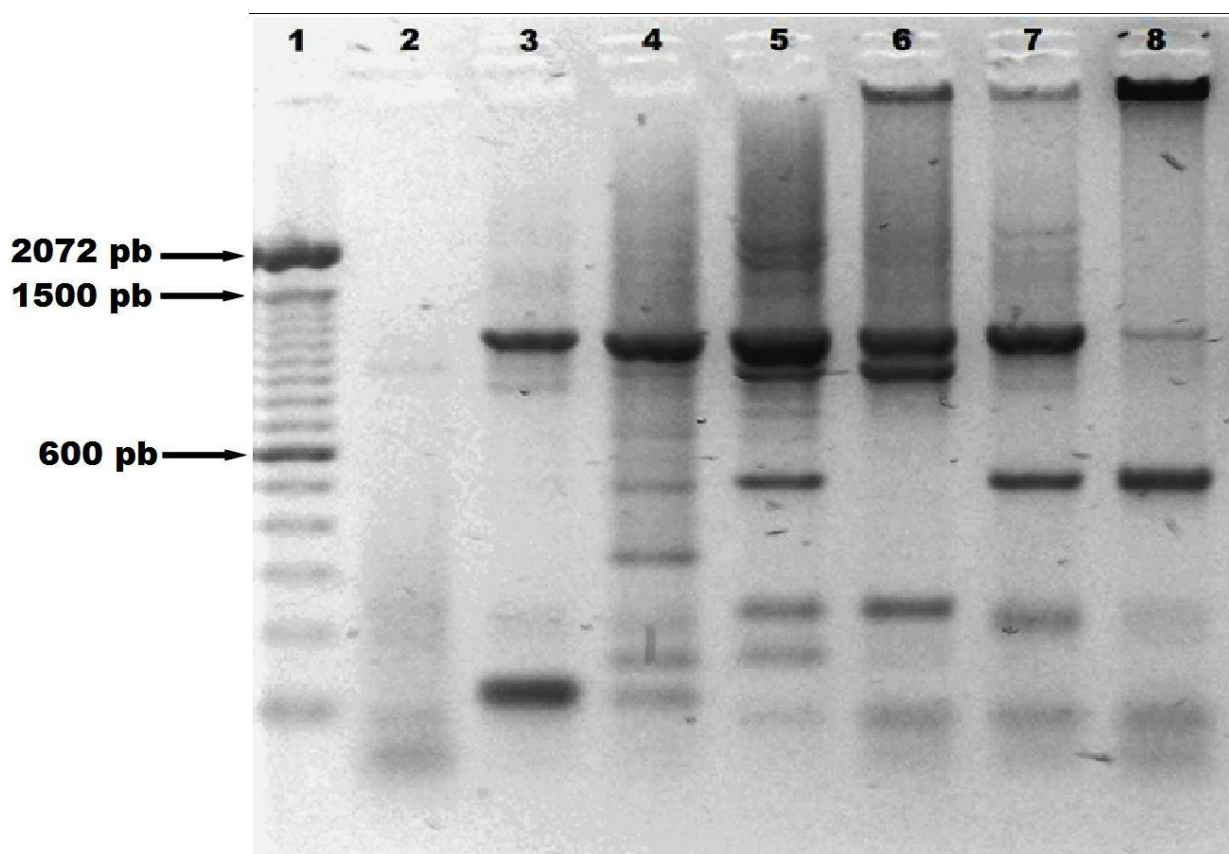


Figura 1 - Fragmentos de DNA de *Hypostomus spp.* amplificados com a técnica rDNA 5S. (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb; (2) Controle negativo da reação. (3 e 4) *Hypostomus ancistroides*; (5 e 6) *Hypostomus regani*; (7 e 8) *Hypostomus sp2*.

A concentração ideal de DNA na reação, que possibilitou a amplificação dos fragmentos de DNA foi de 5 ng. Foi observado que em concentrações inferiores a 5 ng os fragmentos de DNA não são amplificados ou caso sejam, aparecem como bandas de difícil visualização no gel. Nas ocasiões em que foram utilizadas concentrações de DNA

genômico iguais ou superiores a 10 ng, o DNA, no momento da corrida eletroforética, ficou retido na parte superior do gel, como pode ser observado no número 8 da Figura 1. Resultados similares foram obtidos por Avanzi (2008) e Oliveira *et al.* (2008).

No presente trabalho foram testadas diferentes temperaturas em cada uma das etapas descritas acima, ou seja, durante as fases de desnaturação, anelamento e extensão. Não foram observadas alterações significativas em relação aos fragmentos amplificados, quando temperaturas diferentes foram utilizadas. A amplificação ocorreu nas temperaturas de desnaturação de 92°C e 94°C, nas temperaturas de anelamento de 40°C e 42°C e nas temperaturas de extensão de 72°C e 74°C. Desta forma a amplificação do DNA dos espécimes obtidos através da técnica rDNA 5S pode ser realizada nas seguintes etapas: 1 ciclo de 4 minutos a 92°C; 40 ciclos de 1 minuto a 92°C para que ocorra a desnaturação do DNA, 1 minuto e 30 segundos a 40°C para que ocorra o anelamento dos *primers* e 2 minutos a 72°C para que ocorra a atuação da *Taq*-polimerase e a síntese do polinucleotídeo complementar a uma das fitas da região intermediária entre dois sítios de anelamento do *primer*. Após o último ciclo de amplificação o DNA fica 5 minutos a 72°C. Por último este DNA é resfriado durante 20 minutos a 20°C. Esta amplificação ocorre em ordem exponencial e tem uma duração em torno de 5 horas. Temperaturas similares foram utilizadas por Oliveira *et al.* (2008) e por Pendás *et al.* (1995) para amplificação de DNA de outras espécies de peixes.

4 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível estabelecer as condições ideais de amplificação da técnica rDNA 5S, utilizando o DNA de espécimes de *Hypostomus spp.* Assim esta técnica poderá ser utilizada em futuros estudos de variabilidade e polimorfismo genético de espécies deste gênero.

5 REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JR., H. F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In: LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999. p. 374-400.

AVANZI, V.M. ; CASTRO, N.K. ; OLIVEIRA, A. V. Padronização das condições de amplificação da técnica ISSR, para obtenção de marcadores moleculares espécie-específicos em populações de *Hypostomus* da bacia do rio Ivaí. In: IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar, 4., 2008, Maringá. **Anais eletrônicos...** Maringá, Cesumar, 2008.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M.S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 26., 2006, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina, UEL/Unifil/SBG, 2006.

CÉSPEDES, A.; GARCIA, T.; CARRERA, E.; GONZÁLES, I.; FERNÁNDEZ, A.; HERNÁNDEZ, P.E.; MARTIN, R. Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reihardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. **J. Agricul Food Chem**, v. 47, p.1046-1050, 1999.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999.

MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: WILLIAMS, C.R. (Ed.). **Focus on Genome Research**. New York: Nova Science Publishers, 2004. p. 335-363.

MARTINS, C.; GALETTI JUNIOR, P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome (Ottawa)**, v. 44, n. 5, p. 903-910, 2001.

OLIVEIRA, V.F. ; OLIVEIRA, A. V. ; PRIOLI, A. J. ; PRIOLI, S. M. A. P. Obtention of 5S rDNA molecular markers for invasive and native *Cichla* populations (Perciformes Cichlidae), of Brazil. **Acta Scientiarum (UEM)**, v. 30, p. 83-89, 2008.

PENDÁS, A. M.; MÓRAN, P.; MARTÍNEZ, J. L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. **Mol. Ecol.**, v. 4, p.275-276, 1995.

RYDER, O. A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends Ecol. Evol.**, n.1, p.9-10, 1986.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.