

UTILIZAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES rDNA 5S NA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hypostomus* sp. DA BACIA DO RIO IVAÍ

Paulo Henrique Godoy Teles¹; Mariana Augusto Monteiro¹; Paulo Roberto Nunes de Goes²; Alessandra Valéria de Oliveira³

Resumo: Os peixes constituem quase metade do número total de vertebrados. No entanto, um percentual de 30 a 40% de toda a diversidade existente na ictiofauna Neotropical, até o momento, não foi reconhecida. A família Loricariidae apresenta o maior número de espécies válidas (673) e 300 espécies não descritas. Dentro dessa família, o gênero *Hypostomus* possui cerca de 120 espécies e só na bacia do rio Paraná, incluindo o rio Ivaí, há mais de 16 espécies sem um consenso em relação a sua taxonomia. Técnicas baseadas em marcadores moleculares tem sido utilizadas na identificação da diversidade das espécies de peixes neotropicais, entre elas se destacando a técnica do rDNA 5S. O uso das repetições do rDNA 5S permite isolar os espaçadores não transcritos das mais diferentes espécies sem um conhecimento prévio do genoma da espécie em questão. Este trabalho objetivou verificar a presença de polimorfismo genético entre diferentes populações de *Hypostomus* sp. da bacia do rio Ivaí, utilizando a técnica rDNA 5S. Foram utilizados exemplares do gênero *Hypostomus* coletados em pontos distintos do rio Ivaí. A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio utilizando amostras de tecido muscular dos espécimes. A amplificação foi realizada através da técnica de rDNA 5S. Com esta biotecnologia foi possível identificar um grande número de locos monomórficos na população de *Hypostomus* sp. do rio Ivaí. Assim a utilização desta técnica de amplificação demonstrou-se uma importante ferramenta para a identificação da diversidade deste grupo.

Palavras-chave: *Hypostomus*; Marcadores moleculares; rDNA 5S.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hypostomus* da família Loricariidae possui cerca de 120 espécies. Estes peixes apresentam uma ampla variação morfológica e de cor, o que dificulta a identificação de espécies (RUBERT *et al.*, 2008). Na bacia do rio Paraná, há mais de 16 espécies de *Hypostomus* que não apresentam um consenso em relação a sua taxonomia, levando a necessidade de mais estudos para uma identificação específica (AGOSTINHO; JÚLIO JR., 1999).

Segundo ZAWADZKI *et al.* (2004), as várias espécies ou morfótipos de *Hypostomus* são aparentemente endêmicos de um ou poucos pequenos tributários do Rio Paraná e análises genéticas tem demonstrado ser uma valiosa ferramenta para auxiliar a avaliação do grau de isolamento reprodutivo de vários morfótipos.

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do CESUMAR (PROBIC). godoy.teles@hotmail.com; marianaa.monteiro@yahoo.com.br

² Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – Paraná. prngoes@uol.com.br

³ Orientadora e Docente do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. alessoli@cesumar.br

Os recentes avanços em biologia molecular permitiram estudos sobre a genética de populações, a análise de polimorfismos, e a identificação de híbridos naturais. Entre estas técnicas, o rDNA 5S é um componente importante, consistindo de sequências que codificam rDNA 5S e que são separadas uma da outra por espaçadores não transcritos – NTSs (Martins;Wasko, 2004). O gene de rDNA 5S é altamente conservado, mas ocorre repetido em tandem com sequências espaçadoras de tamanho variável conforme a espécie (CÉSPEDES *et al.*, 1999).

O gene rDNA 5S é informativo e possui altas taxas de conservação ao longo do genoma dos eucariotos, possuindo características únicas que são hereditárias. Estudos moleculares do gene rDNA 5S vem sendo realizados com diversos grupos, inclusive em algumas espécies de peixes, com o intuito de solucionar problemas de relações filogenéticas, padrão de ancestralidade e diversidade genética, entre grupos de populações naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

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; WASKO, 2004).

Este trabalho objetivou verificar a presença de polimorfismo genético entre diferentes populações de *Hypostomus* sp. da bacia do rio Ivaí, utilizando a técnica rDNA 5S.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA

Foram utilizados para esse trabalho espécimes de *Hypostomus* sp. coletados nos anos de 2007 e 2008 no rio Ivaí. De cada espécime coletado foram retiradas amostras de tecido muscular, fixadas em álcool etílico comercial e estocadas em freezer a -20°C.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

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 ressuscitado em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com RNase. Foram feitas quantificações através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, por meio de comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

2.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Cada um dos indivíduos tiveram seu DNA submetido à amplificação em um termociclador, com a utilização dos *primers* 5S1 e 5S2 descritos por Pendás *et al.* (1995) para amplificação de rDNA 5S de salmão, truta marrom e truta arco-íris. 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/reacção 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 anelamento e extensão 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 foi observada em um transluminador sob luz UV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários estudos vêm demonstrando a aplicabilidade dos marcadores moleculares para analisar a variabilidade e polimorfismo genético em peixes. Em especial o uso desta biotecnologia em *Hypostomus* tem ajudado a estimar polimorfismo e a variabilidade genética destes. CASTRO et al. (2009) vêm utilizando esta ferramenta para estudar populações de *Hypostomus* na bacia do Rio Ivaí.

Este trabalho utilizou 14 exemplares de *Hypostomus* sp., onde o DNA extraído da musculatura destes animais foi amplificado. Os padrões de bandas obtidos com a amplificação do material genético foram analisados e apenas as bandas de fácil visualização foram levadas em consideração.

O número de bandas nítidas geradas por esta técnica nos indivíduos analisados variou de quatro a sete e o tamanho desses produtos amplificados permaneceu entre 100 e 1800 pares de bases (pb), resultado similar ao obtido por GOES et al. (2009) ao amplificar outras espécies de *Hypostomus*. As Figura 1 mostra o perfil eletroforético dos indivíduos analisados.

Os espécimes analisados apresentaram 10% de locos polimórficos e 90% de locos monomórficos, ou seja, lócus presentes em todos os indivíduos da população. A grande quantidade de lócus monomórficos indica uma baixa variabilidade genética intraespecífica, confirmando os resultados obtidos por CASTRO et al. (2009), utilizando marcadores moleculares ISSR. Esta baixa variabilidade genética pode ocorrer devido a vários fatores, dentre estes o hábito sedentário desses peixes.

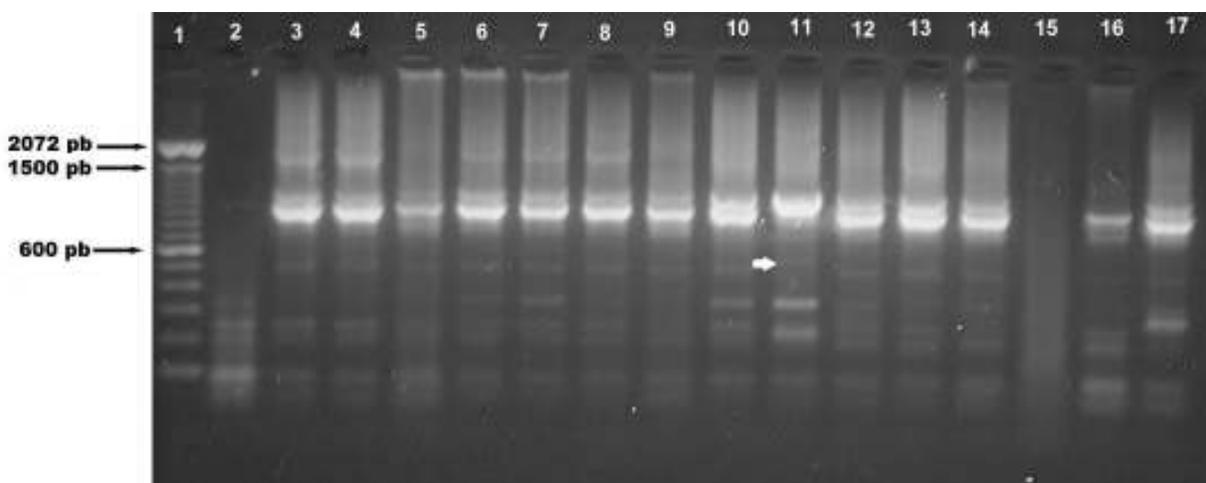


Figura 1. Fragmentos de DNA de *Hypostomus* amplificados com a técnica rDNA 5S. (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb.(2) Controle negativo da reação. (3 a 17) *Hypostomus* sp. A seta branca indica a presença de lócus polimórfico entre os indivíduos.

4 CONCLUSÃO

O uso da técnica rDNA 5S, utilizada neste trabalho, possibilitou a identificação de um grande número de locos monomórficos na população de *Hypostomus* sp. do rio Ivaí utilizada neste trabalho. Desta forma foi evidenciada uma baixa variabilidade genética intrapopulacional. Assim a utilização desta técnica de amplificação demonstrou-se uma importante ferramenta para a identificação da diversidade deste grupo, o que contribuirá para o manejo visando a preservação dos estoques naturais desta espécie.

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. Tradução: Vazzoler, A. E. A. M.; Agostinho, A. A.; Cunnigham, P. T. M. São Paulo: Edusp, p. 374-400, 1999.
- CASTRO, N.K. ; AVANZI, V.M. ; GUEDES, A. A. S.; OLIVEIRA, A. V. Análise genética de espécies do gênero *hypostomus* sp. Do rio Ivaí, através de marcadores moleculares ISSR. In VI *Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar*, 2009. Maringá. **Anais eletrônicos...** Maringá, Cesumar, 2009.
- CÉSPEDES , A. et al. 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.
- GOES, P. R. N.; MONTEIRO, M. A.; OLIVEIRA, A. V.; GUEDES, A. A. S. Padronização das condições de amplificação da técnica rdna 5s, para obtenção de marcadores moleculares espécie-específicos em populações de *hypostomus spp*. Do rio Ivaí. In VI *Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar*, 2009. Maringá. **Anais eletrônicos...** Maringá, Cesumar, 2009.
- 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, p. 335-363, 2004.
- OLIVEIRA, V. F. et al. Obtaining 5S rDNA molecular markers for native and invasive *Cichla* populations (Perciformes – Cichlidae), in Brazil. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 30, n. 1, 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.
- RUBERT, Marceléia; Zawadzki, Cláudio H.; GIULIANO-CAETANO, Lucia. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v.6, n.1, p. 93-100, 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; PAIVA, S.; LARA-KAMEI, M. C. S. Allozyme differentiation of four populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genética**, v.121, p. 251-257, 2004.