

ANÁLISE DE POLIMORFISMO MOLECULAR EM POPULAÇÕES DE *Hypostomus* DO RIO IVAÍ ATRAVÉS DA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO rDNA 5S

Tiago Pereira de Freitas¹; Paulo Roberto Nunes de Goes²; Alessandra Valéria de Oliveira³

RESUMO: A diversidade dos recursos genéticos aquáticos ocorre pelo conjunto da diversidade de espécies e pela própria diversidade genética destes. Na Ordem dos Siluriformes, a família Loricariidae possui aproximadamente 600 espécies já descritas e dentro da subfamília Hypostominae o gênero *Hypostomus* é o que tem a maior distribuição dentre os peixes da América do Sul, sendo considerado um dos mais complexos da ictiofauna neotropical. Na bacia do rio Paraná, são encontradas em torno de 16 espécies de *Hypostomus* e não há consenso em relação a sua taxonomia. Este trabalho objetivou analisar o polimorfismo genético entre espécimes de *Hypostomus* do rio Ivaí, através da técnica de amplificação 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. Ao analisar os perfis eletroforéticos dos diferentes espécimes através da separação dos fragmentos de DNA, pôde-se observar a existência de bandas espécie-específicas e também foram encontrados marcadores que são compartilhados por alguns grupos. O uso da técnica rDNA 5S possibilitou evidenciar a variabilidade genética de populações de *Hypostomus* do rio Ivaí e a presença de marcadores moleculares diagnósticos evidenciou ao menos a presença de 7 grupos distintos de *Hypostomus*. na região.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiversidade; Marcadores moleculares; Variabilidade genética.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hypostomus*, é composto por peixes de pequeno a grande porte, com padrão muito variável de coloração, apresentando ou não manchas; o abdome podem ser cobertos com placas ou não; a nadadeira caudal é bifurcada com o maior lóbulo na parte superior; duas ou três placas pré dorsais; cinco fileiras de placas no pedúnculo caudal; placas laterais em quilha ou não (Armbruster, 2004). Na bacia do rio Paraná são encontradas em torno de 16 espécies de *Hypostomus* e estes não apresentam um consenso em relação a sua taxonomia, levando a necessidade de mais estudos para uma identificação específica (Agostinho e Júlio Jr., 1999). Desta forma estudos a cerca de sua biologia, taxonomia e genética são de grande importância, devido há crescente preocupação quanto à manutenção dos estoques naturais.

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). tiago.88@terra.com.br

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

³ Orientadora e docente do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. alessoli@cesumar.br

Nos estudos sobre o reconhecimento e identificação da diversidade existente na ictiofauna Neotropical estão sendo aplicados marcadores moleculares, buscando a preservação de unidades evolutivamente significativas para a manutenção da 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).

Assim este trabalho objetivou analisar o polimorfismo genético entre espécimes de *Hypostomus* através da técnica de amplificação rDNA 5S, e obter marcadores moleculares específicos para as diferentes espécies.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para este trabalho espécimes de *Hypostomus* já coletados na bacia do rio Ivaí entre os anos de 2007 e 2008, durante o desenvolvimento de outros projetos coordenados pela professora Alessandra Valéria de Oliveira. De cada espécime coletado foram retiradas amostras de tecido muscular, fixadas em álcool etílico comercial e estocadas em freezer -20 °C. Os espécimes analisados foram: 14 *Hypostomus sp.*, 2 *Hypostomus ancistroides*, 2 *Hypostomus regani*, 2 *Hypostomus albopunctatus*, 1 *Hypostomus sp2.*, 1 *Hypostomus hermanni*, 1 *Hypostomus cf. topavae*.

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* é ressuspenso em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com RNase. A quantificação foi realizada 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) 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/reação de Taq-polimerase e água suficiente para completar 13 µl. As concentrações e temperaturas recomendadas por GOES *et al.* (2009). Desta forma a concentração de DNA utilizada foi de 5ng e as seguintes temperaturas: 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.

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 feita em um transluminador sob luz UV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos têm enfatizado a aplicabilidade de marcadores moleculares para analisar a variabilidade e polimorfismo genético em peixes. Com o uso desta biotecnologia, pesquisas vêm estimando polimorfismo e a variabilidade genética de populações de *Hypostomus* da bacia do Rio Ivaí (Guedes et al., 2008).

Neste estudo foram analisados os padrões de bandas obtidos com a metodologia do rDNA 5S e foram levadas em consideração apenas as bandas de fácil visualização. O número de bandas nítidas geradas por esta técnica nos indivíduos analisados variou de duas a oito e o tamanho desses produtos amplificados permaneceu entre 100 e 2100 pares de bases (pb). Ao analisar os perfis eletroforéticos dos diferentes espécimes através da separação dos fragmentos de DNA, pôde-se observar a existência de bandas espécie-específicas, ou seja, fragmentos que estão presentes em indivíduos de uma única espécie e ausentes nos demais. Embora em vários casos os alelos não estivessem presentes em todos os indivíduos, alguns foram únicos para uma dada população.

Conforme evidenciado na Figura 1, um fragmento de DNA de aproximadamente 900pb é único dos espécimes de *Hypostomus regani*, assim como um fragmento de aproximadamente 800pb que é exclusivo da espécie *Hypostomus cf. topavae*.

Além desses fragmentos únicos encontrados em cada espécie, o estudo evidenciou marcadores que são compartilhados por alguns grupos, como, por exemplo, o fragmento de DNA de 850pb comum entre os espécimes de *Hypostomus sp2* e *Hypostomus hermani*. A presença dos mesmos marcadores em indivíduos de espécies diferentes indica a maior proximidade genética desses grupos.

O padrão de bandas gerado pela amplificação do DNA via rDNA 5S permite diferenciar espécimes de pelo menos 7 grupos distintos. GUEDES et al.(2008) utilizando marcadores moleculares ISSR em *Hypostomus* da bacia do rio Ivaí também obteve um alto grau de polimorfismo nos espécimes analisados. Neste trabalho, os fragmentos amplificados também constituíram marcadores estáveis e com pouca variação intraespecífica, sendo, portanto, uma poderosa técnica a ser utilizada na separação de espécies com problemas taxonômicos, como é o caso do gênero *Hypostomus*.

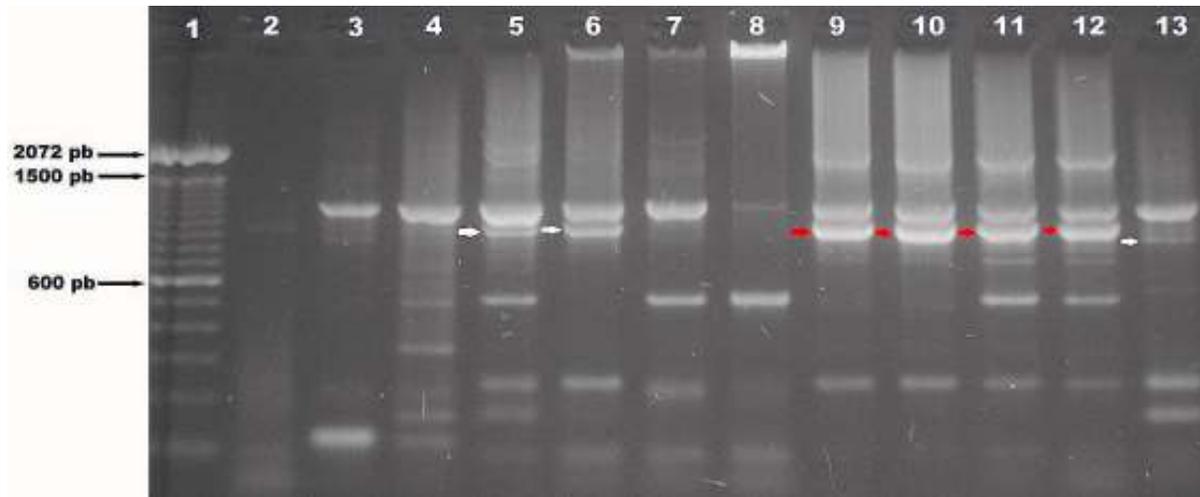


Figura 1: Fragmentos de DNA de *Hypostomus* amplificados com a técnica rDNA 5S. (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb. (2) Controle negativo da reação. (3 e 4) *Hypostomus ancistoides*. (5 e 6) *Hypostomus regani*. (7 e 8) *Hypostomus albopunctatus*. (9 e 10) *Hypostomus sp2*. (11 e 12) *Hypostomus hermani*. (13) *Hypostomus cf. topavae*. As setas brancas indicam a presença de lócus polimórfico entre os indivíduos. As setas vermelhas mostram um fragmento de DNA de 850pb comum entre os espécimes de *Hypostomus sp2* e *Hypostomus hermani*.

4 CONCLUSÃO

O uso da técnica rDNA 5S, utilizado neste trabalho, possibilitou evidenciar a variabilidade genética de populações de *Hypostomus* do rio Ivaí. A presença de marcadores moleculares diagnósticos evidenciou ao menos a presença de 7 grupos distintos de *Hypostomus* na região.

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, 1999. p. 374-400.

ARMBRUSTER, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v, 141, p. 1-80, 2004.

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.

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.

GUEDES, A. A. S.; BIMBATO, E. P.; OLIVEIRA, A. V.; DELARIVA, R. L.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P. Polimorfismo molecular em populações de *hypostomus* (siluriformes: loricariidae) do rio Ivaí. In: IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar, 2008. Maringá. **Anais eletrônicos...** Maringá, Cesumar, 2008.

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.

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.