

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

Paulo Roberto Nunes de Goes\*

Mariana Augusto Monteiro\*\*

Alessandra Valéria de Oliveira\*\*\*

Alignéia Aparecida de Souza Guedes\*\*\*\*

**RESUMO:** Os peixes são os vertebrados 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*, 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* que não apresentam um consenso em relação a sua taxonomia. As técnicas baseadas em marcadores moleculares têm sido utilizadas na identificação de espécies de peixes neotropicais, entre elas se destacando a técnica do rDNA 5S. 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*. Foi possível realizar a amplificação de fragmentos de DNA pela técnica de rDNA 5S para *Hypostomus*, 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 genética desta espécie através desses marcadores moleculares.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Hypostomus*; Identificação de Espécies; rDNA 5S.

## STANDARDIZATION OF AMPLIFICATION CONDITIONS FOR 5S rDNA TECHNIQUE TO OBTAIN SPECIES SPECIFIC MOLECULAR MARKERS IN *Hypostomus* POPULATIONS FROM THE IVAÍ RIVER

**ABSTRACT:** Fish are the most diverse vertebrates, with nearly 20,000 described species. Although freshwater fish make up between 20 and 25% of vertebrate biodiversity, between 30 and 40% of all the diversity in neotropical ichthyofauna has not been described. Since the family Loricariidae, particularly the genus *Hypostomus*, comprises great morphological similarity between the specimens, their identification and the establishment of phylogenetic relationships among species are complex. There is no taxonomic consensus on more than 16 species of *Hypostomus* in the Paraná river basin, including the Ivaí river. Molecular markers techniques, especially 5S rDNA, have been used in the identification of neotropical fish species. Current study standardizes optimal conditions for the amplification of 5S rDNA technique to obtain molecular markers that may be used to identify *Hypostomus* specimens. The amplification of DNA fragments from *Hypostomus* by 5S rDNA, using DNA in a concentration of 5ng and denaturing temperatures of 92°C, annealing at 40°C and extension at 72°C was achieved. Results show that the above technique may be used in future studies on genetic variability of this species using molecular markers.

**KEYWORDS:** *Hypostomus*; rDNA 5S; Species Identification.

\* Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária no Centro Universitário de Maringá – CESUMAR; Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Centro Universitário de Maringá – PROBIC / CESUMAR. E-mail: prngoies@uol.com.br

\*\* Acadêmica do Curso de Biomedicina no Departamento de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. E-mail: marianaa.monteiro@yahoo.com.br

\*\*\* Docente do Curso de Ciências Biológicas no Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. E-mail: alessoli@cesumar.br

\*\*\*\* Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM. E-mail: aligneia@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

Os peixes são os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2008), com aproximadamente 20.000 espécies descritas (LOWE-MCCONNELL, 1999). Os peixes de água doce são responsáveis por 20 a 25% da biodiversidade de vertebrados e há indícios de que somente na América do Sul ocorram mais de 8.000 espécies, tendo em vista apenas duas das diversas ordens descritas (Characiformes e Siluriformes) (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2008). Segundo Vari e Malabarba (1998), um percentual de 30 a 40% de toda a diversidade existente na ictiofauna neotropical até o momento não foi reconhecida. No entanto, 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; MENEZES; GHAZZI, 2006). Dentro desta família, particularmente no gênero *Hypostomus* 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* que não apresentam um consenso em relação a sua taxonomia, levando à necessidade de mais estudos para uma identificação específica (AGOSTINHO; JÚLIO JR., 1999). Embora a ictiofauna do Brasil seja uma das maiores do mundo em diversidade, a quantidade de estudos acerca 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 têm 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).

No final da década de 70, após a descoberta das enzimas de restrição, iniciaram-se os primeiros estudos com marcadores moleculares baseados em DNA. (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2008). Foi, no entanto, com o surgimento da técnica de PCR que os estudos na área de biologia molecular ganharam

considerável expressão (AVISE, 1994). Entre as técnicas de análise genética temos o rDNA 5S, que consiste de sequências que codificam o rRNA 5S e são separadas umas das outras por espaçadores não transcritos (NTS) (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). 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; GALETTI JUNIOR, 2001).

Estudos dessas sequências em diversos organismos evidenciaram que, predominantemente, as variações do rDNA 5S estão presentes nos NTSs e são caracterizadas como fruto de inserções, deleções, minirrepetições e pseudogenes nessas regiões que, por não estarem envolvidas diretamente na transcrição, não sofrem com as pressões de seleção e essas variações podem ser espécie-específica, sugerindo uma rápida evolução para estas sequências (SUZUKI; SAKURAI; MATSUDA, 1996).

O uso das repetições do rDNA 5S apresenta algumas vantagens sobre os demais marcadores disponíveis, pois a presença de sequências 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).

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* 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* (Figura 1), *Hypostomus regani* (Figura 2) e *Hypostomus* sp2 (Figura 3) que foram coletados no rio Ivaí no período de 2007 a 2008.

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.



Figura 1 Exemplar da espécie *Hypostomus ancistroides* coletado no rio Ivaí no período de 2007 a 2008.



Figura 2 Exemplar da espécie *Hypostomus regani* coletado no rio Ivaí no período de 2007 a 2008.



Figura 3 Exemplar da espécie *Hypostomus* sp2 coletado no rio Ivaí no período de 2007 a 2008.

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 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. Posterior-

mente, 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. 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 e colaboradores (1995). Além destes também foram utilizados tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM), MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reacção de Taq-polimerase e água suficiente para completar 13 ml. Foram testadas diversas concentrações de DNA genômico (5ng, 10ng, 15 ng e 20ng) na reacção, 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 Ultra Violeta (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 4).

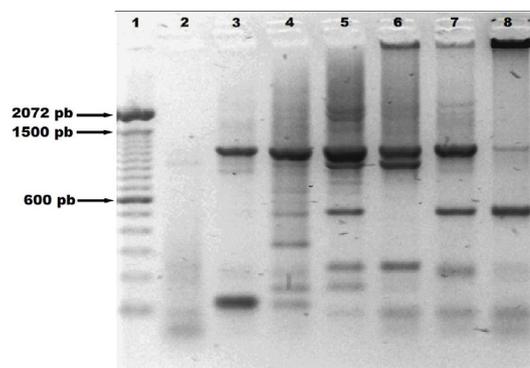


Figura 4 Fragmentos de DNA de *Hypostomus* amplificados com a técnica rDNA 5S. (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb; (2) Controle negativo da reação. (3 e 4) *Hypostomus ancistroides*; (5 e 6) *Hypostomus regani*; (7 e 8) *Hypostomus* sp2.

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. 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 4. Resultados similares foram obtidos por Avanzi, Castro e Oliveira (2008) e Oliveira e colaboradores (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, tampouco foram analisadas diferenças nos padrões de bandas entre as espécies. 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 e colaboradores (2008) e por Pendás e colaboradores (1995) para amplificação de DNA de outras espécies de peixes.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho foi possível estabelecer as condições ideais de amplificação da técnica rDNA 5S, utilizando o DNA de espécimes de *Hypostomus*. A utilização desta técnica de amplificação rDNA 5S constituirá uma importante ferramenta para a identificação da diversidade deste grupo, o que contribuirá para o manejo visando à preservação dos estoques naturais destas espécies. Os marcadores moleculares são ferramentas indispensáveis onde a identificação de espécies com base em características morfológicas e citogenéticas é impossível, bem como na separação de populações próximas geograficamente.

#### 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 de Anna Emília Vazzoler, Angelo Antônio Agostinho e Patrícia Cunningham. São Paulo, SP: 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: MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO CESUMAR, 4., 2008. Maringá. **Anais Eletrônicos...** Disponível em: <[http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/qua\\_mostra\\_inic\\_cient.php](http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/qua_mostra_inic_cient.php)>. Acesso em: 26 maio 2008.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York: Chapman and Hall, 1994.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 2006, Londrina. **Anais...** Londrina, PR: UEL/Unifil/SBG, 2006. CD-ROM.
- CÉSPEDES, A. et al. Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius 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, SP: 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. et al. 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. et al. 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. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S.; MATSUDA, Y. Rat 5S rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenet Cell Genetic**, v. 72, p. 1-4, 1996.

TORRES, R. A.; MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F. Genética de Peixes Neotropicais. II. Biologia Molecular de Peixes Neotropicais. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v. 10, n. 2, p. 27-37, jun. 2004. Disponível em: <[http://www.uepg.br/prosp/publicatio/bio/2004\\_2/03.pdf](http://www.uepg.br/prosp/publicatio/bio/2004_2/03.pdf)>. Acesso em: 26 maio 2008.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: An Overview. In: MALABARBA, L. R. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, RS: EDIPUCRS, 1998. p. 604.

Recebido em: 22 Janeiro 2010

Aceito em: 24 Março 2011