

DESENVOLVIMENTO DE *PRIMERS* DA REGIÃO D-LOOP PARA AS ESPÉCIES AMEAÇADAS *BRYCON OPALINUS*, *B. INSIGNIS* E *STEINDACHNERIDION PARAHYBAE* PARA ESTUDOS GENÉTICOS POPULACIONAIS

Tamara Regina França da Cruz¹; Alexandre Wagner S. Hilsdorf²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: tamarafcruz@hotmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br²

Área do Conhecimento: Genética de conservação

Palavras-chave: *Brycon opalinus*; *B. insignis*; *Steindachneridion parahybae*; D-loop; *primers*

INTRODUÇÃO

Nos ambientes aquáticos modificações extremas tem sido verificadas pelas construções de barragens para a implantação de hidroelétricas, a introdução de espécies exóticas e nativas, as atividades agrícolas e a poluição. Esses impactos ambientais resultam na perda da diversidade genética implicando em danos consideráveis sobre ecossistemas terrestres e aquáticos (BRUTON, 1995). A habilidade de adaptação e resposta às frequentes mudanças ambientais é devido à diversidade biológica. Um dos pontos centrais para o planejamento de medidas de conservação da biodiversidade aquática é o entendimento da estrutura populacional da espécie para que se determinem tanto as respostas fisiológicas às variações ambientais como as estratégias de manejo das populações naturais (DANZMANN *et al.*, 1991). A Instrução Normativa 05, referente a maio de 2004, do Ministério do Meio Ambiente cita 159 espécies de peixes ameaçados sendo 135 peixes de água doce e 24 marinhos. Os peixes de água doce da categoria de ameaçados de extinção representam cerca de 5,9% das espécies de peixes conhecidas em nossa fauna, porém, ainda existem dúvidas sobre a extensão deste número (ROSA & LIMA, 2008). Compreendidas entre a foz do rio São Francisco e o norte do Estado de Santa Catarina, as bacias do Leste brasileiro, formam a região de endemismo com maior número de espécies ameaçadas, 59 espécies (ROSA & LIMA, 2008). Isto ocorre devido à grande extensão territorial desta área, e, sobretudo, ao alto grau de deterioração ambiental (desmatamento, assoreamento, poluição e construção de hidrelétricas) encontrado na região, juntamente com o nível de endemismo marcante de sua ictiofauna (ROSA & LIMA, 2008). Peixes de médio a grande porte como, o piau (*Leporinus thayeri*), as piabanhas (*Brycon insignis* e *Brycon devillei*), a vermelha (*Brycon vermelha*), o andirá (*Hemichilus wheatlandii*), os cascudos (*Pogonopoma parahybae* e *Delturus parahybae*), e peracuca (*Kalyptodoras bahiensis*) e o surubim (*Steindachneridion* spp.) habitam os maiores rios do Leste brasileiro, o Paraíba do Sul, Doce, Mucuri, Jequitinhonha e Paraguaçu (ROSA & LIMA, 2008). Na década de 50, o rio Paraíba do Sul e seus afluentes foram considerados um dos mais piscosos do Estado de São Paulo. Apesar da grande diversidade de peixes, poucos são aqueles capturados em maior volume e com valor comercial, entre eles podemos relatar principalmente: a piabanha (*Brycon insignis*), piavas (*Leporinus* sp), surubim-do-paráiba (*Steindachneridion parahybae*) piapara (*Leporinus* sp) e o robalo (*Centropomus* sp) (MACHADO & ABREU, 1952). No rio Paraíba do Sul são encontradas 12 espécies exóticas, como dourado (*Salminus brasiliensis*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*),

mandi-guaçu (*Pimelodus maculatus*) e 115 espécies nativas como lambari (*Astyanax* sp), piabanha (*Brycon insignis*), curimatá (*Prochilodus* sp), bagre (*Rhamdia parahybae*) e a pirapitinga-do-sul (*Brycon opalinus*) (ROSA & LIMA, 2008). A variabilidade do DNA mitocondrial tem sido utilizada no estudo genético populacional de peixes de água doce neotropicais. O interesse do uso desta molécula para estudos populacionais e evolutivos se deve ao fato de apresentar herança citoplasmática, isto é, ser herdada via materna, de modo que não segue os padrões de segregação mendelianos e não sofre recombinações. Essa herança materna possibilita esboçar uma genealogia materna ou mesmo uma filogenia materna, o que pode facilitar a compreensão do modo de dispersão de muitos organismos, acasalamentos preferenciais entre outros. Nesta molécula existe uma região não codificadora conhecida como D-loop que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma e é a parte mais variável do genoma mitocondrial (ARIAS & INFANTE-MALACHIAS, 2001).

OBJETIVOS

O projeto em questão objetiva o desenvolvimento de *primers* da região do mtDNA D-loop para avaliação da diversidade genética intra e interpopulacional das espécies ameaçadas: pirapitinga do sul (*Brycon opalinus*), piabanha (*B. insignis*) e surubim do paraíba (*Steindachneridion parahybae*) para estudos genéticos populacionais.

METODOLOGIA

As populações selvagens da pirapitinga do sul, piabanha e o surubim-do-paraíba serão mapeados e os indivíduos serão coletados vivos e encaminhados a Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna da Companhia Energética de São Paulo (CESP) para constituírem o banco de germoplasma da espécie. Uma vez na Estação todos os animais foram marcados e amostras de tecido da nadadeira caudal foram retiradas sem sacrifício dos mesmos. As amostras foram armazenadas em etanol 95% e estocadas a -20°C no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura, do Núcleo Integrado de Biotecnologia, localizado na Universidade de Mogi das Cruzes, onde todos os procedimentos laboratoriais foram realizados. A extração do DNA total foi realizada de acordo com protocolo fenol-clorofórmio. Posteriormente a quantidade de DNA das amostras foram medidas no NanoDrop®, em nanogramas por microlitro e foi realizada eletroforese em gel de agarose à 1%, corado em brometo de etídio por 15 minutos e posteriormente revelado em luz UV no fotodocumentador GE Image Quant 300®. Reações de amplificação com diferentes temperaturas e concentrações dos reagentes foram testadas para padronização das condições ótimas de amplificação da região do DNA mitocondrial a ser analisado. Dentre os produtos de amplificação gerados, a banda de aproximadamente 1.200 pb foi cortada do gel de agarose e purificada utilizando-se o Kit “GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification” (*GE Healthcare*). As amostras purificadas foram sequenciadas utilizando o kit BigDye v.3 (*Applied Biosystems*). Posteriormente, cada fragmento obtido foi clonado no vetor pGEM-T (*Promega*) para sequenciar integralmente a região do D-loop.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA total das amostras foi quantificada e resultou em quantidade significativa de material genômico das amostras (de 28,1 a 3.813,5 ng/μL). As eletroforeses mostraram arrastes significativos em algumas amostras provavelmente devido ao tipo de material (nadadeira) em que foi extraído o DNA. Em seguida foram feitas diversas reações de PCR com diferentes combinações de condições, com a finalidade de testar os *primers* existentes no laboratório para amplificar a região de D-

loop. As reações foram realizadas com os pares de *primers* L2910 + H3010, D-Loop 2R + D-Loop 2F e L15560 + H1067 testando as concentrações do material genético, cloreto de magnésio e do *primer*, as temperaturas de anelamento também foram avaliadas. Como primeiramente não houve a amplificação desejada, foi estabelecido o a necessidade de desenvolver novos *primers* de caráter universal, isto é, não específico e abrangendo diversas espécies de peixes. Para isso, foram selecionadas as regiões que abrangem as extremidades do citocromo *b* (*cyt b*) e a região 12S, os quais flanqueiam a região de D-loop. Foi realizada uma busca no GenBank[®] por registros de sequências das regiões do citocromo *b* e 12S, principalmente para peixes neotropicais das ordens Characiformes, Cypriniformes e Siluriformes. A partir do alinhamento foi desenvolvido um *primer forward* degenerado para *cyt b*: D-loop(LGPA)-F 5' - CCM TTY ATC RTY ATC GGI CA - 3'. Já a região de 12S apresentou-se altamente conservada não necessitando assim da troca de bases formando a sequência: D-loop(LGPA)-R 5' - GCC TGT TCT AGA ACC GAT AA - 3'. Os testes com os *primers* universais não obteve sucesso, portanto foram retomados os testes com o par L2910+H3010, porém com uma nova abordagem: diminuição da temperatura de anelamento (48°C) e a clonagem do fragmento de interesse. A partir desse resultado a banda de aproximadamente 1.200 pb foi cortada do gel de agarose e purificada utilizando-se o Kit "GFX[™] PCR DNA e Gel Band Purification" (*GE Healthcare*). As amostras purificadas foram sequenciadas utilizando o kit BigDye v.3 (*Applied Biosystems*). Posteriormente, cada fragmento obtido foi clonado no vetor pGEM-T (*Promega*) para sequenciar integralmente a região do D-loop. Utilizando-se os *primers* T7 e SP6 do vetor pGEM-T foi possível desenhar *primers* nas regiões 12s e RNAt da treonina específicos de cada uma das espécies.

CONCLUSÕES

A metodologia adotada para a extração de DNA total contido na nadadeira caudal dos espécimes foi bem sucedida visto que as eletroforeses realizadas indicaram a presença de material genômico com alto peso molecular. As reações de amplificação indicaram que não será possível obter integralmente a região desejada sem fazer o uso da tecnologia da clonagem. O sequenciamento completo da região de interesse possibilitará em trabalhos futuros avaliar a variabilidade genética de populações selvagens de *Brycon opalinus*, *Brycon insignis* e *Steindachneridion parahybae* baseado no polimorfismo da região de controle de transcrição (D-loop) do DNA mitocondrial para o posterior estabelecimento do banco de germoplasma *ex situ* dessas espécies ameaçadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, M.C.; INFANTE- MALACHIAS, M.E. RFLP: **O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA**. Ed. Holos. In: MATIOLI, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. 1 ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

BRUTON, M.N. Have fishes had their chips? The dilemma of threatened fishes. **Environmental Biology of Fishes** v.43, p.1-27, 1995.

DANZMANN, R G; IHSEN, P E & HEBERT, P N D. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook charr, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. **Journal of Fish Biology**. v.39 (supplement A), p.69-77, 1991.

MACHADO, C E & ABREU, H C F. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no estado de São Paulo - I, A Pesca no Vale do Paraíba. **Boletim de Industrial Animal - SP**, v13, p.145-160, 1952.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. *In*: MACHADO, A. B.M., DRUMMOND, A. M., PAGLIA, A. P (eds). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1º ed, v. 2, Fundação Biodiversitas, 2008.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CESP-Paraibuna e Faep pela concessão da bolsa, a UMC pela infraestrutura cedida e aos alunos, funcionários e pesquisadores do Núcleo Integrado de Biotecnologia.