

DESENVOLVIMENTO DE PRIMER UNIVERSAIS DA REGIÃO D-LOOP DO DNA MITOCONDRIAL EM ESPÉCIES DO GÊNERO BRYCON PARA ESTUDOS GENÉTICOS POPULACIONAIS

Karina Silva Rezende Prado¹; Juliana Beltramin De Biasi²;
Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; email: karina_silvaprado@hotmail.com 1
Co-orientadora Universidade de Mogi das Cruzes; email: jubbiasi@gmail.com 2
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; email: wagner@umc.br 3

Área do Conhecimento: Biotecnologia aplicada a recursos naturais e agronegócios

Palavras-chave: Brycon; D-loop; DNA mitocondrial

INTRODUÇÃO

Segundo Ferreira et al. (1996), o gênero *Brycon* tem importância para a pesca artesanal em diversas regiões no Brasil, identificaram as espécies presentes em mercados e indústrias pesqueiras na cidade de Santarém, no estado do Pará, algumas são para pesca regional, no presente momento espécies com risco de extinção devido a construção de barragens hidrelétricas, da poluição e do desmatamento ciliar (Senhorini, 1999).

Os estudos genéticos com marcadores moleculares em peixes neotropicais são importantes para entender os processos de diferenciação populacional e medir os níveis de variabilidade genética dentro e entre populações (Oliveira et al., 2009).

Segundo Mefee e Carroll (1994) o uso da genética na área de conservação biológica: a perda da diversidade genética reduz a ocorrência de futuras mudanças evolutivas, a heterozigotidade ou alta variabilidade genética intrapopulacional tem relação benéfica com a adaptação e o *pool* gênico representa toda a informação genética disponível nos organismos vivos.

A região do DNA mitocondrial utilizada para estudos populacionais é a região D-loop, na qual se encontram as sequências que controlam os processos de replicação e transcrição do genoma mitocondrial (Nahum, 2001). Segundo Lee et AL. (1995) está é a região mais indicada para estudos populacionais em peixes, pois possui alta variabilidade intraespecífica, a análise de base por base da região controle pode fornecer mais informações sobre a estrutura populacional e contém mais informações filogenéticas que o citocromo b (Meyer, 1994).

OBJETIVOS

Geral

Desenvolvimento de primers universais para espécies do gênero *Brycon*.

Específicos

Fase 1: Testar iniciadores para D-loop para produzir amplicons em diferentes espécies do gênero *Brycon*;

Fase 2: Isolar e purificar os amplicons produzidos;

Fase 3: Clonagem dos amplicons;

Fase 4: Sequenciamento dos amplicons clonados

Fase 5: Alinhamento e análise das regiões D-loop

METODOLOGIA

A extração do DNA foi realizada com o kit da extração NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), conforme instruções do fabricante. A integridade e concentração de DNA foram avaliadas por comparação com o marcador molecular *Low DNA Mass* (Invitrogen) em gel de agarose. Os amplicons foram purificados para sequenciamento objetivando confirmação da região em estudo para posterior clonagem. A clonagem foi realizada segundo o protocolo Promega, que possibilita a união de fragmentos de DNA oriundos da reação de PCR são misturados ao vetor linearizado juntamente com a enzima T4 DNA ligase, a qual permite a ligação entre eles, gerando uma molécula de DNA plasmidial contendo o gene de interesse, esse plasmídeo é inserido dentro de uma bactéria por transformação e então é replicado. (Brown, 2003).

RESULTADOS

Os parâmetros avaliados foram reprodutibilidade, intensidade e uniformidade das bandas obtidas, tais parâmetros não puderam ser aplicados a todos os indivíduos das espécies amostradas dificultando o estudo e atrasando a obtenção de resultados.

Foram executados testes com diversos primers e em diversas condições, e o resultado foi obtido com os *primers* F Cltb e R-Phe e H16498 e L, FTHR e F- Phe e FTTF e F12R.

A qualidade das sequências obtidas foram avaliadas usando o programa CodonCodeAligner 1.4.1. Foi constatado que as sequências não estavam apropriadas devido a grande quantidade de ampliações inespecíficas que causaram interferências na leitura das bases nucleotídicas. Com isso apenas 43 bases foram consideradas confiáveis e por meio do programa Blast implementado no site do NCBI foi possível verificar que esta pequena região obtida se identifica à região controle do peixe *Xiphophorus hellerii*, popularmente conhecido como espada, assim, considerou-se que as regiões amplificadas, mesmo de forma inespecífica, estão presentes na região alvo mencionada pelo estudo.

Foram clonadas 5 amostras seguindo o protocolo Promega, que tem como função unir os fragmentos de DNA oriundos da reação de PCR são misturados ao vetor linearizado juntamente com a enzima T4 DNA ligase, a qual permite a ligação entre eles, gerando uma molécula de DNA plasmidial, contendo o gene de interesse. Este plasmídeo é inserido dentro de uma bactéria por transformação e, então, ser replicado (Brown, 2003). Os resultados da clonagem não foram satisfatórios, pois problemas com o eletroporador foram observados relativos aos parâmetros, tais como capacitância, intensidade e duração do pulso elétrico que apresentaram alterações não possibilitando a inserção do plasmídeo nas bactérias competentes.

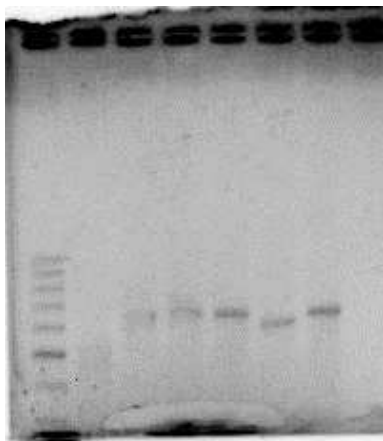


Figura 1: primeira canaleta esta o marcador low, sendo seguido das amostras de *B. pesu*, *B. natere*, *B. sp.*, *B. orbiganyanus*, *B. hilarii*, *B. falcatus* e *B. opalinus*. Gerando entre 700 e 800 pares de base. Podendo ser visto que a amostra de *Brycon pesu* não foi amplificada nessa condição.

CONCLUSÕES

A importância do presente projeto ecológica e econômica para pesquisas futuras com peixes deste gênero. Até o presente momento, foram realizados testes com primers diversos para D-loop com a geração com sucesso de amplicons para 5 espécies do gênero *Brycon*. A obtenção das sequências completas da região do D-loop para as 5 espécies será realizada com a clonagem dos amplicons obtidos na próxima etapa do trabalho. Uma vez obtidas sequências de qualidade, será conduzido o alinhamento e avaliação das regiões conservadas para geração de *primers* que possibilitem a amplificação inequívoca da região do D-loop mitocondrial das 5 espécies do gênero *Brycon*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brown, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376p.
- Chiari, L.; Sodr , L. M. K. **Genetic variability in five species of anoostomidae (Ostariophysi – Characiformes)**. Genetics and molecular Biology, v. 22, p. 517-523, 1999.
- Ferreira et al., 1996 E.J.G. Ferreira, J. Zuanon, G.M. Santos **A list of commercial fish species from Santar m**, State of Par , Brazil NAGA-The ICLARM Quarterly, 19 (1996), pp. 41–44.
- Lee WJ, Coroy J, Howell WH, Kocher TD (1995) **Structure and evolution of fish mitochondrial control regions**. J Mol Evol 41:54–66
- Meyer, A. DNA technology and phylogeny of fish. In: Beaumont, A. R. (Ed.). **Genetics and evolution of aquatic organisms**. London: Chapman & Hall, p. 219-249. 1994.
- Meyer, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: **Hochachka and Mommsen, Biochemistry and molecular biology of fishes**, vol.2. Elsevier, 1993.
- Nahum, L.A. Evolu o dos Genomas. In: **Matioli, Biologia Molecular e Evolu o. Ribeir o Preto: Holos Ed., 2001**
- Oliveira, C.: Foresti, F.; Hisdorf, A.W.S. **Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations**. Fish Physiol Biochem, v.35,n.81,p.100,2009
- Senhorini, J. A. **Biologia larval do matrinx  Bryconcephalus (Gunther,1869) e do Piracanjuba Brycon orbignyanus**.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UMC pela bolsa de inicia o cient fica concedida e as funda es FAPESP (Fundau o de Amparo   Pesquisa do Estado de S o Paulo) e FAEP (Fundau o de Amparo ao Ensino e Pesquisa) pelo aux lio financeiro ao projeto.