

DESENVOLVIMENTO DE *PRIMERS* UNIVERSAIS DA REGIÃO D-LOOP DO DNA MITOCONDRIAL EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon* PARA ESTUDOS GENÉTICOS POPULACIONAIS

Karina Silva Rezende Prado¹; Jussara Oliveira Vaini²; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: karina_silvaprado@hotmail.com¹

Estudante de Pós-graduação em Biotecnologia; e-mail: jussaravaini@hotmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br³

Área do conhecimento: Biotecnologia

Palavras-chave: *Brycon*, DNA mitocondrial, D-loop, Peixe, *Primers*

INTRODUÇÃO

Grande parte das espécies do gênero *Brycon* possuem uma carne de excelente qualidade e são bastante apreciadas pela pesca esportiva e pela aquicultura (MURGAS *et al.*, 2003). Espécies como *B. cephalus*, *B. orbignyanus*, *B. opalinus*, *B. ferox*, *B. pesu*, *B. falcatus*, *B. nattereri*, *B. lundii* e *B. hilaarii* encontram-se ameaçadas devido a fragmentação ambiental, perda da vegetação ripariana (margens de rios) e construção de barragens hidrelétricas que interferem diretamente na manutenção e sobrevivência das populações (MACHADO *et al.*, 2008; REYS *et al.*, 2009). Fragmentação populacional causada por atividades antrópicas podem acarretar alterações sobre a comunidades de peixes desde o desaparecimento de espécies até a perda da variabilidade genética de populações (LÉVÊQUE *et al.*, 2008). A conservação da variabilidade genética das populações de peixes ou outros organismos aquáticos é, portanto, uma etapa fundamental para manutenção da viabilidade destas populações a médio e longo prazo (FAO; LEBERG, 1990). Quanto maior a diversidade genética maiores serão as chances de sobrevivência da espécie (SOLÉ-CAVA, 2001; FRANKHAM *et al.*, 2002), desta forma, o uso de marcadores são de extrema importância para realizar acasalamentos direcionados e manter ou aumentar essa variabilidade. A região do DNA mitocondrial recomendada para estudos populacionais é a chamada região não codificadora conhecida como “alça D” (em inglês: 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) esta 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.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver *primers* universais para a região D-loop do DNAm, em espécies do gênero *Brycon*, a fim de fornecer subsídio para futuros estudos genéticos populacionais.

METODOLOGIA

Extraiu-se DNA total de fragmentos de tecido de 13 espécies de peixes do gênero *Brycon* (*Brycon*: *Brycon insignis*, *Brycon alburnus*, *Brycon moorei*, *Brycon melanopterus*, *Brycon dentex*, *Brycon falcatus*, *Brycon opalinus*, *Brycon orbygianus*, *Brycon amazonicus*, *Brycon ferox*, *Brycon nattereri*, *Brycon hilaarii*, *Brycon pesu*). Posteriormente realizou-se reação de PCR com *primers* universais desenhados para outras espécies de peixes (L15560 e H1067, L e H16498, LGPA-F e LGPA-R) a fim de amplificar a região D-loop. Esse produto de PCR gerado foi sequenciado no Centro de Genoma Humano da USP. Com as sequências retirou-se consenso para desenhar os *primers* universais externos e internos para *Brycon*. Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa Primer 3 e IDT. Realizou-se teste de gradiente com os

primers desenhados (interno e externo) e com as melhores condições foram realizadas reações de PCR com todas as amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do DNA foi eficiente. Os *primers* universais externos foram eficientes, amplificando em todas as amostras analisadas, ou seja, nas 13 espécies do gênero *Brycon*: *Brycon insignis*, *Brycon alburnos*, *Brycon moorei*, *Brycon melanopterus*, *Brycon dentex*, *Brycon falcatus*, *Brycon opalinus*, *Brycon orbygianus*, *Brycon amazonicus*, *Brycon ferox*, *Brycon nattereri*, *Brycon hilary*, *Brycon pesu* (Tabela 1). A melhor temperatura de anelamento foi a de 56°C e a concentração de MgCl₂ foi de 1,5mM. O *amplicon* gerado variou entre 500 – 700pb (Figura 1). Já na reação de PCR com os *primers* universais internos, a amplificação não foi tão eficiente, amplificando somente em 8 das 13 espécies de *Brycon*: *Brycon insignis*, *Brycon alburnos*, *Brycon moorei*, *Brycon melanopterus*, *Brycon dentex*, *Brycon falcatus*, *Brycon opalinus* (Tabela 1). O *amplicon* gerado variou de 400 -500 pb (Figura 1).

Tabela 1. Descrição dos *primers* universais externos e internos; Temperatura de anelamento (Ta) em °C; Tamanho do fragmento em pares de bases (pb).

Primer	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Tamanho (pb)
BRYDLFE1	F: TTARAATCCYCCCTAGCGCC	56°C	600 – 700
BRYDLRE2	R: GTAAGAGACCACCAACCAGTAT		
BRYDLF3	F: TGTGATGGAGGTATGGGGATT	56°C	400-500
BRYDLR4	R: TTGTGATGGAGGTATGGGGA		

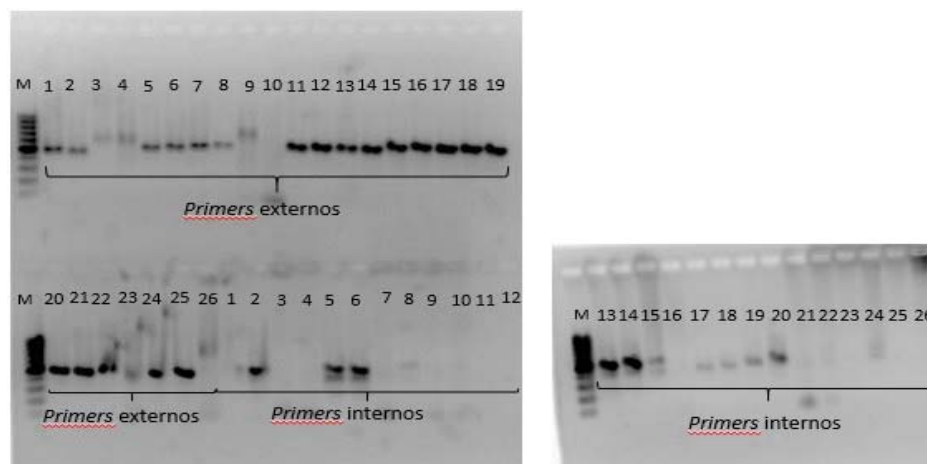


Figura 1. Gel de agarose 2%, das amostras: *Brycon insignis* (1, 2), *Brycon alburnos* (3, 4), *Brycon moorei* (5, 6), *Brycon melanopterus* (7, 8), *Brycon dentex* (9, 10), *Brycon falcatus* (11, 12), *Brycon opalinus* (13, 14), *Brycon orbignyianus* (15, 16), *Brycon amazonicus* (17, 18), *Brycon ferox* (19, 20), *Brycon nattereri* (21, 22), *Brycon hilarii* (23, 24), *Brycon pesu* (25, 26).

CONCLUSÕES

Até o momento não havia nenhum *primer* que amplificasse a região D-loop de *Brycon*, fato este que pode explicar a falta de estudos genéticos com espécies desse gênero. Os *primers* universais externos e internos desenvolvidos foram eficientes, sendo assim, essa pesquisa serve de base para futuras pesquisas de diversidade genética, estrutura populacional e filogenia das espécies do gênero *Brycon*, os quais apresentam importante valor econômico e ecológico em seus locais de ocorrência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Text by Jean Francois Pulvenis. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome. (<http://www.fao.org/fishery/sofia/en>), março, 2009.
- FRANKHAM, R; BALLOU, J.D. E BRISCOE, D.A. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge: Journal of insert conservation, v. 8, p.617. 2002.
- LEBERG, P. L. Influence of genetic variability on population growth: implications for conservation. Journal of Fish Biology, v. 37, p. 193-195, 1990.
- LEE WJ, COROY J, HOWELL WH, KOCHER TD. Structure and evolution of fish mitochondrial control regions. J Mol Evol 41:54–66, 1995.
- LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J. & TEDESCO, P.A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. Hydrobiologia, v. 595, p. 545-567, 2008.
- MACHADO, A. B. M; DRUMMOND, G. M. & PAGLIA, A. P. (eds) Livro vermelho da fauna Brasileira Ameaçada de extinção. v. II. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, p. 906, 2008.
- MURGAS, L.D.S., Franciscatto, R.T. santos, A.G.O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanys*, Valenciennes , 1849). Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n 6, p. 1810-1814, 2003
- NAHUM, L.A. Evolução dos Genomas. In: Matioli, Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos Ed., 2001
- REYS, P.; SABINO, J. & GALETTI, M. 2009. Frugivory by the fish *Brycon hilarii* (Characidae) in western Brazil. Acta Oecologica. v. 35, n.1, p.136-141, 2009.
- SOLE-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli SR (ed) Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos, , p. 173-192. 2001.