



ANÁLISE GENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Hypostomus* sp. DO RIO IVAÍ, ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES ISSR

Natascha Karoline Castro¹; Valéria Miranda Avanzi; Alignéia Aparecida de Souza Guedes; Alessandra Valéria de Oliveira³

RESUMO: Os Loricariidae, da ordem Siluriforme, constituem a segunda maior família de peixes neotropicais em número de espécies, sendo *Hypostomus* o gênero mais especioso. Conhecidos como cascudos, possuem ampla distribuição e diversidade biológica e são considerados animais de acentuada importância ambiental. Sua ampla variação intraespecífica na morfologia e no padrão de coloração são problemas que dificultam a identificação de espécies. Na bacia do rio Ivaí há mais de 16 espécies do gênero sem uma correta identificação, o que se torna pré-requisito fundamental para estudos ecológicos e para elaboração de estratégias de manejo para essas espécies. Este trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente a população de *Hypostomus* sp. do rio Ivaí. Foram coletados exemplares do gênero *Hypostomus* em pontos distintos do rio, no período de agosto de 2008 a março de 2009. De cada exemplar coletado foram retiradas amostras de tecido muscular, que posteriormente foram fixadas em álcool etílico comercial e estocadas em freezer a -20°C. A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio. Cada um dos indivíduos teve seu DNA submetido à amplificação em um termociclador, que foi realizada via ISSR, com uso de *primers* com seqüências de microssatélites. A visualização foi feita em um transluminador sob luz UV e a análise foi realizada pelo registro dos comprimentos, em pb, das bandas produzidas. Observou-se uma baixa variabilidade genética intrapopulacional para *Hypostomus* sp., o que pode ser evidenciado pela baixa porcentagem de lócus polimórficos encontrados.

PALAVRAS-CHAVE: *Hypostomus* sp.; ISSR; rio Ivaí.

INTRODUÇÃO

Os peixes constituem um grupo extremamente favorável para estudo de variabilidade genética e evolução dentre os vertebrados (NELSON, 1984). A sua ampla variedade de espécies pode ser explicada pelo fato de os peixes apresentarem um grupo de animais primitivos altamente heterogêneos, submetidos a processos evolutivos em diferentes direções (KIRPICHNIKOV, 1981).

Os Loricariidae, da ordem Siluriformes, conhecidos popularmente como cascudos, constituem a sexta maior família de peixes do mundo (Nelson, 1984) e a segunda maior do Neotrópico, com o maior número de espécies válidas (673) e 300 espécies não descritas. Esta família encontra-se subdividida em seis subfamílias. Na subfamília Hypostominae existem muitas espécies com status ainda não bem definido, devido principalmente a uma ampla variação intraespecífica na morfologia e no padrão de coloração, como ocorre no gênero *Hypostomus* (Weber, 2003). De acordo com Reis et al. (2003), a alta variabilidade interespecífica na morfologia e o padrão de cores desse grupo, fizeram com que alguns autores descrevessem novos táxons devido à interpretação errada desta variabilidade.

No rio Ivaí têm sido encontrados vários espécimes de *Hypostomus* ainda não identificados (*Hypostomus* sp.). A correta identificação desses espécimes, bem como estudos de variabilidade genética desse grupo são muito importantes e têm o intuito de

gerar dados que possam subsidiar estratégias de manejo e conservação na região. Várias metodologias baseadas em marcadores moleculares têm sido úteis nas questões envolvendo estimativas de variabilidade genética em populações naturais.

A técnica conhecida como *Single Primers Amplifications Reactions* (SPAR) ou *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), tem gerado marcadores moleculares efetivos em plantas e animais (GUPTA *et al.*, 1994). Ela se baseia na amplificação via PCR e com o emprego de um único *primer* com a seqüência repetitiva de um microssatélite. Os *primers* SPAR com seqüências tetranucleotídicas constituem marcadores estáveis, mostrando serem eficientes na produção de padrões polimórficos informativos intraespecíficos (GUPTA *et al.*, 1994) e interespecíficos (FERNANDES-MATIOLI, 1999), uma vez que amplificam regiões que se encontram entre dois blocos de microssatélites. Esses fragmentos amplificados constituem marcadores estáveis e com pouca variação intraespecífica, enquanto são freqüentemente encontrados polimorfismos interespecíficos, produzindo marcadores espécie-específicos, sendo amplamente utilizados na separação de espécies com problemas taxonômicos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de populações de *Hypostomus* sp. do rio Ivaí, através de marcadores moleculares ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados exemplares de *Hypostomus* sp. no rio Ivaí, no período de agosto de 2008 a março de 2009. 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.

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* foi ressuscitado em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com RNase. Realizou-se a quantificação através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, por meio de comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

Todos os indivíduos tiveram seu DNA submetido à amplificação em um termociclador, utilizando *primers* com seqüências repetitivas de microssatélites. Além dos *primers*, 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 ultra-pura suficiente para completar 13 µl.

Na amplificação o DNA do organismo foi submetido a uma seqüência de nove etapas, incluídas em 33 ciclos sucessivos, sendo que em cada ciclo, inicialmente o DNA foi desnaturado a temperatura de 94^oC, depois a temperatura permaneceu em 52^oC, onde se permitiu o anelamento do *primer* em regiões homólogas encontradas no genoma. A elevação da temperatura para 72^oC permitiu a atuação da Taq-polimerase e a síntese de polinucleotídeo complementar a uma das fitas da região intermediária entre dois sítios de anelamento do *primer* localizados em fitas opostas. A amplificação ocorreu em ordem exponencial e durou cerca de três horas. Para separação dos fragmentos de DNA foi utilizado gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídio. A visualização foi feita em um transiluminador sob luz UV. A análise foi realizada pelo registro dos comprimentos, em pares de base (pb) das bandas produzidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários trabalhos têm enfatizado a aplicabilidade dos marcadores ISSR para estudos de variabilidade genética em peixes, pela sua eficiência em detectar polimorfismos intra e interpopulacionais (LUCIO, 2002; PANARARI, 2002; ALMEIDA, 2005). Na técnica ISSR, o *primer* é constituído por uma seqüência tetranucleotídica repetitiva, que amplifica regiões que se encontram entre dois locos de microsatélite.

No presente trabalho foram realizados testes com *primers* com seqüências de microsatélites e analisados os padrões de bandas obtidos para 20 exemplares de *Hypostomus* sp. Os *primers* testados para serem utilizados na amplificação do DNA de todos os indivíduos coletados foram: (CCTA)₄, (GGAC)₄, (TGTC)₄, (AAGC)₄, (GGAC)₃A, (GGAC)₃T e (GGAC)₃C. No entanto apenas os *primers* (GGAC)₃C, (GGAC)₄, (GGAC)₃A e (GGAC)₃T produziram bandas nítidas e reproduzíveis, ou seja, foram levadas em consideração apenas aquelas bandas de fácil visualização e que se repetem nos mesmos indivíduos se as condições de amplificação não forem alteradas.

O número de bandas nítidas geradas por *primer* em todos os indivíduos analisados variou de três a nove e o tamanho desses produtos amplificados permaneceu entre 680 e 1500 pares de bases (pb). O número total de locos analisados para os indivíduos dessa espécie foi 31. A Figura 1 mostra o perfil eletroforético dos indivíduos analisados com o *primer* (GGAC)₃C.

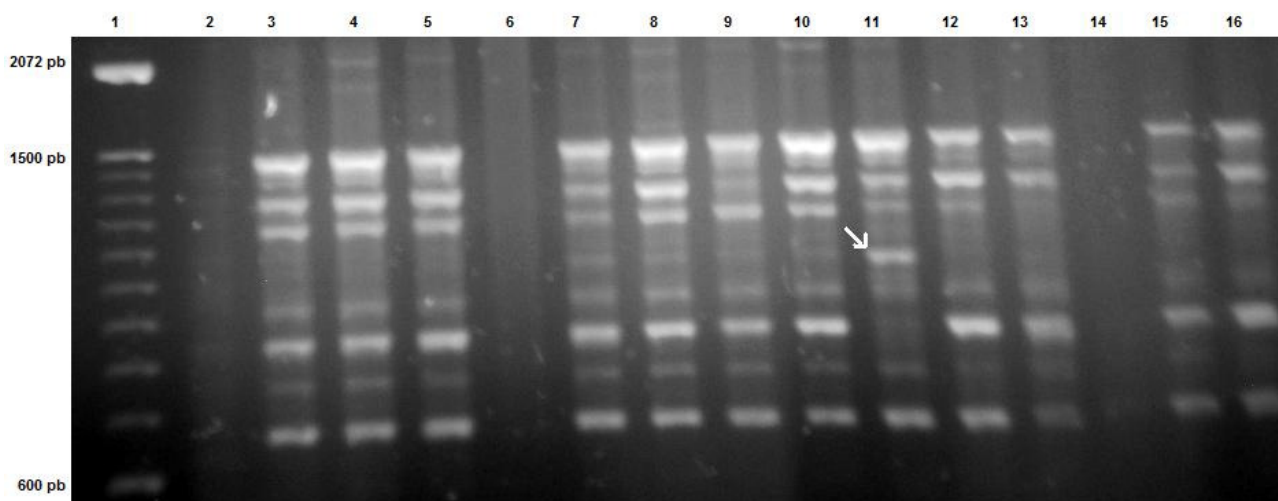


Figura 1. Fragmentos de DNA de *Hypostomus* sp. amplificados com o *primer* (GGAC)₃C. (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb. (2) Controle negativo da reação. (3 a 16) *Hypostomus* sp. A seta branca indica a presença de lócus polimórfico entre os indivíduos.

Foi encontrada uma baixa porcentagem de locos polimórficos (21%) para essa espécie, indicando baixa variabilidade genética intraespecífica. Essa baixa variabilidade genética do grupo poderia estar relacionada a vários fatores, incluindo o hábito sedentário desse peixe.

CONCLUSÃO

A técnica ISSR, utilizada nesse trabalho, possibilitou a análise da variabilidade genética de populações de *Hypostomus* sp. do rio Ivaí. A presença de grande número de locos monomórficos evidencia a baixa variabilidade genética intrapopulacional desse grupo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.C.A. **Análise genética via SPAR, de duas espécies do gênero *Cichla* introduzidas na bacia do Rio Paraná.** 2005. Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, 2005.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C. **Evolução e estrutura de populações no gênero *Gymnotus*.** 176 p. Instituto de Biociências USP. São Paulo. 1999.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. **Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats.** Theor. Appl. Genet. v.89, p.998-1006. 1994.

KIRPICNIKOV, V. S. **Genetic basis of fish selection.** New York: Springer – Verlag. 1981.

LUCIO, L.C. **Caracterização Molecular e Variabilidade Genética em Populações de *Hoplias aff. malabaricus* da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná.** 2002. (Pós-graduação). Departamento de Biologia Celular e Genética; Departamento de Biologia Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná, 2002.

NELSON, J. S. **Fishes of the World.** John Wiley & Sons Inc. 1984. 523p.

PANARARI, R.S. **Polimorfismo Molecular em populações de *Inga spp* (Mimosaceae), *Eugenia spp* (Myrtaceae) e *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (Fabaceae) em Floresta Ripária do Alto rio Paraná,** 2002. Departamento de Biologia Celular e Genética; Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná, 2002.

REIS, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, Jr. C. 2003. **Check list of the freshwater fishes of south and Central America.** EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 742 pp.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

WEBER, C. **Family Loricariidae:** Subfamily Hypostominae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. Check List os the Freshwater Fish of South America. Porto Alegre: Edipucrs, p.351-372. 2003.