



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE PEIXES DE ÁGUA DOCE DO MATO GROSSO DO SUL

Allana Novais Aranda¹; Danielly Beraldo Dos Santos Silva²; Jussara Oliveira
Vaini³; Alexéia Barufatti Grisolia⁴; Márcia Regina Russo⁵

UFGD/FCBA – Caixa Postal 533, 79.804-970 – Dourados – MS, E-mail: allana.novais@live.com

¹Bolsista de Iniciação Científica da UFGD. ²Mestranda no programa de Biologia Geral/ Bioprospecção da UFGD ³Mestre em Ciências Biológicas. ⁴Orientadora, Professora FBCA/UFGD, Bolsista PQ CNPq. ⁵Coordenadora do CEPEXP, Professora FCBA/UFGD.

RESUMO

Busca-se cada vez mais obter peixes geneticamente melhorados para características de importância econômica, e uma das práticas mais realizadas é a hibridização artificial. No entanto, a identificação morfológica é cada vez mais difícil, visto que as espécies híbridas são muito semelhantes as matrizes (espécies puras) e a identificação errônea destes animais pode levar à contaminação genética tanto em ambientes naturais como em cativeiros, nesse sentido este trabalho teve como objetivo identificar espécies de peixes provenientes de Rios e piscicultura do Mato Grosso do Sul por meio do gene mitocondrial 16S, bem como verificar sua filogenética. Para tanto, o DNA foi extraído da nadadeira caudal por meio da resina Chelex®. O DNA foi submetido à reação em cadeia pela polimerase para amplificação do gene mitocondrial 16S. Após, os fragmentos amplificados foram purificados por meio de Isopropanol e sequenciados por meio do ABI 3500 *automated DNA sequencer* (Applied Biosystems®). As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no GenBank e posteriormente, foram alinhadas no ClustalX2 Software, após foi construída a árvore filogenética por meio do método neighbor-joining (MEGA 6.0 Software). A amplificação baseada no gene mitocondrial 16S permitiu realizar a identificação das sete espécies diferentes dos peixes de água doce coletados no Estado de Mato Grosso do Sul. E a construção da árvore filogenética permitiu estudar a proximidade entre as

espécies devido à ancestralidade das mesmas, além de confirmar a similaridade com as sequências do Genbank. Desse modo, foi possível confirmar a eficiência da técnica molecular utilizada para identificação.

Palavras-chave: PCR, 16S rRNA, identificação genética.

INTRODUÇÃO

Se realizada de forma indiscriminada, a hibridização artificial de peixes pode levar a contaminação genética tanto em ambiente natural como também em cativeiro, pois o erro de identificação pode resultar na mistura e formação inadequada de reprodutores, o que não é produtivo para a criação de peixes, já que reduz a produção de valor ou de uma cultura (HASHIMOTO *et al.*, 2011). Como marcadores moleculares podem fornecer a identificação viável de espécies de peixe e seus híbridos (HASHIMOTO *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2011), estes recursos podem ser usados na identificação das espécies, resolvendo os problemas da identificação morfológica. O gene 16S rRNA. é um gene mitocondrial muito utilizado na identificação de espécies procariontas, principalmente bactérias (CHUN *et al.*, 2007).

O fato de esse gene codificar moléculas de RNA altamente estruturadas e possuir uma certa variabilidade o torna uma das ferramentas mais utilizadas para identificação (PITTULE *et al.*, 2002). Como este gene faz parte do ribossomo, uma estrutura conservada, é possível encontrá-lo em seres eucarióticos, no entanto, do mesmo modo que é uma estrutura preservada com o decorrer do tempo, há porções do ribossomo, denominados não aderentes, que são passíveis de mutação. Assim, torna-se possível diferenciar uma espécie de outra. Desse modo o presente trabalho visou verificar a eficácia do gene mitocondrial 16S para realizar a identificação molecular e a filogenia de espécies de peixes provenientes da Grande Dourados (MS).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais Extração de DNA

Sete espécies de peixes provenientes do Rio Aquidauana, Brilhante e Dourados e Piscicultura da cidade de Dourados/MS foram identificadas fenotipicamente e coletados fragmento da nadadeira caudal para análises moleculares. Para tanto, o DNA total foi extraído seguindo o protocolo de resina Chelex 5% - Chelex® 100 (Bio-Rad) (WALSH *et al.*, 1991). A pureza (260nm/280nm) e a concentração (ng/μL) do DNA total foi

determinada em nanofotofotômetro (NanoPhotometer™ P-300 UV-Vis da IMPLEN®).

Reação em Cadeia pela Polimerase e Sequenciamento

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador BIORAD® modelo MyCycler™ Thermal Cycler. As soluções de amplificação foram preparadas em volume final de 25 µL, constituídos por 12,5 µL de PCR Master MIX (Promega®, USA), 2 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmoles) e 2 µL DNA genômico (10 a 20 ng). Para a amplificação dos fragmentos foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 16SF universal (5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'), 16SR universal (5'-CGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'). O programa de amplificação do termociclador foi: desnaturação inicial à 95°C por 5 min, 35 ciclos sob as condições : 30 segundos à 95 ° C , 30 segundos à 50 ° C , e 20 segundos á 72 ° C , e uma extensão final de 5 minutos a 72 ° C.

Os produtos resultantes das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. Esses produtos amplificados foram purificados por meio de Álcool Isoamílico e sequenciados pelo método de Sanger no ABI 3500 *automated DNA sequencer* (Applied Biosystems®) com mesmos *primers* utilizados na PCR e o *BigDye Terminator cycle sequencing*. As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio dos *Softwares* Cap 3 e BioEdit, após, foram submetidas a alinhamentos, utilizando o *Software* de alinhamento ClustalW2. As sequencias foram alinhadas de acordo com sequencias disponíveis da espécie no Genbank, após foi construída a árvore filogenética por meio do método neighbor-joining (MEGA 6.0 Software).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação baseada no gene mitocondrial 16S permitiu realizar a identificação das sete espécies diferentes dos peixes de água doce coletados no estado de Mato Grosso do Sul (Tabela 1). As amostras 5 e 6, identificadas fenotipicamente como híbridos, por meio do sequenciamento permitiu definir a origem materna destes peixes, já que o gene mitocondrial é doado pela mãe. Desse modo, as amostra 5, fenotipicamente classificada como um peixe de geração pós-F1, foi identificada molecularmente como *Pseudoplatystoma tigrinum* (Caparari), sendo assim, conclui-se que o cruzamento possivelmente ocorreu entre híbrido x Caparari ou entre híbridos descendentes do Caparari. A amostra 6 foi classificada como o híbrido Patinga (Pacu-

fêmea x Pirapitinga-macho), teve sua identificação confirmada como *Piaractus brachypomus*. Nota-se que na árvore filogenética (Figura 4) a amostra 6 encontra-se próxima a espécie *Piaractus mesopotamicus* (Pacu), comprovando a origem da evolução desta espécie.

Tabela 1. Identificação fenotípica e molecular dos peixes coletados nos Rios e Piscicultura da Cidade de Dourados/MS

Peixes	Identificação fenotípica Gênero (Nome popular)	Identificação Molecular	Local de Coleta
Amostra 1	<i>Pterodoras</i> (Abotoado)	<i>Pterodoras granulosus</i>	Rio Aquidauana
Amostra 2	<i>Astyanax</i> (Lambari)	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Rio Dourados- Linha 4
Amostra 3	<i>Sorubim</i> (Jurupensém)	<i>Sorubim lima</i>	Rio Dourados- Linha 4
Amostra 4	<i>Salminus</i> (Dourado)	<i>Salminus sp.</i>	Rio Dourados- Linha 3
Amostra 5	Híbrido Pós-F1	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	Rio Dourados- Linha 16
Amostra 6	Híbrido	<i>Piaractus brachypomus</i>	Piscicultura Douradense
Amostra 7	<i>Prochilodus</i> (Curimba)	<i>Prochilodus lineatus</i>	Rio Brilhante

Quando as sequências foram comparadas com sequências depositadas no Genbank utilizando como ferramenta o BlastN, todas as sequências estudadas apresentaram alta similaridade, houve menor a probabilidade de que ela tenha ocorrido ao acaso, sendo mais provável que as ambas as sequências tenham um ancestral comum, ou seja são homólogas. E a construção da árvore filogenética permitiu estudar a proximidade entre as espécies devido à ancestralidade das mesmas, além de confirmar a similaridade com as sequências do Genbank. Desse modo, foi possível confirmar a eficiência da técnica molecular utilizada para identificação. Com a identificação precisa das espécies diminui o risco do uso de espécies híbridas como animais reprodutores, evita a ingressão de espécies não nativas em determinados ambientes. Sendo assim, deve-se realizar a conservação e proteção de espécies nativas, além de garantir o cruzamento entre espécies que forneceram híbridos com características aceitáveis.

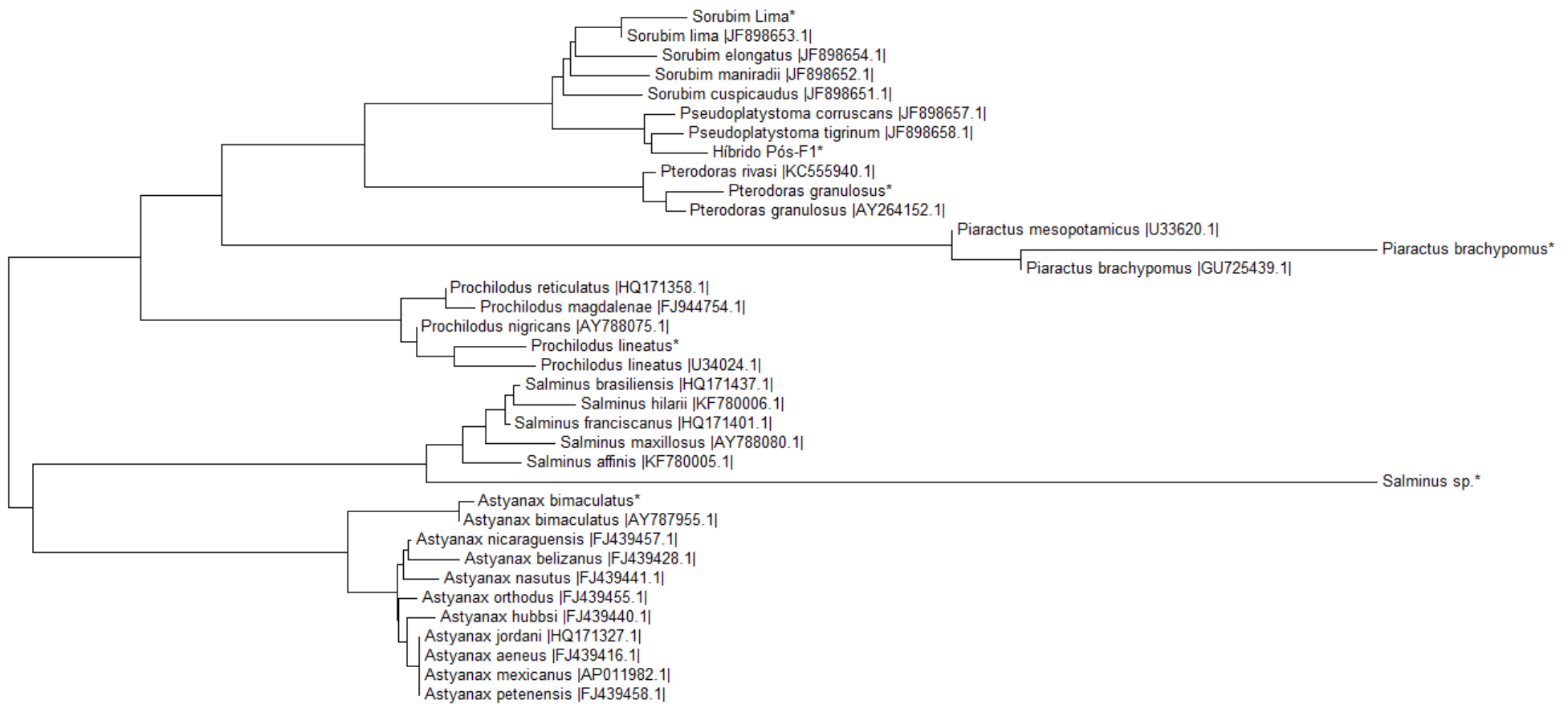


Figura 1. Árvore filogenética construída pelo método neighbor-joining (MEGA 6.0 Software). * Espécies estudadas.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos foi identificar espécies de peixes provenientes de pisciculturas da região da Grande Dourados (MS) por meio do gene mitocondrial 16S, bem como verificar sua filogenética.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CEPEXP, ao Laboratório de Biotecnologia Aplicado à Produção Animal, à FUNAEPE e a Universidade Federal da Grande Dourados.

REFERÊNCIAS

- CHUN, J.; LEE, J. JUNG, Y.; KIM, M.; KIM, S.; KIM, B. K.; LIM Y. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57, 2007, 2259–2261
- HASHIMOTO, D. T.; MENDONC, A, F. F.; SENHORINI, J. A.; BORTOLOZZI, J.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: tools for genetic monitoring in aquaculture. **Aquaculture** 298, 2010, 346–349.
- HASHIMOTO, D. T.; MENDONC, A, F. F.; SENHORINI, J. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian Oaquaculture industry. **Aquaculture** 321, 2011, 49–53.
- PITULLE, C.; STREHSE, C.; BROWN, J. W.; BREITSCHWERDT, E. B. Investigation of the phylogenetic relationships within the genus *Bartonella* based on comparative sequence analysis of the *rnpB* gene, 16S rDNA and 23S rDNA.
- PRADO, F. D.; HASHIMOTO, D. T.; MENDONC, A, F. F.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Aquac. Res.** 42, 2011, 1890–1894.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v. 10, p. 506–513, 1991.