

VER-06

MEDIDAS DE VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES ELÉTRICOS (ORDEM GYMNOTIFORMES) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

Kyara Martins Formiga⁽¹⁾, José Antônio Alves Gomes⁽²⁾
Bolsista CNPq/PIBIC⁽¹⁾; Pesquisador INPA/CPBA⁽²⁾

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA, ou seja, para detecção de polimorfismo genético. O RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA), DNA polimórfico amplificado ao acaso constitui uma técnica de biologia molecular derivada da PCR (reação de polimerase em cadeia); o RAPD utiliza primers curtos de seqüência arbitrária para dirigir uma reação de amplificação de fitas de DNA. Nesta técnica molecular não há necessidade de conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada, podendo assim um único indivíduo apresentar várias seqüências curtas de seu DNA amplificadas (Ferreira & Gatapaglia, 1997).

Popularmente conhecidos como “peixes elétricos” a ordem Gymnotiformes apresenta a capacidade de produzir corrente elétrica, através de um tecido especializado denominado órgão elétrico. Esta ordem de peixes está restrita às Américas do Sul e Central, alcançando uma maior abundância na bacia Amazônica (Alves-Gomes, 1997).

Os indivíduos da espécie *Microsternarchus bilineatus* são comumente encontrados em ambientes de águas calmas ou paradas, protegendo-se na superfície ou no meio da coluna d'água, onde a vegetação suporta o peso de seu corpo (Mago-Leccia, 1994). A espécie *Hypopygus lepturus* apresenta os menores indivíduos conhecidos da ordem Gymnotiformes preferindo também habitats protegidos, em locais de vegetação densa em águas paradas ou levemente correntes (Moller, 1995). Este projeto tem por objetivo desenvolver a metodologia de RAPD para o estudo de padrões biogeográficos nas espécies de Gymnotiformes citadas.

Os indivíduos das espécies estudadas foram coletados em excursões de campo, no Rio Negro (lago do Puraquequara), Rio Branco e Rio Tapajós. Os espécimens foram preservados em álcool 70% até serem processados em laboratório. Após a identificação de cada indivíduo, uma amostra de tecido muscular foi retirada de cada espécimen.

DNA foi extraído através de técnicas padronizadas descritas em Alves-Gomes *et al* 1995. Uma vez extraído e checada a qualidade e concentração, o DNA de cada espécie foi acondicionado em tubos ependorf, com água ultrapura, rotulados e mantidos em freezers. O DNA extraído foi utilizado como substrato para o estudo através de RAPDs.

Para o RAPD foram utilizados kits comerciais com primers de seqüências arbitrárias e as técnicas foram seguidas segundo protocolos descritos em Jayasankar & Dharmalingam (1997) e Dinesh et al (1993). Para a detecção de polimorfismo, os produtos da amplificação foram corridos em géis de agarose e o padrão de bandas gerado por cada população foi analisado, atentando-se também para a eficiência dos primers como marcadores moleculares para as espécies estudadas.

Os indivíduos selecionados para o estudo do RAPD estão descritos por numeração catalogada na tabela 01, que indica também seus respectivos locais de coleta.

Nº de campo	ESPÉCIMENS	LOCAL DA COLETA
2	<i>Microsternarchus bilineatus</i>	Rio Branco
3	<i>Hypopygus lepturus</i>	Rio Branco
19	<i>Microsternarchus bilineatus</i>	Rio Branco
374	<i>Hypopygus lepturus</i>	Rio Tapajós
375	<i>Hypopygus lepturus</i>	Rio Tapajós
379	<i>Microsternarchus bilineatus</i>	Rio Negro (lago do Puraquequara)
381	<i>Microsternarchus bilineatus</i>	Rio Negro (lago do Puraquequara)
385	<i>Hypopygus lepturus</i>	Rio Negro (lago do Puraquequara)
387	<i>Hypopygus lepturus</i>	Rio Negro (lago do Puraquequara)
388	<i>Microsternarchus bilineatus</i>	Rio Tapajós
391	<i>Microsternarchus bilineatus</i>	Rio Tapajós

Tabela 01 – Espécimens coletados dos quais foram extraídos DNAs e processados no protocolo do RAPD, apresentando, então, seus respectivos padrões de bandas amplificadas

Com estes indivíduos foram testados treze primers da série A Pharmacia: A1, A2, A4, A5, A8, A9, A10, A11, A12, A14, A15, A18 e A20.

Os primers A1, A2, A10, A14, A15, A18 e A20 aparentemente não representam bons primers para *H. lepturus* e *M. bilineatus* pelo fato de não terem produzido nenhuma amplificação de DNA nos indivíduos testados.

Os primers A5, A8, e A9 indicaram ser potencialmente bons marcadores de RAPD para as amostras estudadas, pois verificou-se que o produto amplificado apresentou padrões de variabilidade que permitiu diferenciar indivíduos coletados em diferentes localidades.

O primer A5 (Fig.01) apresentou padrões de bandas que proporcionaram a visualização de polimorfismo interpopulacional e intrapopulacional. Em indivíduos da espécie *M. bilineatus* verificou-se padrões de bandas homólogos nos quatro indivíduos testados. Os

indivíduos do Rio Negro e do Rio Tapajós apresentaram padrões de bandas diferentes evidenciando polimorfismo interpopulacional. Os indivíduos do Rio Negro apresentaram várias bandas de pesos distintos, o que evidencia polimorfismo dentro da mesma população.

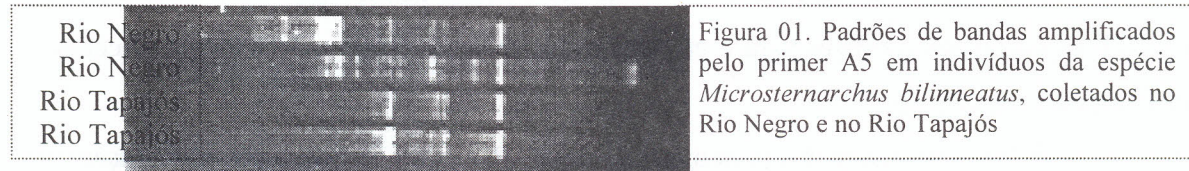


Figura 01. Padrões de bandas amplificadas pelo primer A5 em indivíduos da espécie *Microsternarchus bilineatus*, coletados no Rio Negro e no Rio Tapajós

O primer A8 (Fig.02) embora tenha apresentado apenas uma banda por indivíduo, demonstrou polimorfismo interpopulacional entre indivíduos da espécie *Hypopygus lepturus* dos Rios Negro, Branco e Tapajós, pelo fato das bandas amplificadas apresentarem pesos moleculares diferentes. Os indivíduos do Rio Negro apresentaram bandas de pesos diferentes, evidenciando polimorfismo intrapopulacional.



Figura 02. Padrões de bandas amplificadas pelo primer A8 em indivíduos da espécie *Hypopygus lepturus*, coletados no Rio Negro, no Rio Tapajós, e no Rio Branco.

No primer A9 (Fig.03), indivíduos da espécie *Hypopygus lepturus* do Rio Negro e do Rio Tapajós apresentaram polimorfismo interpopulacional. Os indivíduos do Rio Tapajós apresentaram padrões de bandas homólogos e distintos, indicando polimorfismo intrapopulacional. Em indivíduos da espécie *Microsternarchus bilineatus* do Rio Branco não foram amplificadas padrões de bandas, devido ao fato de suas concentrações não serem ideais para RAPD. Os indivíduos do Rio Negro e do Rio Tapajós apresentaram polimorfismo, confirmado pelos padrões de bandas de diferentes pesos moleculares. O polimorfismo intrapopulacional foi verificado nos indivíduos do Rio Negro com alguns padrões de bandas distintos entre si.

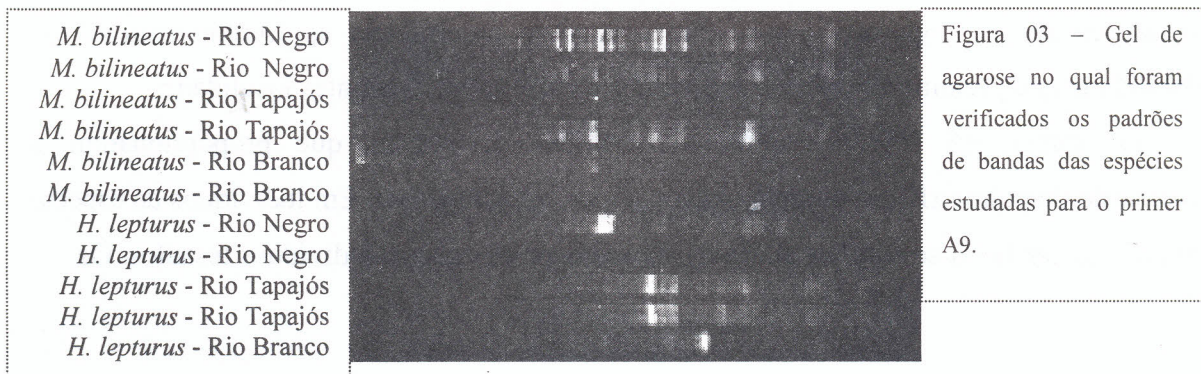


Figura 03 - Gel de agarose no qual foram verificados os padrões de bandas das espécies estudadas para o primer A9.

A partir dos resultados dos testes dos primers, pode-se verificar que os primers A1, A10, A14, A15, A18 e A20 não apresentaram bons resultados como marcadores moleculares de RAPD para as espécies estudadas.

Os primers A5, A8 e A9 do Kit comercial da série A, apresentaram padrões de bandas polimórficas, sendo possível analisar variações inter e intrapopulacional nos indivíduos estudados. Marcadores RAPD podem ser utilizados para estimar grau de similaridade genética entre populações de Gymnotiformes separadas por grandes volumes de água. Através dos padrões de bandas amplificadas é possível verificar o grau de similaridade genética através da identificação dos padrões homólogos e distintos entre indivíduos de uma mesma população ou de populações diferentes. Esta técnica pode vir a ser de grande utilidade futuramente em análises de espécies de peixes de valor comercial com ampla distribuição geográfica.

ALVES-GOMES, J. A. *et al* . Phylogenetic analysis of the south american electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology And Evolution* (1995), 12(2): 298-318.;

ALVES-GOMES, J. A. Informações preliminares sobre a bio-ecologia de peixes elétricos (Ordem Gymnotiformes) em Roraima. *In* Barbosa *et al*. Homem, ambiente e ecologia no Estado de Roraima 1997. 509-555.

DINESH, K. R. *et al* . RAPD analysis: An efficient method of DNA fingerprinting in fishes. Zoological Society (Tokyo) 1993, 10(5): 849-854;

FERREIRA, M. E. & GATAPAGLIA. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética (1993).

JAYASANKAR, P. & DHARMALINGAN, K. Potential application of RAPD and RAHM markers in genome analysis of scombroid fishes. *Current Science* 1997.72(6):383-390;

MAGO-LECCIA, F. *Electric fishes of the continental waters of America* 1994. FUDECI 206:45-52.

MOLLER, P. 1995. Taxonomic, zoogeography, general ecology. *In: Electric fishes – history and behavior*. 470:429-464.