



OTIMIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DO GENE RIBOSSOMAL *16S* EM PEIXES DO GÊNERO *Astyanax* BAIRD & GIRARD, 1854

Alan dos Santos^{1,2}; Clebiano da Costa Sá^{1,2}; Amanda Luiza Costa Pereira^{1,2}; Giancarlo Arrais Galvão^{1,2}; Michely Correia Diniz^{1,2}

INTRODUÇÃO

O genoma mitocondrial se tornou parte de vários estudos dentro da genética molecular com objetivos de desvendar aspectos biológicos e evolutivos. Em uma rápida busca nos banco de dados é possível observar a vasta quantidade de informações para os genes que compõe determinado genoma. Esse interesse por parte dos pesquisadores se dá devido suas características peculiares como conservação do conteúdo gênico, a ordem em que os genes se encontram, herança materna, ausência de recombinação, alta taxa evolutiva (Arias *et al.* 2003). Dentre os genes mitocondriais, o *16S* é um dos transcritos em RNA ribossômico – rRNA que através de suas análises é possível inferir estrutura populacional, bem como diagnosticar parentescos entre seres vivos e as mudanças evolutivas entre dois grupos que divergiram de um mesmo ramo (Damineli e Damineli *et al.* 2007). Dado os atributos do gene *16S*, este será de ampla importância para as análises moleculares de populações de peixes, sob influência do Projeto de Integração do São Francisco com Bacias do Nordeste Setentrional – PISF.

Os indivíduos de estudo foram peixes do gênero *Astyanax* Baird & Girard que são bastante representativos na América do Sul. Segundo um estudo preliminar do perfil da ictiofauna do rio São Francisco desenvolvido por Barbosa e Soares, 2009 são sete as espécies para esse gênero presente no Rio São Francisco, entre elas está o *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 que em revisões taxonômicas é relatada como um “grupo” de espécies.

O objetivo desse trabalho foi otimizar amplificação do gene *16S* em indivíduos do gênero *Astyanax*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com o par de iniciadores *16Sar/16Sbr* a fim de obter uma amostra com excelente quantidade de nucleotídeos para prosseguir ao sequenciamento e inferência dos dados populacionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os peixes foram coletados no Açude Curral da Onça, Lote 14, município de São José de Piranhas-PB no Eixo Norte do PISF através de rede de arrasto com 12 mm de abertura entre nós opostos, sendo realizado nas margens do açude quando o mesmo estava tendo remoção do volume de água. Os peixes foram conduzidos ao Laboratório de Genética Molecular para extração de DNA a partir do músculo localizado próximo a nadadeira caudal. Essa extração foi realizada de acordo com o protocolo de Pearson e Stirling, 2003.

¹Centro de Conservação e Manejo de Fauna da Caatinga – CEMFAUNA, Petrolina, Pernambuco (alan_sanntos@hotmail.com);

²Colegiado de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco.

As amostras obtidas na extração foram quantificadas para se realizar a diluição até 25 ng/μL. A amplificação foi conduzida, em amostras de DNA genômico de espécimes do gênero *Astyanax* com os iniciadores *16Sar* - CGCCTGTTTATCAAAAACAT e *16Sbr* – CCGGTCTGAACTCAGATCACGT.

As amostras foram padronizadas a uma concentração de 25 ng/μL, e o mix da reação composto por 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de DNTPs, 0,5 U Taq Polimerase, Buffer 10X, cada iniciador a 0,3 μM e água livre de nuclease, totalizando 25 μL de volume final. A essas concentrações foram empregados os seguintes parâmetros de amplificação no termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers Tx 96 Plus*: aquecimento da tampa a 104 °C, desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos foram programados com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; a extensão final por 10 minutos a 72 °C.

Uma segunda reação foi realizada com 50 ng/μL de DNA e mix contendo 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de DNTPs, 0,5 U de Taq polimerase, 2,5 μL de Buffer 10X, 0,3 μM de cada primer (*16Sar* e *16Sbr*) e água livre de nuclease para completar 25 μL de volume final. Essa última reação apresentou o dobro de DNA e MgCl₂ quando comparada à primeira reação. A essas concentrações foram empregados os mesmos parâmetros de ciclagem utilizados na primeira reação.

As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, à 300 V, corrente 80 mA, durante 1 hora e coradas com Brometo de Etídeo. As imagens foram capturadas pelo sistema de fotodocumentação L-PIX, da Locus Biotecnologia.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A qualidade do DNA extraído foi satisfatória tendo em vista a boa quantificação, e poucas impurezas presentes nas amostras analisadas. A primeira condição de reação apresentou ausência de bandas dispostas no gel de eletroforese, significando que as condições empregadas não permitiram a amplificação do gene *16S*. A segunda condição de reação apresentou bandas monomórficas para o gene *16S* com cerca de 500 pares de base quando comparadas ao *Ladder* de 100 pb. As amostras com resultado positivo para amplificação de acordo com a eletroforese foram quantificadas em espectrofotômetro *FEMTO CIRRUS 80 MB* para padronização das concentrações de DNA em ng/μL, ficando com uma média de 382,07 ng/μL a serem purificadas e submetidas à reação de sequenciamento.

Em um trabalho desenvolvido sobre a história evolutiva do gênero *Astyanax* Ornelas-García *et al.* 2008 utilizou também utilizou os iniciadores *16Sar* e *16Sbr*, entretanto as concentrações dos iniciadores, Taq Polimerase e MgCl₂, diferiam dos nossos resultados; a temperatura de anelamento foram similares, mas o tempo de reação variou. Oliveira *et al.* 2011 também realizou um estudo com gene *16S* em peixes do gênero *Astyanax* num trabalho a cerca das relações filogenéticas dentro da família Characidae utilizando as mesmas concentrações de Taq polimerase, DNTPs e Buffer 10X.

CONCLUSÃO

O processo de otimização faz parte da etapa inicial para o sucesso dos estudos moleculares. Faz-se, portanto, necessário obter as amostras em qualidade e quantidade que permitam resultados mais confiáveis. Esse trabalho apresentou resultados satisfatórios

levando a equipe de trabalho a utilizar esses parâmetros para o gene em questão nas outras amostras desse gênero coletadas nas regiões sobre influência do PISF.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação e a Equipe de trabalho do Centro de Conservação e Manejo de Fauna da Caatinga – CEMAFUNA que possibilitou a obtenção do material de estudo. A equipe do Laboratório de Genética Molecular pela execução das atividades e a professora Michely Correia Diniz pela confiança, apoio e estímulo. Ao Ministério da Integração Nacional pelo aporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, M. C. FRANCISCO, F. O. SILVESTRE, D. 2003. **O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos**. In G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos, Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure . Editora UNESC, Criciúma.

BARBOSA, J. M. SOARES, E. C. 2009. **Perfil da ictiofauna da bacia do são francisco: estudo preliminar**. Revista Brasileira de Engenharia de Pesca 4(1), jan.

DAMINELI, A. DAMINELI, D. S. C. 2007. **Origens da Vida**. Estudos avançados vol.21 n. 59 São Paulo Jan./Apr.

OLIVEIRA, C. AVELINO, G. S. ABE, K. T. MARIGUELA, T. C. BENINE, R. C. ORTÍ, G. VARI, R. P. CORRÊA E CASTRO, R. M. 2011. **Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling**. BMC Evolutionary Biology (Online), v. 11, p. 275-285.

ORNELAS-GARCÍA, C. P. DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O. DOADRIO, I. 2008. **Evolutionary history of the fish genus Astyanax Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies**. BMC Evolutionary Biology (Online).

PEARSON, H. STIRLING, D. 2003. **Methods in Molecular Biology**. Vol. 226, Second edition.