



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO MARAJÓ- BREVES
FACULDADE DE CIÊNCIAS NATURAIS

SIRLEY FARIAS DA SILVA

**UTILIZAÇÃO DO GENE 5S rDNA COMO FERRAMENTA DE
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA ORDEM
PLEURONECTIFORMES.**

BREVES-PA
2017

SIRLEY FARIAS DA SILVA

**UTILIZAÇÃO DO GENE 5S rDNA COMO FERRAMENTA DE
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA ORDEM
PLEURONECTIFORMES.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau
de Licenciado em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. João Braullio de L. Sales.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

S586u Silva, Sirley Farias da.
Utilização do gene 5S rDNA como ferramenta de identificação de espécies da ordem pleuronectiformes / Sirley Farias da Silva. — 2017.
41 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales
Trabalho de Conclusão (Graduação) - Universidade Federal do Pará,
Campus Universitário de Breves, Faculdade de Ciências Naturais, Breves,
2017.

1. Peixes planos sul americanos. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3.
5S rDNA. 4. Discriminação Genética. I. Título.

CDD 597.7

SIRLEY FARIAS DA SILVA

**UTILIZAÇÃO DO GENE 5S rDNA COMO FERRAMENTA DE
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA ORDEM
PLEURONECTIFORMES.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Naturais, aprovado com o conceito _____.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales (Orientador)
FACIN, CUMB-UFPA

Dra. Gleiciane Leal Pinheiro
FACIN, CUMB-UFPA (Titular)

Msc. Tiago Magalhães Freitas
FACIN, CUMB-UFPA (Titular)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me proporcionado mais essa conquista e ter permitido chegar até aqui.

Ao meu orientador prof. Dr. João Bráullio L. Sales, por ter aceitado mais esse desafio em orientar este trabalho e pela paciência que teve comigo.

À minha família especialmente aos meus pais Manoel Oliveira e Joana Darc Farias pelo incentivo, ajuda, conselhos, puxões de orelha e amor; aos meus irmãos Sidney, Amanda, Aline, Alice e Adriane por terem me suportando nesse período, amo todos vocês; aos demais membros da família, Avós, tios, primos, cunhados e sobrinhos.

À minha família de coração do Escritório Só contábeis, Franciane, Márcia, Santana, Theila, Rodrigo, Eduardo, Andrey e especialmente a Cléia Lopes e Carmem Costa, por terem acreditado e me segurado pela mão quando eu mais precisei, amo vocês.

À FACIN – UFPA campus Breves, a todos os professores ao qual tive contato durante a graduação, pelo comprometimento com a educação!

À minha turma Ciências Naturais 2014, pela parceria e carinho, saibam que considero todos amigos e que essa amizade se perdue pela eternidade.

Ao grupo inseparável, minhas amigas de curso, Cleiane Gomes, Ingleds Michelle, Andressa Santos e Rainara Pereira pelo companheirismo, por me aturarem durante 4 anos, pela compreensão diante das minhas limitações e principalmente pela amizade. Amo vocês.

À minha namorada Rizoleide Miranda pela compreensão, paciência e companheirismo. Amo você.

A todos os meus Amigos em especial, Paula Martins, Raimundo Pantoja, Carol Lopes, Luiza Karema, Bruno Diego, Sâmela Raylane, Fabiane Oliveira, Pedro Oliveira, Naira Soares e Bruna Figueira, vocês fazem parte desta conquista.

Por fim a todos os professores desde a educação infantil até o ensino médio, suas contribuições com minha formação foram de extrema importância!

*“A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”.*
(Marcel Proust)

RESUMO

A necessidade de estudos de genética molecular com espécies da Ordem Pleuronectiformes se baseia principalmente nos problemas taxionômicos de muitos grupos e certas espécies, havendo dificuldade na correta identificação das espécies, principalmente aquelas que não são objeto de captura comercial. Um método de identificação de espécies baseado em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene 5S rDNA, foi empregado para discriminar espécies de peixes-planos Sul Americanas de duas famílias, Achiridae e Pleuronectidae. Os resultados demonstram padrões de bandas espécie-específicos, sendo possível discriminar as espécies analisadas com uma simples migração em gel de agarose. Também foi verificada a variação intraespecífica, através da migração de todas as amostras coletadas para o presente estudo, onde todos os indivíduos apresentaram o mesmo padrão. Os resultados do presente estudo fornecem um método rápido e preciso para a discriminação de espécies de peixes planos de duas famílias Sul Americanas, onde tanto estudos morfológicos quanto genéticos são escassos para as espécies de peixes planos.

Palavras-chaves: Peixes planos sul americanos, Reação em cadeia da polimerase, 5S rDNA, Discriminação genética.

ABSTRACT

The taxonomy of many flatfish species, especially those with no commercial value, is poorly understood, and the development of effective molecular techniques may be essential for the reliable identification of taxa. A method for the identification of species based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) of the 5S rDNA gene was used in the present study for the differentiation of South American flatfishes belonging to two families, the Achiridae and Paralichthyidae. The results of the analysis indicate the presence of species-specific banding patterns, and it was possible to discriminate the species based on a simple migration in agarose gel. This procedure was also used to verify intraspecific variation, which was inexistent in all species, with all the individuals of each taxon presenting the exact same banding pattern. The results of this study provide a rapid and precise method for the discrimination of the flatfish species of two families found in South America, from which few morphological and genetic studies are available.

Keywords: South american flatfishes, Polymerase chain reaction, 5S rDNA, Genetic discrimination.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 -	Representação da filogenia entre as famílias de Pleuronectiformes baseados em caracteres morfológicos.....	11
Figura 2 -	Desenho esquemático de um indivíduo da família Achiridae.....	13
Figura 3 -	Arvore de agrupamento de vizinhos mostrando indivíduos com distancia genética acentuada.....	17
Figura 4 -	Exemplo de resultado de RFLP submetido a Eletroforese em gel de agarose a 2% (a 250 V durante 40 minutos) do gene VHL amplificado por PCR e digerido com a enzima de restrição Sfan I, corado com brometo de etídio.....	20
Figura 5 -	Exemplo de resultado de marcadores RAPD em 1,5% de géis de agarose...	22
Figura 6 -	Exemplo de padrões de AFLP digitalizados obtidos a partir do DNA genômico de seis X de cepas de vasícula.....	23
Figura 7 -	Distribuição geográfica de espécies de duas Famílias da Ordem pleuronectiformes, coletados em diferentes regiões no Brasil.....	27
Figura 8 -	Gel de agarose a 1.5% mostrando o padrão de bandas apresentado pelas 9 espécies de linguados analisados no presente estudo. Da esquerda para a direita: 1 = <i>H. mentalis</i> ; 2 = <i>A. achirus</i> ; 3 = <i>A. lineatus</i> ; 4 = <i>A. declives</i> ; 5 = <i>A. dumerilli</i> ; 6 = <i>T. paulistanus</i> ; 7 = <i>T. microphthalmus</i> ; 8 = <i>C. arenaceus</i> ; 9 = <i>C. spilopterus</i>	29
Figura 9 -	<i>Gel de agarose a 1.5% mostrando o padrão de conservação intraespecífica de três amostras de linguados analisadas no presente estudo. Da esquerda para direita: 1-4 = A. dumerilli; 5-8 = T. paulistanus; 9-10 = T. microphthalmus</i>	30
Tabela 1 -	Famílias, espécies, quantidade de amostras utilizadas e localidade de coleta dos peixes planos utilizados no presente estudo.....	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ORDEM PLEURONECTIFORMES (BLEEKER, 1859).....	10
1.1.1	A família Achiridae e seus representantes no Brasil.....	12
1.2	PROBLEMAS DE IDENTIFICAÇÃO.....	13
1.3	FERRAMENTAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO.....	14
1.3.1	Técnicas que utilizam sequenciamento de DNA.....	15
1.3.1.1	DNA de código de barras (DNA Barcoding).....	15
1.3.2	Técnicas que não necessitam de sequenciamento de DNA.....	18
1.3.2.1	Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP).....	18
1.3.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	20
1.3.2.3	PCR em Tempo Real.....	21
1.3.2.4	DNA Polimórfico Amplificado Aleatório (RAPD).....	22
1.3.2.5	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).....	23
1.4	DNA RIBOSSÔMICO (rDNA) GENE 5S.....	24
2	JUSTIFICATIVA.....	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	AMOSTRAGEM E MÉTODOS MOLECULARES.....	26
5	RESULTADOS.....	29
6	DISCUSSÃO.....	31
7	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ORDEM PLEURONECTIFORMES (BLEEKER, 1859)

A Ordem Pleuronectiformes, é composta por um grupo de aproximadamente 822 espécies reconhecidas, dividida em duas subordens: Psettoidaei (com uma única família) e Pleuronectoidei (com 13 famílias), (MUNROE, 2014). São bentônicos, carnívoros e podem ser encontrados em ambientes de água doce, estuarino e marinho (NELSON, 2016). Na fase larval, são bilateralmente simétricas e quando atingem tamanho entre 10 e 25 mm sofrem metamorfose, havendo uma modificação complexa dos ossos do crânio, nervos e músculos, deixando um lado do peixe sem olhos (lado inferior) e o outro lado com dois olhos (lado superior). Esta migração dos olhos pode ser para o lado direito (destra) ou para o lado esquerdo (sinistra) (MUNIZ, 2009).

Na fase adulta, ocorre uma assimetria, onde o corpo fica altamente comprimido e um pouco arredondado no lado onde os olhos estão localizados, havendo posteriormente um aumento da pigmentação do lado dorsal, permitindo que o peixe se associe ao substrato (NELSON, 2006). Podem ser localizados sobre ou parcialmente enterrados em vários tipos de substrato como fundos de areia, lama, pedra entre outros, podendo algumas espécies apresentarem preferências quanto ao tipo de substrato (MUNROE, 2005). Uma característica adaptativa à vida bentônica é a presença de uma invaginação muscular em forma de saco, na parede da membrana orbital que pode ser preenchida de fluidos para causar protuberância dos olhos, chamada de *recessus orbitalis*, o que permite que o peixe enxergue mesmo quando enterrado (MUNROE, 2005).

Regan, (1910) foi o primeiro a propor a classificação morfológica da Ordem Pleuronectiformes, até então chamada de Heterostomata. O mesmo considerou a ordem monofilética e dividiu-a em duas subordens monofiléticas putativas, Psettoidaei e Pleuronectoidei. Atualmente, a classificação principal da ordem ainda é baseada em caracteres morfológicos (CHAPLEAU, 1993; BERENDZEN; DIMMICK, 2002) (Figura 1).

- **Subordem Psettoidaei**

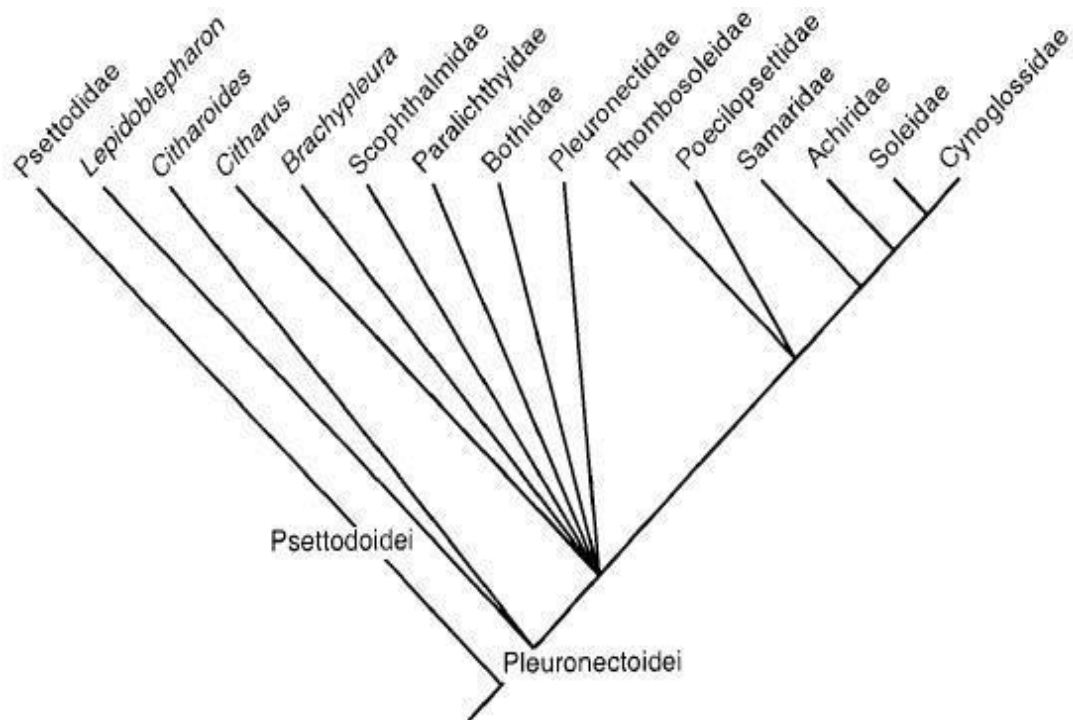
Composta por uma única família (Psettodidae) e único gênero (*Psettodes*) esta subordem é representada por três espécies (*Psettodes belcheri*, *Psettodes bennetti*, *Psettodes erumei*); são caracterizadas pela presença de 24 ou 25 vertebrae; aleta dorsal não estendida na

cabeça; raios dorsal e anal anterior espinhoso; supramaxilar grande; palatina com dentes (NELSON, 2006).

- **Subordem Pleuronectoidei**

Esta subordem é representada por 13 famílias (Citharidae, Scophthalmidae, Paralichthyidae, Bothidae, Pleuronectidae, Paralichthodidae, Poecilopsettidae, Rhombosoleidae, Achirosettidae, Samaridae, Achiridae, Soleidae, Cynoglossidae) distribuídas em aproximadamente 122 gêneros e inclui cerca de 819 espécies reconhecidas (MUNROE, 2014). Caracterizam-se pelo prolongamento da barbatana dorsal até a cabeça e em algumas espécies estendendo-se até a região ocular; barbatana dorsais e anais sem espinha; palato desdentado; basefenoíde ausente; supramaxilar vestigial (em alguns citharids) ou ausente; possuem de 26 a 70 vertebras dos quais 10 ou mais são abdominais (NELSON, 2006).

Figura 1 - Representação da filogenia entre as famílias de Pleuronectiformes baseados em caracteres morfológicos.



Fonte: (BEREDZEN; DIMMICK, 2002).

Cerca de 10 espécies ocorrem apenas em água doce (seis Achiridae, um Soleidae e três Cynoglossidae) podendo algumas delas entrarem em estuários ou água marinha, e outras 20 espécies que normalmente são marinhas, mas ocasionalmente entram em água doce (NELSON, 2016). E algumas regiões, populações de espécies maiores podem ser abundantes a ponto de ser considerados o principal recurso de exploração pesqueira (NELSON, 2006, COIMBRA, 2010).

São popularmente conhecidos como linguado, solha ou peixe chato, possuem grande importância ecológica e comercial, tanto pelo elevado número de espécies, quanto pelo alto valor que algumas delas podem atingir no mercado principalmente devido à qualidade da sua carne. (CERQUEIRA, *et al.*, 1997).

No Brasil existem aproximadamente 56 espécies catalogadas distribuídas em 5 (cinco) famílias: Bothidae, Paralichthyidae, Pleuronectidae, Cynoglossidae e Achiridae; encontram-se largamente distribuído ao longo de toda a costa brasileira, e até mesmo em águas interiores; A família Achiridae possui um maior número de representantes em água doce (rio Amazonas, rio Tocantins etc.) e estuários (FIGUEIREDO ; MENEZES, 2000; apud MENEZES, *et al.*, 2003).

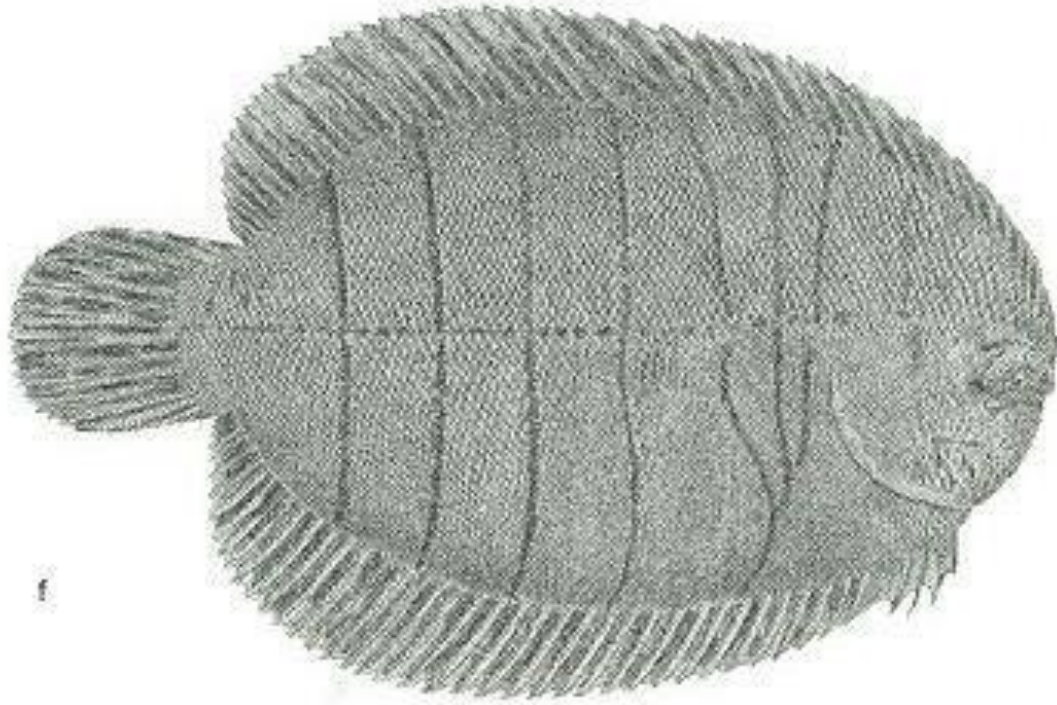
1.1.1 A família Achiridae e seus representantes no Brasil

Os membros da família Achiridae ocorrem em áreas temperadas e tropicais nas Américas, em águas marinhas, estuarinas e dulcícolas. A maioria das espécies ocorre próximo do litoral, normalmente em substratos que facilitem a camuflagem, como areia e lama (CARPENTER, 2002 apud COIMBRA, 2010). Para a América do Sul (incluindo o Brasil), não há relatos da utilização de espécies da família Achiridae para subsistência ou comercialização (NELSON, 2006). A família é relativamente pequena, sendo formada pelos gêneros *Achirus*, *Apionichthys*, *Catathyridium*, *Gymnachirus*, *Gypoclinemus* e *Trinectes*, possuindo aproximadamente 35 espécies válidas (RAMOS *et al.*, 2009; DUPLAIN, *et al.*, 2012; BITENCOURT, 2015).

Todas as espécies da família Achiridae são americanas, possuindo uma distribuição tanto pelo lado do Atlântico (Sul dos EUA até Norte da Argentina), quanto do leste do Pacífico (CHIRICHIGNO, 1974; FIGUEIREDO; MENEZES, 2000; BITENCOURT, 2015). Todos os indivíduos são destras, as nadadeiras anal e dorsal apresentam separação individual, entretanto, a nadadeira pélvica direita se apresenta unida à anal. O corpo pode apresentar forma tanto arredondada quando oval, sendo bastante comprimido. A linha lateral é essencialmente reta, e geralmente de fácil visualização no lado ocular, e cruzada em

determinados ângulos por ramificações acessórias (linhas achirine), se estendendo em direção as nadadeiras dorsal e anal (CARPENTER, 2002 apud COIMBRA 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Desenho esquemático de um indivíduo da família Achiridae.



Fonte: (COIMBRA, 2010 e modificado de MUNROE, 2005).

As espécies apresentam tamanho normalmente pequenos, se alimentando principalmente de crustáceos e em alguns casos, peixes. Do total de todas as espécies validas atualmente, apenas seis são completamente dulcícolas sendo estas restritas a América do Sul (NELSON, 2006).

1.2 PROBLEMAS DE IDENTIFICAÇÃO

Identificação de peixe geralmente é baseada em características morfológicas externos, incluindo o padrão de cores, a forma do corpo, número e posição relativa de aletas, o tamanho escalar, número e tipo de raios da aleta, ou várias medições relativas de partes do corpo (STRAUSS; BOND, 1990). Contudo, em alguns casos, as características morfológicas são limitadas para fins de identificação e diferenciação, mesmo com espécimes inteiros, porque podem ou não mostrar variações intraespecíficas consideráveis ou pequenas diferenças entre as espécies (CALLEJAS; OCHANDO, 2001).

As origens evolutivas dos Pleuronectiformes ainda são incertas, pois não há semelhança transitórias que os ligam com seus ancestrais (Friedman, 2012). Estudos mais recentes utilizando elementos morfológicos de Pleuronectiformes foi feito por Chapleau (1993); de acordo com o autor a Ordem é monofilética, Psettodidae é a família mais primitiva, enquanto Cynoglossidae e Soleidae são os mais derivados. Achiridae, Bothidae, Citharidae, Paralichthyidae, Pleuronectidae e Scophthalmidae são considerados famílias intermediárias.

A cladística apresentada por Chapleau, (1993) aponta o monofilétismo baseado em três sinapomorfias no qual estão associadas com a presença de um *recessus orbitalis*, assimetria craniana adjunta à migração ocular e a posição avançada da barbatana dorsal sobre o crânio. No entanto o monofilétismo dessa ordem não é muito aceito e tem sido questionado em estudos filogenéticos baseados em dados morfológicos e moleculares devido à falta de evidências de sua ancestralidade; estudos apresentados por Nelson, (2006) mostram que as sinapomorfias não são partilhados pelo gênero *Psettodes* e que a única característica que o atrela a ordem é sua assimetria bilateral (CHAPLEAU, 1993; FRIEDMAN, 2012; CAMPBELL *et al.*, 2013; 2014).

Pesquisas recentes apresentadas por Friedman, (2012) mostra que *Amphistium* e o gênero *Heteronectes*, ambos extintos, apresentam evidências morfológicas derivadas dos pleuronectiformes, uma questão muito contestada devido ao valor adaptativo pouco evidente relacionado à sua assimetria. A presença de características anatômicas que sejam informativas para diferenciação a nível de espécie para membros da Ordem Pleuronectiformes representa um grande desafio para os pesquisadores em determinar as interrelações no grupo (FRIEDMAN, 2008; 2012).

1.3 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO

Com a descoberta da estrutura molecular do DNA, por Francis Crick e James Watson em 1953, o campo da genética teve um progresso considerável, contribuindo para a compreensão de processos biológicos ligados à evolução de espécies (TENEVA, 2009). Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

Os primeiros marcadores moleculares, foram desenvolvidos na década de 1960 e eram baseados em enzimas chamadas de alozimas ou isoenzimas (SCHLOTTERER, 2004); no entanto as desvantagens em proporcionar pequena cobertura do genoma e também as modificações pós-tradução das enzimas, produzindo as “isoenzimas conformacionais”, o

polimorfismo enzimático em resposta a condições ambientais e diferenças na atividade isoenzimática associadas ao diferentes estágios de desenvolvimento, impulsionaram, anos depois, o desenvolvimento de marcadores genéticos baseados em DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1988; BORÉM, 1997; FREELAND, 2005).

Como alternativa à análise de proteínas, métodos de identificação baseados em DNA têm sido desenvolvidos, principalmente na última década (TELETCHEA *et al.*, 2005). O DNA apresenta várias vantagens em relação à análise de proteínas pois mesmo que o DNA possa ser alterado por vários tratamentos (conservas, aquecimento), é mais resistente e termossível do que as proteínas e ainda é possível amplificar pequenos fragmentos de DNA, fornece muito mais informações do que as proteínas, pode ser recuperado de qualquer substrato porque está presente em quase todas as células de um organismo (LOCKLEY; BARDSLEY, 2000; TELETCHEA *et al.*, 2005). Os marcadores de DNA podem ser classificados em dois grupos: marcadores dominantes e codominantes; os marcadores dominantes podem obter dados de diversos loci do genoma (ex.: AFLP, RAPD), já os codominantes indicam alelos de um locus específico do genoma (ex.: RFLP, sequência de DNA, microssatélites) (FREELAND, 2005).

1.3.1 Técnicas que utilizam sequenciamento de DNA

1.3.1.1 DNA de código de barras (DNA Barcoding)

Na tentativa de padronizar o marcador utilizado na identificação molecular de espécies animais, Hebert *et al.* (2003) propuseram a criação de um sistema diagnóstico universal, baseado em um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases, a partir da base 58 da extremidade 5' do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI). Localizado no DNA mitocondrial (DNAm), o COI funciona como um “bioidentificador”, semelhante aos códigos de barras universais (CARVALHO, *et al.*, 2008).

O código de barras de DNA (DNA barcoding) segue a mesma ideia do código de barras universal de produtos do mercado varejista, que emprega 10 números alternados em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos (HEBERT, *et al.*, 2003). No caso do DNA barcoding, pode haver até quatro possibilidades de nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e timina) em cada posição, mas com uma cadeia de sítios mais longa que 11 posições (HEBERT, *et al.*, 2003). Conservativamente, a combinação de apenas 15 dessas posições de nucleotídeos, criaria um bilhão de códigos únicos, um número muito maior do que o de

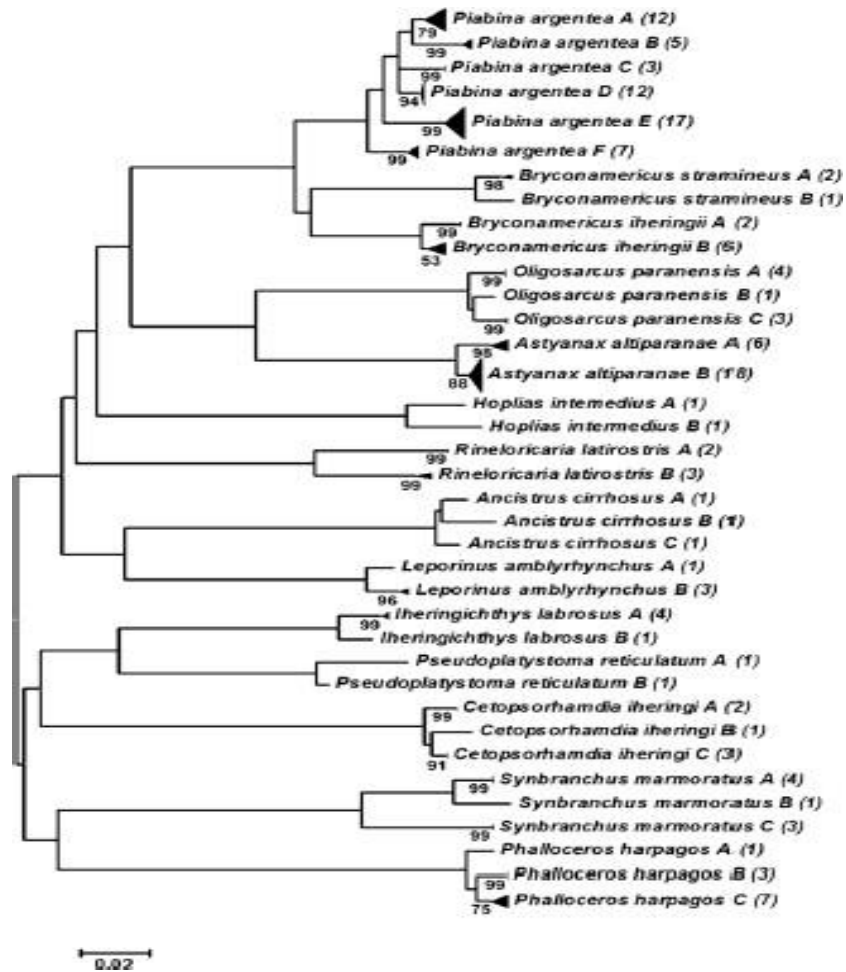
espécies conhecidas, aproximadamente 15 milhões. Isso permitiria que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de DNA barcoding (HEBERT, *et al.*, 2003).

O uso do DNA barcode tem sido muito eficaz na identificação de espécies de diversos grupos de artrópodes, aves, peixes e anfíbios (HEBERT, *et al.*, 2003; 2004; WARD *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2008). A taxa de evolução molecular do COI permite distinguir espécies próximas e também grupos filogeográficos dentro de uma mesma espécie (HEBERT, *et al.*, 2003; 2004; WARD, *et al.*, 2005). De acordo com Hebert, *et al.* (2003), o DNA barcoding também pode ser utilizado para identificação de espécies crípticas, descobrimento de novas espécies, identificação de formas juvenis e adultas de uma mesma espécie e a identificação de espécies a partir de fragmentos de material biológico.

Além disso a utilização do DNA barcoding para identificação de peixes está sendo muito utilizado por possuí grande importância, até mesmo econômica pois proporciona a detecção de fraude ou substituição de espécies em operações comerciais (SMITH, *et al.*, 2008). A identificação por DNA barcoding utilizando a sequência do COI também é capaz de fornecer a distribuição da divergência genética das espécies (PEREIRA, *et al.*, 2013) (Figura 3).

No entanto, a utilidade da técnica é bastante debatida entre os taxonomistas (GREGORY, 2005), pois estudos demonstraram que as sequências de DNA mitocondrial (DNAm) isoladas podem ser insuficientes para diagnosticar espécies, uma vez que a diferenciação genética não necessariamente acompanha os limites das espécies (AVISE, 2000; 2004). Conforme afirmado por Hebert, *et al.* (2004) um comprimento de sequência pré-ordenado pode ou não fornecer informações suficientes para a identificação de espécies devido à variação nas taxas de evolução molecular entre os grupos. Além disso, mesmo a seleção de uma parte ostensivamente informativa de um gene mitocondrial é problemática, isso ocorre porque o genoma mitocondrial herdado pela mãe classifica independentemente do genoma nuclear (que contém a maioria das linhagens definidoras de informação genética) (WILL; RUBINOFF, 2004). Portanto, um estudo baseado unicamente em dados mitocondriais limitados (sem mesmo o aparato de algum conhecimento morfológico) pode apenas refletir o padrão de herança do genoma mitocondrial e não o do indivíduo como um todo, devido a diferenças entre a classificação das espécies e a triagem de genes (AVISE, 2000).

Figura 3 - Arvore de agrupamento de vizinhos mostrando indivíduos com distancia genética acentuada.



Fonte: (PEREIRA *et al.*, 2013).

Segundo Hebert e Gregory (2005), existem inúmeras vantagens do uso desta ferramenta molecular para taxonomia tradicional e para ciência como um todo, uma vez que os dados uma vez obtidos serão arquivados e terão um legado com grande durabilidade, sendo acessível para diferenciação de espécies.

A acessibilidade o baixo custo e rapidez, além de não necessitar de taxonomistas especialistas para obtenção desta região do DNA tornam-se pontos positivos na utilização do DNA barcoding (FREZAL; LEBLOIS, 2008). Embora seja necessária uma identificação morfológica feita previamente (GOLDING, *et al.*, 2009). Contudo as sequências de código de barras são, em geral, curtas (cerca de 500-1000pb) e isso limita fundamentalmente sua utilidade na resolução de ramificações profundas (entre Ordens ou Filos) em filogenias; existe alguma controvérsia sobre o valor do DNA barcoding, em grande parte devido à percepção de que esse método de identificação diminuirá ao invés de aumentar a taxonomia tradicional baseada em morfologia e as determinações de espécies baseadas unicamente na

divergência genética podem resultar em reconhecimento incorreto de espécies (ALI, *et al.*, 2014).

Estudos realizado por Ward *et al.* (2005) concluíram que o DNA barcoding pode ser usado com confiança na identificação de espécies de peixes teleósteos e cartilagosos empregando-se sequências do gene COI. Em pesquisa realizada por Ward; Holmes (2007) a utilização do DNA barcoding permitiu a identificação correta de 388 espécies de peixes de ordens diferentes também foi verificado que a distinção de espécies só foi possível devido à presença de alta taxa de substituição na terceira posição do códon que gera mutações sinônimas com maior frequência que as não sinônimas, mantendo conservada a cadeia de aminoácidos (WARD; HOLMES, 2007).

1.3.2 Técnicas que não necessitam de sequenciamento de DNA

1.3.2.1 Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP)

Os primeiros marcadores difundidos que quantificaram a variação nas sequências de DNA (em oposição às proteínas) foram o polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) (FREELAND, 2005). O RFLP foi desenvolvido pela primeira vez em 1980 (BOTSTEIN *et al.*, 1980; SCHIMENTI, 1998) para visualizar as diferenças da estrutura do DNA com base no uso de enzimas de restrição bacteriana que cortaram o DNA em locais com características específicas sequências de nucleotídeos (MBURU; HANOTTE, 2005).

O RFLP é baseado na análise de padrões derivados de uma sequência de DNA digerida com enzimas de restrição (TENEVA, 2009). Marcadores RFLP podem ser obtidos de diferentes genes ou regiões genômicas, inclusive do DNA ribossomal (DNA_r) de mitocôndrias (DNA_{mt}) e Cloroplasto (DNA_{cp}) (AVISE, 1993). Para obtenção do RFLP o DNA é extraído e tratado com enzima de restrição que o corta em um grande número de pontos (sítios de restrição), dependendo do tamanho do genoma gera uma significativa quantidade de fragmentos (FISCHER; FISCHER, 2012).

As diferenças na sequência de DNA dos indivíduos resultam na clivagem de fragmentos de tamanhos distintos, que são separados através de eletroforese em gel de agarose; para efetuar a detecção dos marcadores RFLP, os fragmentos destacados no gel pela eletroforese são transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose através de um processo denominado Southern Blot. Os fragmentos são fixados, covalentemente, na membrana através de alta temperatura em forno a vácuo ou com luz ultravioleta (Figura 4)

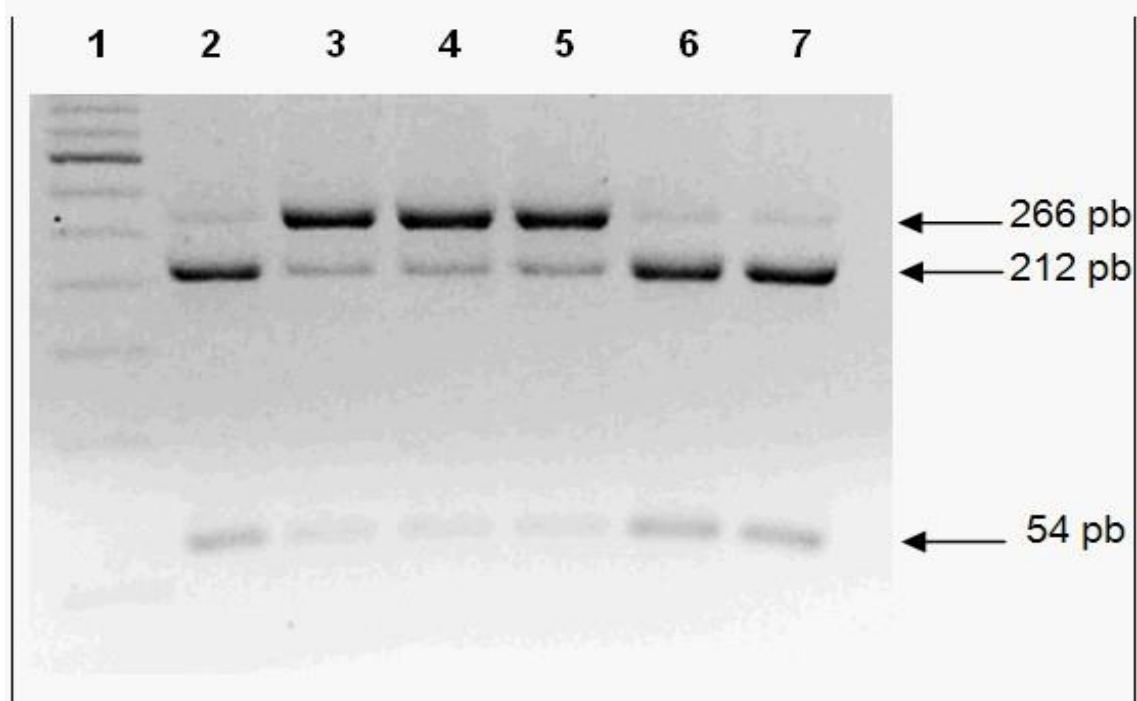
(FISCHER; FISCHER, 2012; ESPERÓN, *et al.*, 2013).

Através da hibridização de pequenos fragmentos clonados de DNA (sonda) com sequências complementares imobilizado na membrana e possível visualiza os fragmentos polimórficos entre os inúmeros fragmentos transferidos para ela; assim, somente os fragmentos fixados na membrana, que são complementares ao DNA da sonda, serão visualizados entre os milhares de fragmentos resultantes do corte com enzima de restrição (FISCHER; FISCHER, 2012). Atualmente os marcadores de RFLP são mais amplamente aplicados no mapeamento do genoma, nos estudos de reprodução auxiliada por marcadores, sistemáticos e de evolução (TENEVA, 2009).

O RFLP foi a forma predominante de variação de DNA utilizada em análises moleculares até o advento da PCR (BISEN, 2014). Para utilizar a PCR sem iniciadores específicos de espécies, foi necessário utilizar uma técnica discriminatória secundária, como RFLP; a análise RFLP de produtos de PCR tem sido amplamente utilizada para a discriminação de espécies e um único par de iniciadores pode produzir um fragmento que pode ser usado para a identificação de múltiplas espécies com escolha criteriosa de enzimas de restrição (GIL, 2007).

Por apresentar técnicas genéticas simples e rápidas, a PCR-RFLP ganhou aceitação entre os métodos de identificação de espécies de peixe, uma vez que é muito mais fácil de executar e menos dispendiosa do que as convencionais de sequenciação de DNA e análise da sequência de nucleotídeos (MEYER, *et al.*, 1995). O RFLP é vantajoso por ser uma ferramenta molecular barata, rápida, fácil de projetar, simples e precisa para o perfil e identificação da população; não necessita de nenhuma informação de sequência anterior, nem síntese de oligonucleotídeos. Além disso, em alguns casos, pode não ser viável desenvolver um protocolo de PCR para detectar uma forma particular de variação alélica (BISEN, 2014; RASMUSSEN, 2012; MARTYA, *et al.*, 2012). As desvantagens principais são que a digestão incompleta pode ocasionalmente ocasionar variações e intraespecíficos poderia eliminar ou criar locais de restrição adicionais; além disso, sua dependência de enzimas de restrição requer conhecimento prévio da amostra analisada (LOCKLEY; BARDSLEY, 2000).

Figura 4 - Exemplo de resultado de RFLP submetido a Eletroforese em gel de agarose a 2% (a 250 V durante 40 minutos) do gene VHL amplificado por PCR e digerido com a enzima de restrição SfaI, corado com brometo de etídio.



Fonte: (ESPERÓN, *et al.*, 2013).

1.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) também chamada PCR convencional foi criada por Kary Mullis em 1985 nos Estados Unidos; essa técnica foi uma das grandes responsáveis pelo progresso na área de biomedicina destes últimos 20 anos (MULLIS, 1990). A PCR revolucionou a biologia molecular por promover a replicação do material genético, aumentando a quantidade de DNA para análise e, conseqüentemente, fazendo com que a quantidade de amostra necessária para o teste possa ser menor (CHEMELLO, 2007). Para Fischer; Fischer, (2012) a PCR permiti à amplificação de qualquer tipo de tecido, podendo ser amostra pequena, velha ou degradada. Por ser um processo realizado com variações que incluem altas temperaturas, a PCR é realizada por uma enzima DNA polimerase termoestável, geralmente extraída de microrganismos como a eubactéria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq) (BROWN, 2002).

Para realizar a PCR o fragmento de DNA é misturado com a Taq polimerase, um par de primers e nucleotídeos trifosfatados (STRACHAN; READ, 1999). Os primers ou iniciadores são necessários para principiar a síntese do DNA, que será feita com auxílio da DNA polimerase; eles devem se ligar à seqüência de DNA do lado oposto ao segmento que será

copiado; as sequências desse sítio de ligação devem ser conhecidas para que os primers com a sequência apropriada possam ser sintetizados (STRACHAN; READ, 1999).

A reação ocorre em um aparelho chamado termociclador onde passa por sucessivas alterações de temperatura, direcionando o processo para 3 etapas: desnaturação, hibridização e extensão (CHEMELLO, 2007). O surgimento dessa técnica fez com que as metodologias utilizadas para a identificação se tornassem mais simples, baratas e passíveis de serem aplicadas mesmo quando a quantidade de material (DNA) é extremamente reduzida, como é o caso de pequenas manchas de sangue, saliva, material em estágio avançado de decomposição, etc. (JOBILING; GILL, 2004).

A vantagens da técnica de PCR está na capacidade que esta tem em amplificar uma sequência precisa de DNA ligada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade, especificidade e versatilidade; além disso não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar, uma vez que o produto da PCR é dado pelos *primers*; é uma técnica barata, rápida, segura, e não requer muito espaço em laboratório; em termos de equipamento requer somente um termociclador (DELIDOW, *et al.*, 1993; MIGUEL, 2007). Todavia, a PCR apresenta algumas limitações, tais como, a necessidade de conhecer antecipadamente a sequência de DNA a amplificar, para que possam ser sintetizados *primers* específicos; grande facilidade de contaminação pois se trata de uma técnica muito sensível; pode ocorrer incorporação errada de bases durante a replicação (OLIVEIRA, 2010; MIGUEL, 2007).

1.3.2.3 PCR em Tempo Real

A necessidade de monitoramento simultâneo da quantidade e qualidade do DNA amplificado levou ao desenvolvimento de uma variante da técnica da PCR convencional: a PCR em tempo real (OLIVEIRA, 2010). A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou PCR em tempo real quantitativa ou simplesmente qPCR ou RTQ-PCR, foi descrita por Higuchi e seus colaboradores em 1993; montaram um sistema ao qual vincularam uma câmara de vídeo, de modo a monitorizar a PCR durante todos os ciclos. Este mecanismo permitia-lhes detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas (HIGUCHI, *et al.*, 1993).

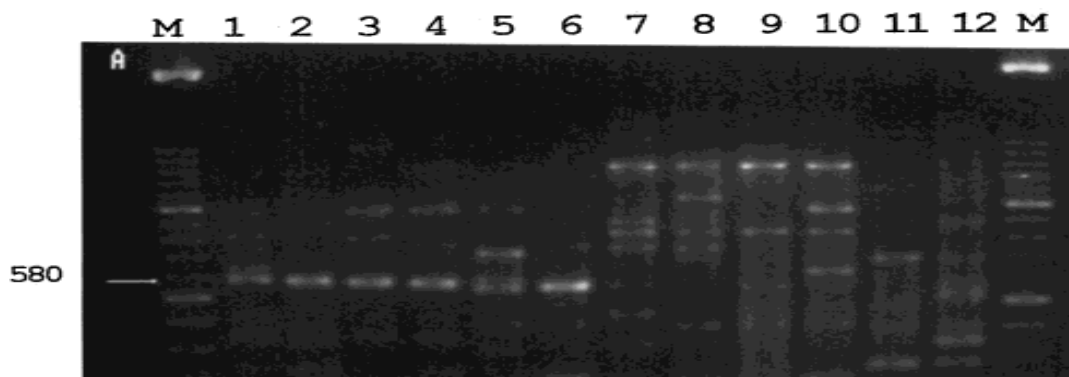
1.3.2.4 DNA Polimórfico Amplificado Aleatório (RAPD)

O avanço de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a ideia de se utilizar primers mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de sequência (WILLIAMS, *et al.*, 1990). O DNA polimórfico amplificado aleatório (RAPD) também é conhecido como PCR iniciada arbitrariamente (AP-PCR), ou como técnica de impressão digital de amplificação de DNA (DAF) (WILLIAMS, *et al.*, 1990).

Esta técnica baseia-se no uso de primers curtos e arbitrários na reação de PCR e pode ser usada para produzir perfis de DNA relativamente detalhados e complexos para a detecção de polimorfismos de comprimento de fragmento amplificados entre organismos no formato mais simples, é utilizado apenas um oligonucleotídeo curto, geralmente de oito a dez nucleotídeos de comprimento. (CAETANO; GRESSHOFF, 1998). A obtenção desses marcadores envolve a extração e amplificação do DNA, eletroforese normalmente em gel de agarose corado com brometo de etídio e foto documentação sob luz ultravioleta (FALEIRO, 2007) (Figura 5).

Segundo Vignal *et al.* (2002) e Mburu & Hanotte (2005), as vantagens dos marcadores RAPD são as seguintes: custo efetivo; simples e rápido, um grande número de bandas são produzidas, nenhum conhecimento de sequência anterior é necessário, as amostras necessárias são muito pequenas porque o DNA será amplificado pela técnica de PCR. As desvantagens estão ligados à dominância dos marcadores, não diferenciando os *locos* em heterozigose dos *locos* em homozigose e à baixa reprodutibilidade das marcas por causa da sensibilidade da técnica às condições experimentais, principalmente, quando elas não estão bem padronizadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, *et al.*, 2001).

Figura 5 - Exemplo de resultado de marcadores RAPD em 1,5% de géis de agarose



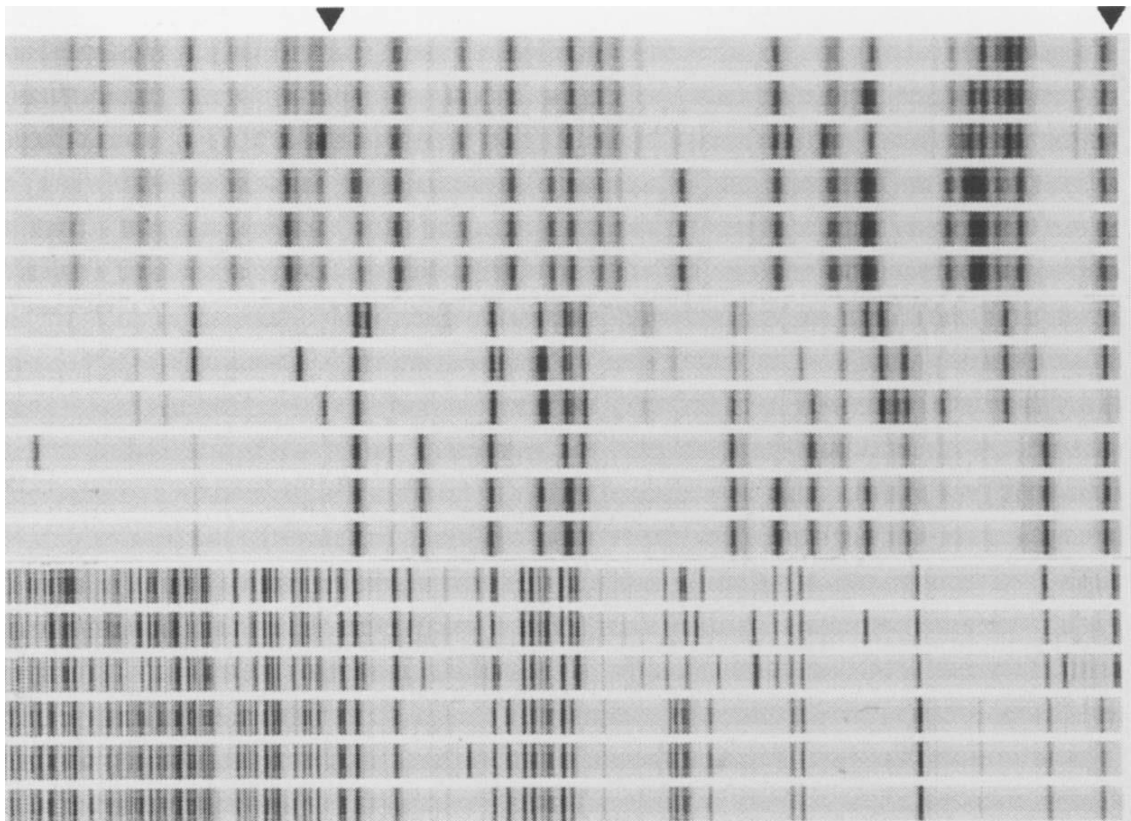
Fonte: (REGO, *et al.*, 2002).

1.3.2.5 Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

Os AFLPs são fragmentos de DNA (80 a 500 pb) adquiridos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguidos da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR (VOS, *et al.*, 1995). Esse tipo de marcador combina os princípios dos marcadores RAPD e RFLP; as etapas de obtenção envolvem a extração do DNA, digestão com endonucleases de restrição, ligação de adaptadores, amplificação seletiva via PCR, eletroforese em géis de alta resolução e visualização dos fragmentos por autorradiografia, coloração com prata ou fluorescência (Figura 6) (VOS, *et al.*, 1995; JANSSEN, *et al.*, 1996).

As principais vantagens dos AFLPs são a geração de grande número de polimorfismos por reação e o fato de não haver necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção dos primers utilizados (FALEIRO, *et al.*, 2001). As desvantagens são a dominância dos marcadores, o alto custo e as várias etapas e reagentes necessários à obtenção dos marcadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Figura 6 - Exemplo de padrões de AFLP digitalizados obtidos a partir do DNA genômico de seis X de cepas de vasícula



Fonte: (JANSSEN, *et al.*, 1996).

1.4 DNA RIBOSSÔMICO (rDNA) GENE 5S

A organização dos genes ribossômicos inclui uma transcrição seguida por uma região não transcrita disposta em conjunto dentro da região organizadora nucleolar (NOR), cujos números variam entre os organismos. Na maioria dos eucariotas, esses genes são classificados em 2 grupos diferentes de multigenes distintos que compreendem as chamadas repetições de rDNA 45D e 5S (BARCISZEWSKA, 2001; PINHAL, *et al.*, 2011). As repetições de 45D rDNA contêm os genes que são transcritos em 18S, 5.8S e 26S-28S rRNA e espaçadores (IGS, ITS1 e ITS2), enquanto que 5S rDNA codifica a região de transcrição 5S rRNA com 120pb altamente conservada devido à sua função essencial na estabilização da estrutura ribossômica e ao aumento da atividade da peptidil transferase; essa região transcrita é adjacente a um Espaçador Não Transcrito (NTS) que varia em comprimento entre as espécies, esta região do NTS possui uma taxa de mutação maior do que a região transcrita. (LONG; DAWID, 1980; NEDERBY, 1993; BARCISZEWSKA, 2001).

A região do NTS é considerada apropriada para estudos genéticos baseados em PCR, devido a uma série de considerações, que incluem: o gene é altamente conservado, mesmo em espécies distantes, permitindo os isolamentos de suas repetições em diferentes espécies usando análise por PCR; dado o seu tamanho relativamente pequeno e arranjo em tandem, as repetições podem ser isoladas a partir de DNA de qualidade reduzida (MARTINS; WASKO, 2004). Uma característica comum do rDNA 5S é múltiplas repetições de matriz em tandem, em um ou vários locais cromossômicos ao longo do genoma; além disso, o rDNA 5S foi relatado como sendo relacionado a outros genes ou organizado como uma propagação de cópias adicionais (DROUIN; MONIZ, 1995; MARTINS; WASKO, 2004). Estudos em diversos organismos evidenciaram que, predominantemente, as variações do rDNA 5S estão presentes nos NTSs e são caracterizadas como fruto de inserções, deleções, mini repetições e pseudogenes nessas regiões que, por não estarem envolvidas diretamente na transcrição, não sofrem com as pressões de seleção e essas variações podem ser interespecífica, sugerindo uma rápida evolução para estas sequências (SADJAK *et al.*, 1998; SUZUKI; SAKURAI; MATSUDA, 1996).

A organização do rDNA 5S podem fornecer dados úteis para a compreensão da organização do genoma e a dinâmica de sequências repetitivas e também fornecer marcadores genéticos para a identificação de espécies, subespécies, população e híbridos (MARTINS; WASKO, 2004). Do mesmo modo diferentes padrões de organização do genoma das repetições em tandem 5S rDNA têm sido úteis como marcadores genéticos em estudos

evolutivos e também em abordagens práticas para a discriminação de espécies de peixes (PENDÁS, *et al.*, 1994; SAJDAK, *et al.*, 1998 ; CÉSPEDES, *et al.*, 1999; ASENSIO, *et al.*, 2001), mesmo para espécies do mesmo gênero (PEREZ; GARCIA-VÁZQUEZ, 2004; ARANISHI, 2005).

O gene 5S rDNA tem sido amplamente utilizado para a identificação de espécie, devido à sua estrutura notável, permitindo a identificação de espécies direta por amplificação por PCR, sem a necessidade de sequenciação mais tarde ou digestão com enzimas de restrição (SASTRI, *et al.*, 1992). O uso das repetições do rDNA 5S apresenta algumas vantagens sobre os demais marcadores disponíveis, pois a presença de sequências codificantes, conservadas, flanqueando regiões variáveis dos NTSs, favorece a aplicação da técnica de PCR e, conseqüentemente, o isolamento dos NTSs das mais diferentes espécies sem um conhecimento prévio do genoma da espécie em questão. (MARTINS; WASKO, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

Devido à grande similaridade morfológica entre as espécies de linguados da Ordem Pleuronectiformes, a necessidade de utilização de metodologias alternativas a discriminação das espécies se faz necessária. Adicionado a isso, a falta de sistematas, bem como a distribuição simpátrica entre as espécies muitas vezes podem acarretar e até aumentar problemas de identificação da fauna de uma determinada região. Metodologias de identificação de baixo custo, como PCR aliada a um marcador variável, podem fornecer informações importantes sobre a diversidade de espécies, funcionando como uma ferramenta de indicação de espécies que necessitem uma revisão sistemática mais apurada. Desta forma a aplicabilidade de regiões como o 5S RNA se faz necessária para diagnóstico de espécies em uma região de riqueza ambiental como o Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Testar a utilidade do gene ribossomal 5S rRNA, na discriminação molecular de diferentes espécies da Ordem Pleuronectiformes coletados em diferentes regiões brasileiras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o gene 5S rRNA funciona como marcador variável de baixo custo para Ordem Pleuronectiformes;
- Verificar se não existe Variabilidade intraespecífica dentro das espécies amostradas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM E MÉTODOS MOLECULARES

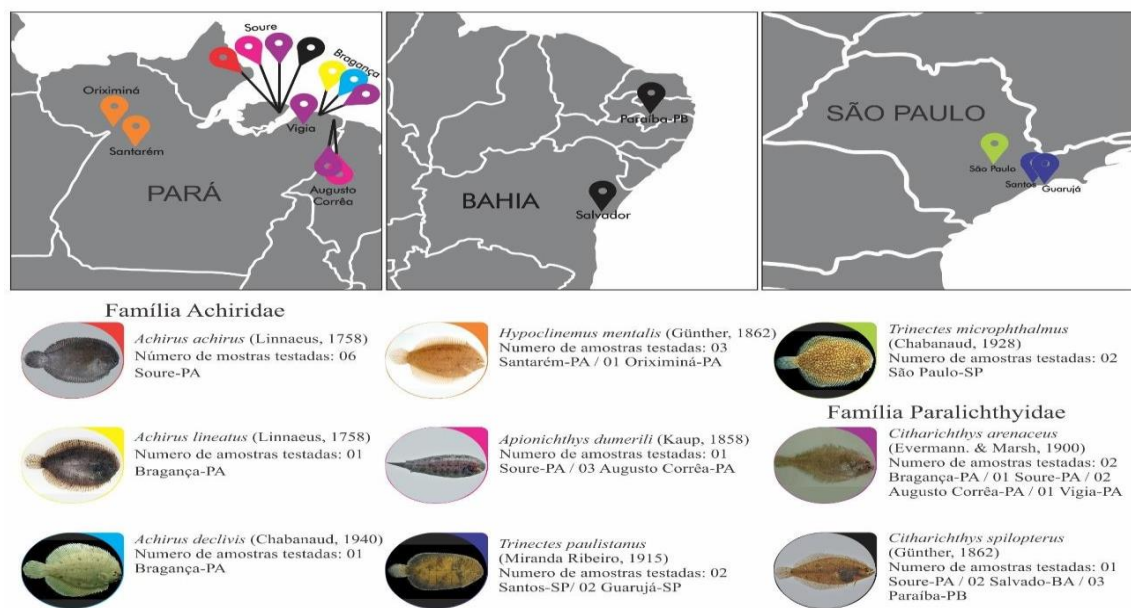
No presente estudo foram utilizadas 9 espécies de peixes planos de duas famílias diferentes, Achiridae e Paralichthyidae, coletadas em diferentes pontos ao longo da costa brasileira (Tabela I). Os espécimes foram previamente identificados seguindo a chave morfológica especial para o grupo (FIGUEIREDO; MENEZES, 2000). Após identificação morfológica, tecido muscular foi retirado e preservado em etanol 100%, além de ser mantido em freezer a -4°C antes do início das análises. O DNA foi extraído segundo o protocolo padrão de fenol-cloroformio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Tabela 1 - Famílias, espécies, quantidade de amostras utilizadas e localidade de coleta dos peixes planos utilizados no presente estudo.

Família	Espécie	Número de amostras testadas	Ponto de coleta
Achiridae	<i>Achirus achirus</i> (Linnaeus, 1758)	6	Soare, Pará
	<i>Achirus lineatus</i> (Linnaeus, 1758)	01	Bragança, Pará
	<i>Achirus declivis</i> (Chabanaud, 1940)	06	Bragança, Pará
	<i>Hypoclinemus mentalis</i> (Günther, 1862)	03/01	Santarém / Oriximiná, Pará
	<i>Apionichthys dumerili</i> (Kaup, 1858)	01/03	Soare/ Augusto Corrêa, Pará
	<i>Trinectes paulistanus</i> (Miranda Ribeiro, 1915)	02/02	Guaruá/Santos, São Paulo
	<i>Trinectes microphthalmus</i> (Chabanaud, 1928)	02	São Paulo
Paralichthyidae	<i>Citharichthys arenaceus</i> (Evermann. & Marsh, 1900)	02/01/02/01	Bragança/ Soare/ Augusto Corrêa/ Vigia, Pará
	<i>Citharichthys spilopterus</i> (Günther, 1862)	01/02/03	Soare/ Salvador/ Paraíba

Fonte: (FIGUEIREDO; MENEZES, 2000)

Figura 7: Distribuição geográfica de espécies de duas Famílias da Ordem pleuronectiformes, coletados em diferentes regiões no Brasil.



Fonte: (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

O gene 5S rDNA foi amplificado usando os seguintes primers: 5SA (5'-TACGCCCATCTCGTCCGATC-3') e 5SB (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-

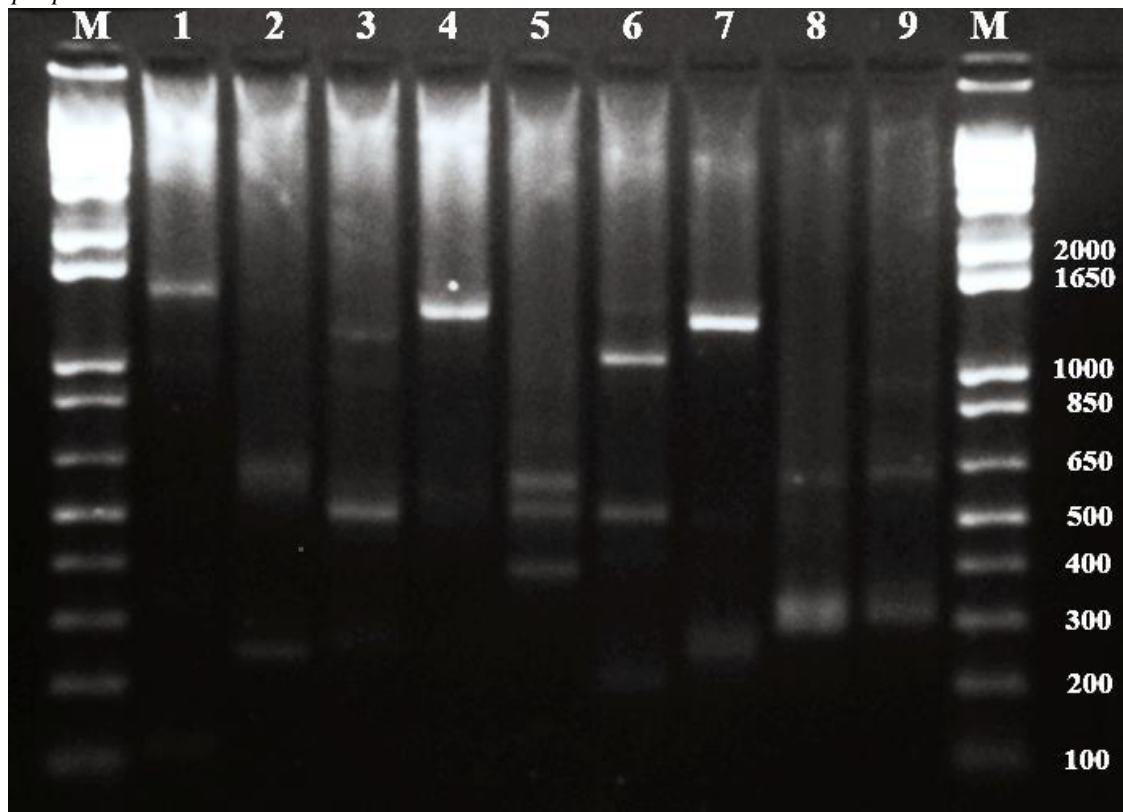
3') (Pendás *et al.*, 1994). As reações de PCR continham 25µl, consistindo de uma mistura de 0.5 µl de cada primer (5SA 5pmol/µl, 5SB 5pmol/µl), 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 4 µl da mistura de dNTP (1.25mM), 5.0 µl de buffer 5x (Promega, Madison-WI USA-Tris-HCl e KCl, pH de 8.5), 0.2 µl de *Taq* polymerase (5U/ µl, Promega, Madison-WI USA), aproximadamente 100 ng de DNA total e água ultrapura para completar o volume final. O protocolo de amplificação segue os padrões de (SALES *et al.* 2010). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1.5% (agarose D-1 Low EEO, CONDA Laboratórios), corados previamente com 2 µl de brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad-CA USA). Os parâmetros de migração foram os seguintes: $V=60$, $mA=200$ e $W=120$ durante 60 minutos. Outras concentrações de gel de agarose foram testadas (1 e 2%), não interferindo nos padrões de bandas obtidos.

Após a migração em eletroforese, o gel foi visualizado e fotodocumentado utilizando transiluminador de UV Vilber Lourmat (Vilber Lourmat, Marne-la-Valée- França), acoplado a uma câmera IEEE 1394 (KODAK Gel Logic 112 Imaging System, CARESTREAM HEALTH, INC. Rochester-NY, USA). Juntamente com as amostras, foi utilizado uma escada molecular (1 kb Plus DNA Ladder Life Technologies, Inc. Carlsbad- CA USA) para estimativa de comprimento das bandas observadas.

5 RESULTADOS

Através do uso do gene 5S rDNA, foi possível identificar as 9 espécies de peixes planos pertencentes a duas famílias diferentes utilizadas no presente estudo (Figura 8).

Figura 8 - Gel de agarose a 1.5% mostrando o padrão de bandas apresentado pelas 9 espécies de linguados analisados no presente estudo. Da esquerda para a direita: 1 = *H. mentalis*; 2 = *A. achirus*; 3 = *A. lineatus*; 4 = *A. declives*; 5 = *A. dumerilli*; 6 = *T. paulistanus*; 7 = *T. microphthalmus*; 8 = *C. arenaceus*; 9 = *C. spilopterus*.



Fonte: (SALES *et al.* 2010)

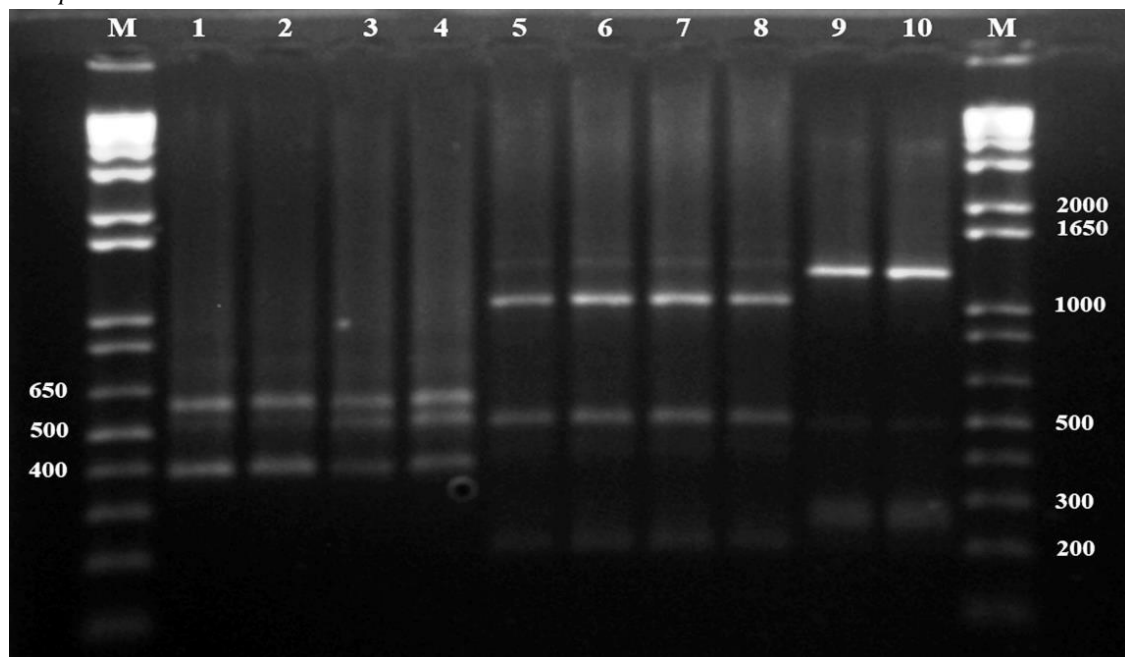
Os comprimentos de banda variaram entre 100 a aproximadamente 1500 pares de base. Dentro das espécies da família Achiridae utilizadas no presente estudo, *Hypoclinemus mentalis* apresentou 3 bandas, a primeira com 150 pb, a segunda com 1000 pb e a terceira com aproximadamente 1500 pb. Das espécies de gênero *Achirus* utilizadas no presente estudo, *Achirus achirus* apresentou duas bandas sendo a primeira espécie com 250 pb e 550 pb. *Achirus lineatus* apresentou um padrão com 3 bandas com 260, 500 e aproximadamente 1300 pb. *Achirus declives* foi a única espécie do gênero a apresentar apenas uma banda com aproximadamente 1400 pb.

Assim como *A. lineatus*, *Apionichthys dumerilli* também apresentou 3 bandas, com 390, 500 e 550 pb. As duas espécies do gênero *Trinectes* utilizadas no presente estudo, *Trinectes*

paulistanus e *Trinectes microphthalmus*, apresentaram padrões bem distintos, onde *T. paulistanus* apresentou 4 bandas com 200, 500, 1000 e 1300 pb. *T. microphthalmus* apresentou apenas 3 bandas com 250, 500 e aproximadamente 1250 pb. As duas espécies da família Paralichthyidae pertencentes ao gênero *Citharichthys*, utilizadas no presente estudo, apresentaram padrões bastante similares, diferindo apenas pelo fato de *Citharichthys arenaceus* apresentar 1 banda a menos do que *Citharichthys spilopterus*. *C. arenaceus* possui bandas com 300 e 550 pb enquanto *C. spilopterus* possui uma banda a mais com 850 pb (300, 550 e 850 pb).

Todas as espécies utilizadas no presente estudo apresentaram o mesmo padrão de bandas entre elas. Desta forma, não existem variações intraespecíficas que possam inviabilizar a utilização do gene 5S rRNA para discriminação das espécies (Figura 9).

Figura 9 - Gel de agarose a 1.5% mostrando o padrão de conservação intraespecífica de três amostras de linguados analisadas no presente estudo. Da esquerda para direita: 1-4 = *A. dumerilli*; 5-8 = *T. paulistanus*; 9-10 = *T. microphthalmus*.



Fonte: (SALES *et al.* 2010)

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, confirmam a efetividade do gene 5S rDNA como ferramenta para identificação de espécies da Ordem Pleuronectiformes. A amplificação por PCR do rDNA 5S permitiu a identificação das 9 espécies de linguados utilizados no presente trabalho, demonstrando padrões de bandas distintos entre elas (Figura 8). Resultados semelhantes utilizando a mesma técnica foram obtidos em estudos que identificaram subespécies de ratinhos, espécies de peixes, e plantas (CÉSPEDES *et al.*, 1999; LINDER; MOORE & JACKSON, 2000; SUZUKI; MORIWAKI & SAKURAI, 1994).

Céspedes *et al.* (1999), utilizou o gene 5S rDNA para diferenciação de duas espécies de grande valor comercial de peixes planos (*Solea solea* e *Reinhardtius hippoglossoides*), onde foram obtidos padrões de bandas bastante distintos entre as duas espécies utilizadas. Assim como outros estudos baseados na identificação de espécies envolvendo o gene 5S rDNA, no presente estudo as espécies de peixes planos utilizados apresentaram diferenças significantes entre os padrões de bandas obtidos de cada espécie, além do fato de separar as espécies marinhas (*A. achirus*, *A. declives*, *A. lineatus*, *T. paulistanus* e *T. microphthalmus*) das espécies de água doce (*H. mentalis*, *A. dumerili*, *C. arenaceus* e *C. spilopteros*). Importante também enfatizar que não houve variação intraespecífica dentro das espécies utilizadas, mesmo quando estas provinham de regiões diferentes. Este padrão também tem sido observado em vários outros estudos que utilizaram o mesmo marcador (MARTINS; GALETTI-JR, 2001;. MARTINS; WASKO, 2004; MARTINS *et al.*, 2002;.KARAIKOU *et al.*, 2003; PINHAL, ARAKI, GADIG, & MARTINS, 2009).

Além disso, estudo apresentado por Pendás *et al.* (1994) mostrou que produtos de PCR amplificados de rDNA 5S permitiu discriminar claramente o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), a truta (*Salmo trutta*), e híbridos. Várias espécies de peixes neotropicais do gênero *Brycon* (WASKO *et al.*, 2001) e *Solea Solea* e *Reinhardtius hippoglossoides* (CÉSPEDES *et al.*, 1999) também mostram padrões específicos para cada espécie.

Sales *et al.* (2011) analisando espécies de lulas de duas famílias diferentes, encontrou indícios que aparentemente, cada família apresenta padrões de bandas em comum. No presente estudo, apenas *A. declives* e *H. mentalis* não apresentaram bandas em comum com as outras espécies da família Achiridae utilizadas no presente estudo, onde todas as outras 5 espécies possuíam banda com 500 pb. As duas espécies da família Paralichthyidae possuíam em comum duas bandas com 300 e 550 pb, diferindo apenas pela presença de um banda de 850 pb em *C. spilopterus*. O fato da organização do gene 5S rDNA não apresentar

polimorfismo intraespecífico e ao mesmo tempo alta variabilidade interespecífica, o torna um candidato muito bom para separar espécies muito proximamente relacionadas (KARAISSKOU *et al.*, 2003).

Importante também frisar que os padrões obtidos pelas espécies da família Achiridae no presente estudo (*T. paulistanus* x *T. microphthalmus*) apresentaram certa similaridade com a presença de bandas próximas, ambas com grande peso molecular (1300 bp para *T. paulistanus* e aproximadamente 1250 bp para *T. microphthalmus*). Com relação às espécies do gênero *Achirus*, *A. lineatus* e *A. declives*, bem como *A. achirus* e

H. mentalis, dados moleculares prévios indicam que estas espécies são espécies irmãs, sendo geneticamente mais similares umas das outras, mesmo elas não tendo apresentado padrões de bandas similares entre si no presente estudo.

Os resultados do presente estudo enfatizam ainda mais a eficiência do gene rDNA 5S como ferramenta para a identificação e até mesmo discriminação de espécies morfológicas semelhantes, tal como proposto por PENDÁS, *et al.* (1994), CÉSPEDES, *et al.*, (1999) e PINHAL, *et al.*, (2008). A amplificação por PCR de repetições de rDNA 5S representa, portanto, uma metodologia potencial e simples que pode ser aplicada para identificar várias espécies de peixes.

7 CONCLUSÃO

A comprovada eficácia do gene 5S rDNA para identificação de espécies de peixes, ressalta a importância da região para estudos genéticos. A utilização da ferramenta forneceu informações necessárias para identificar e até mesmo diferenciar espécies sendo uma forte ferramenta para identificar espécies que não são alvo de captura comercial. Com isso nota-se que os objetivos do presente estudo foram alcançados, ressaltando ainda mais a relevância do gene 5S rDNA.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. A.; GYULAI, G.; HIDVE'GI, N.; KERTI, B.; HEMAID, F. M. A.; PANDEY, A. K. & LEE, J. The changing epitome of species identification – DNA Barcoding. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 21:204-231. 2014.
- ARANISHI, F. PCR–RFLP analysis of nuclear nontranscribed spacer for mackerel species identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53:508–511. 2005.
- ASENSIO, L.; GONZÁLEZ, I.; FERNÁNDEZ, A.; CÉSPEDES, A.; RODRÍGUEZ, M. A.; HERNÁNDEZ, P. A. & GARCIA, T. Identification of Nile Perch (*Lates niloticus*), Grouper (*Epinephelus guaza*), and Wreck fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. **Journal of AOAC International**, 84:777- 781. 2001.
- AVISE, J. C. Molecular markers, natural history, and evolution. **Sinauer Associates**, Sunderland, MA. New York. 2004.
- BARCISZEWSKA, M. Z.; SZYMANSKI, M.; ERDMANN, V.A. & BARCISZEWSKI, J. Structure and function of 5S rDNA. **Acta Biochim Pol.**, 48:191-8. 2001.
- BERENDZEN, P. B. & DIMMICK, W. W. 2002. Phylogenetic relationships of Pleuronectiformes based on molecular evidence. **Copeia** 2002:642-652.
- BISEN, P. S. **Protocols in Applied Life Sciences**. New York: 1^a ed. CRC Press. 2014. 1826p.
- BITENCOURT, J. A. **Análise das relações evolutivas e filogenéticas da família Achiridae (Teleostei: Pleuronectiformes) a partir de marcadores citogenéticos e moleculares.** . 2015. 106f. Tese de Doutorado, Unversidade Federal do Pará, Bragança, 2015
- BONECKER, A. C. T.; NAMIKI, C. A. P.; CASTRO, M. S. & CAMPOS, P. N. Ordem Pleuronectiformes. In: **Catalogo dos estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes da bacia de Campos**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. pp. 266-275.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Ed. UFV. 1997. 547p
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M. & DAVIS R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human. Genetics**, 32: 314-331. 1980.
- BROWN, T. A. **Genomes**. Oxford: 2^a ed. Wiley-Liss. 2002. 572p.

CAETANO, A. G.; GRESSHOFF, P. M. **DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews.** New York: 1ª ed. Wiley-Liss. 1998. 364p.

CALLEJAS, C. & OCHANDO, M. D. Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (*Cyprinidae*) in the Iberian Peninsula. **Journal of Fish Biology**, 59:1589–1599. 2001.

CAMPBELL, M. A.; LÓPEZ, J. A.; SATOH, T. P. & CHEN, W. J. Are flatfishes (Pleuronectiformes) monophyletic. **Mol Phylogen Evol.**, 69:664–673. 2013.

CAMPBELL, M. A.; LÓPEZ, J. A.; SATOH, T. P.; CHEN, W. J. & MIYA, M. Mitochondrial genomic investigation of flatfish monophyly. **Gene**, 551:176-182. 2014.

CARPENTER, K. E. **The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic.** Rome; FAO. 2002.

CARVALHO, D. C. de; SEERIG, A.; MELO, D. C. de; SOUSA, A. B. de; PIMENTA, D. & OLIVEIRA, D. A. A. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.215-219. 2008.

CERQUEIRA, V. R.; MIOSO, R.; MACCHIAVELLO, J. A. G. & BRÜGGER, A. M. Ensaios de indução de desova do linguado (*Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839). **Boletim do Instituto de Pesca**, 24, 247-254. 1997.

CÉSPEDES, A.; GARCIA, T.; CARRERA, E.; GONZALEZ, I.; FERNANDEZ, A.; HERNANDEZ, P. E. & MARTIN, R. Identification of *sole* (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: 1046-1050. 1999.

CHAPLEAU, F. Pleuronectiform relationships: a cladistic reassessment. **Bulletin of Marine Science**, 52:516-540. 1993.

CHEMELLO, E. Ciência Forense: exame de ADN. **Revista Química Virtual**. 2007. 15p.

CHIRICHIGNO, N. F. Lista sistemática de los peces marinos comunes para Ecuador- Peru - Chile. CONFERENCIA SOBRE EXPLOTACION Y CONSERVACION DE LAS RIQUEZAS MARITIMAS DEL PACIFICO SUR. CHILE-ECUADOR-PERU. 1974. **Anais...**Secretaria General, Lima. 1974.

COIMBRA, Y. L. **Análise filogenética da família Achiridae (pleuronectiformes), baseada em seqüências dos genes 12S, 16S e tmo.** 2010. 64f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém. 2010.

DELIDOW, B. C.; LYNCH, J. P.; PELUSO, J. J. & WHITE, B. A. PCR protocols: current methods and applications. In: WHITE B. A. **Methods in Molecular Biology**. 1ª ed. New Jersey: Humana Press. 1993. p. 1-30.

DROUIN, G. & MONIZ DE SÁ M. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. **Mol Biol Evol.**, 12:481-493. 1995.

DUDU, A.; BARBALATA, T.; POPA, G. O.; GEORGESCU, S. E. & COSTACHE, M. Advantages and Limitations of DNA Barcoding in Identifying Commercially- Exploited Fish Species. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, 49:45- 49. 2016.

DUPLAIN, R. R.; CHAPLEAU, F. & MUNROE, T. A. A new species of *Trinectes* (Pleuronectiformes: Achiridae) from the Upper Río San Juan and Río Condoto, Colombia. **Copeia**, 3:541-546. 2012

ESPERÓN, A. A.; HECHAVARRÍA, I. N. & NAVARRO L. R. Introducción de la técnica PCR-RFLP para el diagnóstico de dos mutaciones en el gen VHL. **Medisur**, 11:361-7. 2013.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2007.102p.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIRES, J. L.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G.; GRAMACHO, K. P.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R. & VALLE, R. R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotrópica**, 13:79-86. 2001.

FERGUSON, A.; TAGGART, J. B.; PRODHÖL, P. A.; MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P. & HYNES, R. A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to Salmo. **Journal of Fish Biology**, v.47, suppl A, p.103-126. 1995.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: 3ª ed. EMBRAPA-CENARGEN. 1998. p.220.

FIGUEIREDO, J. L. & MENEZES N. A. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. Teleostei. São Paulo, **Museu de Zoologia Universidade de São Paulo**, vol. 6, 2000.116p.

FISCHER, B. A. J. & FICSHER. D. R.; **Techniques of crime scene investigation**. New York: 8ª ed. CRC PRESS. 2012.584p.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 2005. 376p.

FREZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. **Infection Genetics and Evolution**, 5:727-736. 2008.

FRIEDMAN, M. The evolutionary origin of flatfish asymmetry. **Nature**, 454:209– 212. 2008.

FRIEDMAN, M. Osteology of †*Heteronectes chaneti* (Acanthomorpha, Pleuronectiformes), an Eocene stem flatfish, with a discussion of flatfish sister-group relationships. **Jornal Vertebrate Paleontology**, 32:735–756. 2012.

GIL, L. A. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. **Trends in Food Science & Technology**, 18:558–66. 2007.

GOLDING, G.; HANNER, R. & HEBERT, P. Preface to special issue on barcoding life. **Molecular Ecology Resources**, 9: IV-VI. 2009.

GREGORY, T. R. DNA barcoding does not compete with taxonomy. **Nature**, 434: 1067. 2005.

HEBERT, P. D. N. & GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, 5:852-859. 2005.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. & DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London** 270:313-321. 2003.

HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; & HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101:14812–14817. 2004.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G. & WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature Publishing Company**, 11:1026-1030. 1993.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M. & KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, 142:1881–1893. 1996.

JOBLING, M. A. & GILL, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nature Reviews Genetics**, 5:739-51. 2004.

- KARAIKOU, N.; TRIANTAFYLLIDIS, A. & TRIANTAPHYLLIDIS, C. Discrimination of three *Trachurus* species using both mitochondrial and nuclear-based DNA approaches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51:4935-4940. 2003.
- LINDER, C. R.; MOORE, L. A. & JACKSON, R. B. A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. **Molecular Ecology**, 9:1549-1559. 2000.
- LOCKLEY, A. K. & BARDSLEY, R. G. DNA-based methods for food authentication. **Trends in Food Science & Technology**, 11:67-77. 2000.
- LONG, E. O. & DAWID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Rev Biochem**, 49:727-64. 1980.
- MARTINS, C. & GALETTI, P. M. JR. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res.**, 7:363-367. 1999.
- MARTINS, C. & GALETTI-JR, P. M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic localizations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, 44: 903-910. 2001.
- MARTINS, C. & WASKO, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In C. R. WILLIAMS (Ed.), **Focus on genome research**. 1^a ed. Hauppauge: Nova Science Publishers. p. 289-363. 2004.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; PARISE-MALTEMPI, P. P. & WRIGHT, J. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. **Cytogenetic Genome Research**, 98:78-85. 2002.
- MARTYA, E.; BUCHSA, J.; EUGSTER-MEIERB, E.; LACROIXA, C. & MEILE, L. Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. **Food Microbiol.**, 29:157-166. 2012.
- MBURU, D. & HANOTTE, O. **A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics**. Manual. ILRI, Nairobi, Kenya. 2005. 80p.
- MENEZES, N. A.; BUCKUP, P. A.; FIGUEIREDO, J. L. & MOURA, R. L. **Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil**. Museu de Zoologia USP, São Paulo. 2003. 160p.
- MEYER, R.; HÖFELEIN, C.; LÜTHY, J. & CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. **Journal of AOAC International**, 78:1542-1551. 1995.
- MIGUEL, A. L. **Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogênicas em**

biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL. 2007. 106 f. Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico de Lisboa. Lisboa, 2007.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, 262: 56-61, 64-5. 1990.

MUNIZ, C. C. **Revisão sistemática das espécies do gênero *Achirus* Lacépède, 1802 (Pleuronectiformes: Achiridae) do Atlântico Ocidental.** 2009. 78 f. Dissertação de Mestrado; Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2009

MUNROE, A. T. Systematic diversity of the Pleuronectiformes. **Flatfishes: Biology and Exploitation.** New York: 2^a ed. c. 2, Wiley. p. 13-44. 2014.

MUNROE, T. A. Systematic diversity of the Pleuronectiformes, In: GIBSON R. N. **Flatfishes: Biology and Exploitation.** 2^a ed. Oxford: Wiley, p. 10-41. 2005.

NEDERBY, N. H.; HALLENBERG, C.; FREDERIKSEN, S.; SORENSEN, P. D. & LOMHOLT, B. Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequences. **Nucleic Acids Res.**, 26:3631-6. 1993.

NELSON, J. S. **Fishes of the world.** New Jersey: 4^a ed. Wiley. p. 442-472. 2006.

NELSON, J. S.; GRANDE T. C. & WILSON M. V. H. **Fishes of the world.** New Jersey: 5^a ed. John Wiley & Sons, Ltd. p. 395-405. 2016.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações.** 2010. 87 f. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro. Aveiro. 2010

PENDÁS, A. M.; MÓRAN, P.; FREIJE, J. P. & GARCIA-VAZQUEZ, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Animal Cytogenetics and Comparative Mapping**, 67: 31-36. 1994.

PEREIRA, L. H. G.; HANNER, R.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, 14:20. 2013.

PEREZ, J. & GARCIA-VAZQUEZ, E. Genetic Identification of Nine Hake Species for Detection of Commercial Fraud. **Journal of Food Protection**, 12:2792-2796. 2004.

PINHAL, D.; ARAKI, C.; GADIG, O. B. F. & MARTINS, C. Molecular organization of 5S rDNA in sharks of the genus *Rhizoprionodon*: insights into the evolutionary dynamics of 5S rDNA in vertebrate genomes. **Genetics Research**, 91:61-72.2009.
PINHAL, D.; GADIG, O. B. F.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; RON, E.; FORESTI, F. & MARTINS, C. Discrimination of Shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats.

Genetics and Molecular Biology, 31: 361-365. 2008.

PINHAL, D.; YOSHIMURA, T. S.; ARAKI, C. S. & MARTINS C. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. **BMC Evolutionary Biology**, 11:151. 2011.

RAMOS, R. T. C. **Estudo filogenético da família Achiridae (Teleostei, Pleuronectiformes, Pleuronectoidei), com a revisão das formas de água doce da América do Sul Cis-Andina e a reavaliação do monofiletismo de Soleomorpha (“Soleidae”)**. 1998. Tese de Doutorado, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998.

RAMOS, R. T. C.; RAMOS, T. P. A. & LOPES, P. R. D. New species of *Achirus* (Pleuronectiformes: Achiridae) from Northeastern Brazil. **Zootaxa**, 2113:55-62. 2009

RASMUSSEN, H. B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In: MAGDELDIN, S. **Gel Electrophoresis - Principles and Basics**. 1ª ed. Japão: InTech. P. 315-334. 2012.

REGAN, C. T. The origin and evolution of the Teleostean Fishes of the order Heterosomata. **Annals and Magazine of Natural History** 8:484-496. 1910.

REGO, I.; MARTINEZ, A.; GONZALEZ-TIZON, A.; VIEITES, J.; LEIRA, F.; & MENDEZ, J. PCR technique for the identification of mussel species. **J. Agric. Food Chem.**, 50: 1780-1784. 2002.

SADJAK, S. L.; REED, K. M. & PHILLIPS, R. B. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. **Journal of Molecular Evolution**, 46:680- 688. 1998.

SAJDAK, S. L.; REED, K. M. & PHILLIPS, R. B. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. **J. Mol. Evol.**, 46:680–688. 1998.

SALES, J. B. L.; RODRIGUES-FILHO, L. F. S.; HAIMOVICI, M.; SAMPAIO, I. & SCHNEIDER, H. Molecular differentiation of the species of two squid families (Loliginidae and Ommastrephidae) based on a PCR study of the 5S rDNA gene. **Food Contr.**, 22:96-8. 2010.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: 2ª ed. Cold Spring Harbor. 2001.

SASTRI, D. C.; HILU, K.; APPELS, R.; LAGUDAH, E. S.; PLAYFORD, J. & BAUM, B. R. An overview of evolution in plant 5S DNA. **Plant Systematics and Evolution**,

183:169-181. 1992.

SCHIMENTI, J. Global analysis of gene function in mammals: integration of physical, mutational and expression strategies. **Electronic Journal of Biotechnology**, 1(1):1-5. 1998:

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, 5: 63-69. 2004.

SMITH, M. A.; POYARKOV, N. A. & HEBERT, P. D. N. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. **Molecular Ecology Notes**, 8: 235-246. 2008.

STRACHAN, T. & READ, A. P. **Human molecular genetics**. New York: 2^a ed. Wiley-Liss. 1999. 576p.

STRAUSS, R. E. & BOND, C. E. Taxonomic methods: morphology. In: SCHRECK, C. B. & MOYLE, P. B.; **Methods for fish biology**. 1^a ed. Maryland: American Fisheries Society. p. 109–140. 1990.

SUZUKI, H.; MORIWAKI, K. & SAKURAI, S. Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs. **Molecular Biology Evolution**, 11:704-710. 1994.

SUZUKI, H.; SAKURAI, S. & MATSUDA, Y. Rat 5S rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.*, 72:1–4. 1996.

TELETSCHEA, T.; MAUDET, C. & HANNI, C. Food and forensic molecular identification: update and challenges. **Trends Biotechnol.**, 23:359–366. 2005.

TENEVA, A. Molecular markers in animal genome analysis. **Biotechnology in Animal Husbandry**, 25: 1267-1284. 2009.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M. & EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet. Sel. Evol.**, 34:275-305. 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIGTRS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. & ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23:4407- 4414. 1995.

WARD, R. D. & HOLMES, B. H. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (coxI) in fishes. **Molecular Ecology Notes** 7:899–907. 2007.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST P. R & HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B.**, 360: 1847–1857. 2005.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; WRIGHT, J. M. & GALETTI-JR, P. M. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome**, 44:893-902. 2001.

WILL, K. W. & RUBINOFF, D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics-The International Journal of The Willi Hennig Society**, 20:47-55. 2004.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535. 1990.