

# **CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA BARCODING) DOS PEIXES DA BACIA DO RIO IGUAÇU

**CHANCHAY, Jerson Rogelio.**

Estudante do Curso de Ciências Biológicas - ILACVN – UNILA;

E-mail: [jerson.castro@aluno.unila.edu.br](mailto:jerson.castro@aluno.unila.edu.br);

**PEREIRA, Luiz Henrique Garcia**

Docente/pesquisador - ILACVN – UNILA.

E-mail: [luiz.pereira@unila.edu.br](mailto:luiz.pereira@unila.edu.br).

## 1 Introdução

Os peixes são os vertebrados mais diversos no mundo (POUGH; JANIS; HEISER, 2008, p. 4). Somente na região Neotropical existem mais de 5.700 espécies de peixes de água doce formalmente reconhecidas, porém novas espécies são descobertas a cada ano (ALBERT; BART; REIS, 2011 p.89), de modo que, se estima que a riqueza de peixes desta região seja superior a 7.000 espécies (ALBERT; REIS, 2011 p.3). O Brasil abriga grande parte desta diversidade, com aproximadamente 3.363 espécies (FROESE; PAULY, 2016). Os peixes são um grupo morfológicamente diverso, possuem profundas alterações fenotípicas durante o seu desenvolvimento, além de grande plasticidade morfológica, características estas que dificultam a discriminação de espécies quando se baseia em dados morfológicos (BECKER; HANNER; STEINKE, 2011, p. 3). Por outro lado, a utilização de ferramentas moleculares com este propósito, se mostra uma alternativa eficaz e rápida para a identificação de espécies, dentre as quais, a metodologia de DNA *barcoding* destaca-se, sobretudo em países megadiversos como o Brasil. Dentro deste contexto, o objetivo deste projeto foi obter as sequências *barcode* (gene COI) das espécies de peixes da bacia do rio Iguaçu, a qual possui alto grau de endemismo.

## 2 Metodologia

As amostras de peixes foram obtidas da coleção científica de tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP de Botucatu (Instituição parceira neste projeto). O DNA total foi extraído utilizando kits comerciais. As amplificações do gene COI se realizou em um volume final de 25 µl com 2,5 µl de tampão (10mM Tris-HCl+15mM MgCl<sub>2</sub>), 2,5 µl dNTP (200 nM de cada), 1 µl de cada *primer* (5 mM), 0,1 µl Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies), 1,0 µl DNA molde (50 ng) e 17,4 µl ddH<sub>2</sub>O. Os ciclos

de amplificação foram realizados em um termociclador com um passo inicial de 95°C por 5 min, seguidos de 30 ciclos à 95°C por 30s, 54°C por 30s e 72° por 1 min, seguidos de um passo final à 72°C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram purificados e utilizados na reação de sequenciamento utilizando o kit “*Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystems). Após a amplificação, o produto da reação foi purificado por precipitação em EDTA/Acetato de sódio/etanol e analisado em um sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3130-Genetic Analyzer (Applied Biosystems) disponível na Instituição parceira (UNESP-Botucatu). Os *primers* utilizados para amplificação do gene *Citocromo Oxidase subunidade I* foram Fish F1/Fish R1 e Fish F2/Fish R2 (Ward et al. 2005). As sequências obtidas foram editadas no software Geneious v.7.1.3 para a obtenção das sequências consenso e verificação da presença de inserções, deleções e/ou códons de parada. Para a verificação de contaminantes (DNA exógeno) as sequências foram submetidas ao programa *BLAST* disponível no sítio do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) disponível *online* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Os valores de distâncias genéticas intra e interespecíficas foram calculados, utilizando-se o modelo de substituição Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980) com o programa MEGA v.7.0.14 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2016), o qual também foi utilizado para a construção de um dendrograma baseado no método *Neighbor-Joining* (NJ) para ter uma representação gráfica dos resultados.

### **3Fundamentação teórica**

Dentre as bacias hidrográficas que o Brasil possui, encontra-se a bacia do rio Iguaçu, a qual apresenta um alto grau de endemismo de sua ictiofauna (~70%) devido ao isolamento geográfico imposto pelas cataratas do Iguaçu (BAUMGARTNER et al., 2012, p. 6). Tal fato, torna esta bacia extremamente importante do ponto de vista da conservação, já que a extinção de qualquer das espécies do local, se daria de forma irremediável. Por outro lado, os inventários ictiofaunísticos desta bacia ainda são incompletos, sendo que Severi e Cordeiro (1994) apontam a existência de 47 espécies, Garavello *et al.* (1997) 52 espécies e Ingenito *et al.* (2004) relataram a existência de 84 espécies. Um trabalho mais recente de Baumgartner *et al.* (2012) descreve a presença de 106 espécies de peixes nesta bacia, das quais o 69,7% correspondem a espécies endêmicas. Além disso, 25 das 106 espécies catalogadas possuem identificação somente no nível genérico, o que acentua a importância de estudos nesta bacia,

antes de se perder esta biodiversidade pouco conhecida. Os peixes são um grupo de difícil identificação devido a possuírem alterações fenotípicas durante o seu desenvolvimento (BECKER; HANNER; STEINKE, 2011, p. 3). Além disso, apresentam espécies denominadas crípticas, as quais correspondem a espécies que são morfologicamente muito similares, que não possuem caracteres morfológicos diagnósticos que possam discriminá-las, mas que na realidade representam espécies diferentes (BICKFORD et al., 2006, p. 149). Desta forma, os estudos tradicionais que utilizam somente dados morfológicos para a discriminação de espécies se tornam insuficientes. Assim, o uso de ferramentas moleculares apresenta-se como uma alternativa eficaz nestes casos. Neste sentido, Hebert et al. (2003) propuseram uma metodologia padronizada de identificação molecular de espécies denominado de código de barras molecular ou *DNA Barcoding*. Esta técnica discrimina espécies utilizando um fragmento da sequência do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase I* (COI) e se baseia na presença de nucleotídeos exclusivos a cada espécie nessa região do DNA acumulados ao longo da história evolutiva de cada espécie (HEBERT et al., 2003). Diversos trabalhos tem demonstrado a eficácia do *DNA barcoding* na discriminação de espécies de peixes (PEREIRA et al., 2011; APRIL et al., 2011; MELO et al., 2011; HANDFIELD; HANDFIELD, 2006; SMITH et al., 2006). Além disso, o potencial desta metodologia prevê novas perspectivas para o estudo da ecologia, da diversidade e da taxonomia (BECKER; HANNER; STEINKE, 2011, p. 3), sendo que atualmente vem revolucionando os estudos de biodiversidade com o denominado *metabarcoding* (HÄNFLING et al., 2016, p. 3101), o qual utiliza DNA ambiental para estimar a composição e abundância das comunidades de espécies (HÄNFLING et al., 2016; MIYA et al., 2015). Porém, para que esta metodologia, bem como suas várias aplicações funcionem, é necessário criar um banco de dados completo com as sequências *barcode* de todas as espécies, banco este que já conta atualmente com aproximadamente 5 milhões de sequências depositadas (*The Barcode of Life Data Systems* (<http://boldsystems.org/>)). Assim, destaca-se a importância de criar o banco de dados de sequências *barcode* das espécies de peixes do rio Iguaçu, o qual ajudará a conhecer melhor a diversidade de peixes desta bacia, bem como subsidiará novas investigações.

#### **4 Resultados**

Foram obtidas 114 amostras de peixes, das quais, 80 tiveram êxito na extração de DNA. Destas, 45 amostras apresentaram sequências de boa qualidade, sendo que nove delas foram descartadas por representar contaminantes, após teste no *BLAST* (NCBI). Ao final, se obteve 36 sequências *barcode*, que representam 20 espécies, distribuídas em 16 gêneros, 10

famílias e quatro ordens. As sequências *barcode* identificaram corretamente 18 das 20 espécies analisadas (90%). A divergência genética dentro das espécies foi de 0 %, com exceção de espécies com identificação genérica como *Corydoras sp.* (2%) e *Crenicichla sp.* (10%). A divergência genética entre as espécies variou de 2% a 31%, exceto entre *Deuterodon sp.* e *Cheirodon interruptus* que foi de 0% e entre *Corydoras sp.* e *C. ehrhardti* e *C. paleatus* a qual foi de 1%. A divergência genética entre espécies de um mesmo gênero variou entre 1% e 4% e entre os gêneros de 4% a 31%, exceto entre *Deuterodon* e *Cheirodon* a qual foi de 0%. A divergência genética dentro das famílias que possuíam mais de duas espécies, variou entre 1% e 17%, e entre as famílias variou de 18% a 28%. As ordens apresentaram uma divergência genética intraespecífica entre 1% e 17%, enquanto que a divergência genética entre as ordens variou entre 24% e 28%.

## 5 Conclusões

Embora o gênero *Corydoras* tenha apresentado uma divergência genética baixa entre suas espécies (~1%), cada espécie formou um grupo bem delimitado, sendo que os espécimes identificados como *Corydoras sp.*, provavelmente, correspondem as espécies identificadas. Por outro lado, as espécies *Deuterodon sp.* e *C. interruptus*, que não apresentarem divergência genética, provavelmente representam um caso de erro de identificação, dado que são espécies morfológicamente similares, cujos lotes deverão ser revistos. De modo geral, a utilização da metodologia do DNA *barcoding*, se mostrou eficiente na discriminação de espécies de peixes do rio Iguaçu (eficácia de 90%), corroborando o potencial do DNA *barcoding* em discriminar espécies de peixes na região Neotropical (PEREIRA *et al.*, 2011; WARD *et al.*, 2008; ZEMLAKE *et al.*, 2009).

## 6 Principais referências bibliográficas

BECKER, S.; HANNER, R.; STEINKE, D. Five Years of FISH-BOL: Brief Status Report. **Mitochondrial DNA**, v. 22, n. S1, p. 3–9, 2011.

BICKFORD, D. *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology and evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2006.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1512, p. 313–21, 2003.

PEREIRA, L. H. G. *et al.* DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 22 Suppl 1, n. October, p. 87–96, 2011.

WARD, R. D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 360, p. 1847–1857, 2005.