

## CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA IDENTIFICAÇÃO DE PEIXES DA FAMÍLIA LORICARIIDAE (SILURIFORMES) DO RIO ARAGUAIA

Patrícia Batista de AZEVEDO<sup>1</sup>

Jacqueline da Silva BATISTA<sup>2</sup>

Kyara Martins FORMIGA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista IC INPA - PAIC/FAPEAM; <sup>2</sup>Orientador CBIO/INPA;

<sup>3</sup>Colaborador CBIO/INPA

### INTRODUÇÃO

Os bagres da Ordem Siluriformes, com mais de 3100 espécies distribuídas em 36 famílias (Ferraris 2007) contém cerca de 10% de todas as espécies de peixes do mundo. Dentro da Ordem está a família Loricariidae, representante com maior número de espécies, mais de 830 descritas (Lujan *et al.* 2012), os representantes dessa família apresentam as seguintes características morfológicas: boca em posição ventral em forma de ventosa, corpo coberto por placas ósseas, achatado na posição dorso-ventral. São de hábito sedentário, habitando regiões bentônicas de rios, cachoeiras e lagos, muitas espécies são detritívoras e de hábito noturno (Soares *et al.* 2008). Áreas de corredeiras vêm sendo constantemente afetadas, devido à construção de hidrelétricas, provocando alterações que direta ou indiretamente prejudicam a ictiofauna de determinada região, fazendo com que muitas vezes não se tenha um controle de quantas e quais espécies existam neste ecossistema. Neste sentido está previsto a construção de um empreendimento hidrelétrico no rio Araguaia, na área das corredeiras de Santa Isabel. Outra problemática é que muitas espécies de loricarídeos são comercializadas no mercado de peixes ornamentais sem que haja uma correta identificação para fins de fiscalização, exportação e comércio, uma vez que há a possibilidade de entre os indivíduos haver espécies crípticas. Uma solução para a problemática exposta acima é uma ferramenta sugerida por Hebert *et al.* (2003) denominada de “DNA barcode” ou código de barras de DNA, em que um pequeno fragmento, padronizado para vertebrados é utilizado, o Citocromo Oxidase subunidade I (COI) do genoma mitocondrial. O gene COI codifica parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria. O COI é um gene fácil de ser amplificado em qualquer estágio de vida dos animais e, por ser um gene mitocondrial, é vantajoso por possuir evolução rápida (ambiente oxidativo), ausência de introns, herança haploide, exposição limitada para recombinação. O principal pressuposto para efetividade do *DNA Barcoding* é de que as divergências intraespecíficas sempre sejam menores que as interespecíficas, o que se chama de *barcoding gap*. Em um trabalho iniciado em 2013 que envolve a identificação molecular de exemplares distribuídos em 19 espécies, gerou até o momento código de barras de DNA para 10 espécies. A presente proposta tem o objetivo de complementar a geração do código de barras para até tamanho amostral de cinco indivíduos/espécie bem como para as demais nove espécies, com isso o objetivo deste trabalho foi: Gerar código de barras de DNA de peixes da Família Loricariidae (Siluriformes) amostradas no rio Araguaia, e utilizá-los na identificação molecular destas espécies, a partir de sequências do gene mitocondrial Citocromo oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram amostrados entre 2 a 14 indivíduos de cada espécie de loricarídeos provenientes de ambientes de cachoeiras e corredeiras da Amazônia Brasileira. A coleta ocorreu em cinco pontos: 1-Pedral de Itaipava, 2- Pedral de São Miguel, 3- Pedral do Remanso dos Botos, 4- Pedral de Santa Isabel, 5- Pedral de São Bento. A extração de DNA foi feita utilizando o Kit de extração de DNA Wizard (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *Gel Red* (Biotium) em comparação com marcador de peso molecular para quantificação do DNA. A amplificação do DNA extraído foi

realizada pela técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), contendo os seguintes reagentes: Tampão 10X, Cloreto de Magnésio; DNTPs; Taq DNA Polimerase e água milli-Q; DNA total do espécime. Para a amplificação foram utilizados 5 µM dos *primers* iniciadores na reação que se localizam adjacentes ao gene COI do DNA mitocondrial. Em cada iniciador foi inserido uma cauda M13 para o sequenciamento. Os *primers* iniciadores têm as seguintes sequências: COI Fish F2: GTA AAA CGA CCA GTT TRT GGR GC 3' e COI Fish R1: 5' TAC TTG GGG TGC CRA AGA AYC AC 3' (Ward *et al.* 2005) na qual foi utilizado o seguinte perfil de temperatura: 37 °C por 30 minutos, 80 °C por 15 minutos e 10 °C por 1 minuto ou até o início da próxima fase. O produto amplificado foi verificado em eletroforese em gel de agarose 1% corado com *Gel Red* (Biotium) por comparação com o marcador *LOW MASS DNA LADDER* (*Invitrogen*). A purificação foi realizada usando o kit *ExoSAP-it* o qual corresponde as enzimas *Exonuclease I* e *Fosfatase alcalina de camarão* com o seguinte protocolo: O produto de *ExoSAP* foi diluído em água Milli-Q na proporção 1:3 e adicionado na amostra, sendo 1 µl para cada 5µl de produto de PCR. Em seguida o material foi levado ao termociclador com o seguinte perfil de temperatura: 37 °C por 30 minutos, 80 °C por 15 minutos e 10 °C por 1 minuto ou até o início da próxima fase. O produto de PCR purificado foi sequenciado com o kit de sequenciamento *Big Dye 3.11*, (Life Biotechnologies). Logo após, foi realizada a leitura dos fragmentos no sequenciador automático de DNA ABI 3130xl (Life Technologies) nas condições de injeção e corrida recomendadas pelo fabricante obtendo-se a sequência nucleotídica do gene COI.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido para este trabalho um total de 110 sequências do gene COI Citocromo oxidase subunidade I do genoma mitocondrial, incluindo as amostras de (Azevedo 2014), divididas em 19 espécies (Tabela 1). As quais foram analisadas com o auxílio dos programas CHROMAS 2.31 ([www.technelysium.com.au/chromas.html](http://www.technelysium.com.au/chromas.html)) e editas no BIOEDIT (Hall 1999). Dentre as localidades, a que apresentou maior quantidade de indivíduos coletados, Remanso dos Botos com N total = 72 e a menor São Miguel com N total = 21. Quanto ao total de sequências obtidas por espécie: *B. niveatus*, *H. plecostomus* e *Lasiancistrus* sp., apresentaram um *n* maior de sequências geradas.

Para determinação de grupos específicos, foi utilizado o método de agrupamento de vizinhos (*Neighbour-Joining*, NJ) (Saitou e Nei 1987) pelo modelo *Kimura-2-parameter* (K2P) (Kimura 1980) para corrigir distâncias nucleotídicas, e a confiabilidade de cada nó, estimada pelo método de *bootstrap* 1000 réplicas (Feilsentsein 1985). A árvore de agrupamento entre vizinhos foi feita em duas etapas: *a priori* com todas as 19 espécies, observou-se que 17 espécies agruparam-se em clados distintos, sendo que as espécies: *Hartia* sp., os indivíduos ficaram distribuídos ao longo da árvore, e *Panaque nigrolineatus*, um dos indivíduos agrupou-se com a espécie *B. niveatus*. Uma árvore *a posteriori* foi construída com 17 espécies, pois duas espécies apresentaram altos valores de distância intraespecífica, ficando como grupo externo. Observou-se que as 17 espécies agruparam-se em clados distintos.

O resultado do cálculo da distância intraespecífica demonstrou valores abaixo de 3% para 14 espécies, as espécies que apresentaram valores acima de 3% foram respectivamente: *B. niveatus* (3,55%); *B. sp. 2* (4,35%); *Hartia* sp. (13,45%); *Spatuloricaria* sp. (7,57%) e *Panaque nigrolineatus* (10,32%), as demais espécies apresentaram valores inferiores a 3%. Em relação à distância interespecífica 18 espécies apresentaram valores acima de 3%, sendo apenas as distâncias entre *B. sp 2* e *B. sp 3* que apresentou valor abaixo de 3%. De acordo com a proposta do DNA *barcode*, distâncias genéticas acima de 3,0% podem ser consideradas espécies diferentes, entretanto este valor, não vem necessariamente a ser um valor de corte, levando-se em conta outros fatores para designação de uma nova espécie.

Tabela 1. Tabela de espécies de loricarídeos com número de amostras coletadas por localidade e o número total de sequências de COI obtidas por espécie.

Espécie	Itaipava	Santa Isabel	Remanso dos Botos	São Bento	São Miguel	Nº de Sequências de COI obtido
<i>Bariancistrus niveatus</i>	9	3	1	0	1	14
<i>Bariancistrus</i> sp. 2	2	5	2	0	0	8
<i>Bariancistrus</i> sp. 3	1	4	4	4	0	6
<i>Hartia</i> sp.	2	6	0	4	2	8
<i>Hypostomus</i> aff. <i>plecostomus</i>	2	8	22	1	0	11
<i>Hypostomus faveolus</i>	0	2	7	0	0	6
<i>Lasiancistrus</i> sp	1	9	11	4	5	11
<i>Leporacanthicus</i> sp.	0	0	0	2	1	3
<i>Oligancistrus</i> sp.	8	1	1	8	7	9
<i>Panaque nigrolineatus</i>	0	0	0	2	0	2
<i>Parancistrus aurantiacus</i>	5	0	0	0	0	5
<i>Peckoltia oligospila</i>	16	3	0	4	2	4
<i>Peckoltia vitata</i>	0	0	3	0	1	2
<i>Pseudacanthicus</i> sp.	2	1	2	0	0	4
<i>Rineloricaria castroi</i>	2	1	0	0	0	2
<i>Rineloricaria</i> aff. <i>lanceolata</i>	0	0	1	1	0	2
<i>Rineloricaria phoxocefala</i>	0	0	2	0	0	2
<i>Spatuloricaria</i> sp.	0	0	2	7	1	5
<i>Squaliforma emarginata</i>	2	15	15	0	2	6
<b>Total Geral</b>	<b>35</b>	<b>55</b>	<b>72</b>	<b>37</b>	<b>21</b>	<b>110</b>

Além das análises realizadas neste trabalho foi feita uma consulta a banco de dados de sequências públicas (BOLD e GENBANK) foram consultados para inferir a porcentagem de similaridade entre espécies e confirmar a identificação morfológica das mesmas. (Tabela 2). Foram encontradas sequências similares para 14 espécies na plataforma BOLD- *Barcode of Life Data Systems* e 2 espécies no GENBANK. No total a sequência de três espécies (*Hypostomus faveolus*, *Rineloricaria castroi* e *Squaliforma emarginata*) não foi encontrada tanto no BOLD quanto no GENBANK, contribuindo assim para o banco de dados público.

Tabela 2. Tabela com espécies da família Loricariidae comparadas com espécies de banco de dados público e o percentual de similaridade entre as mesmas.

Espécie	Espécie Bold ou Genbank	% Similaridade
<i>B. niveatus</i>	<i>B. niveatus</i>	100%
<i>B. sp 2</i>	<i>B. niveatus</i>	100%
<i>B. sp 3</i>	<i>B. niveatus</i>	100%
<i>Hartia</i> sp.	<i>Harttia loricariformis</i>	88%
<i>Hypostomus plecostomus</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i>	95,87%
<i>Lasiancistrus</i> sp.	<i>Lasiancistrus schomburgkii</i>	96%
<i>Leporacanthicus</i> sp.	<i>Leporacanthicus joselimai</i>	98,49%
<i>Oligancistrus</i> sp.	<i>Oligancistrus punctatissimus</i>	98,97%
<i>Panaque nigrolineatus</i>	<i>Panaque nigrolineatus</i>	97,59%
<i>Parancistrus aurantiacus</i>	<i>Parancistrus aurantiacus</i>	98%
<i>Pseudacanthicus</i> sp.	<i>Pseudacanthicus</i> sp L25	99,24%
<i>Peckoltia oligospila</i>	<i>Peckoltia oligospila</i>	96%
<i>Peckoltia vitata</i>	<i>Peckoltia vitata</i>	97,72%
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	<i>Rineloricaria lanceolata</i>	99,24%
<i>Rineloricaria phoxocefala</i>	<i>Rineloricaria phoxocefala</i>	96,95%
<i>Spatuloricaria</i> sp.	<i>Spatuloricaria</i> sp.	88%

## CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se comprovar a validação da metodologia do DNA *Barcode* para identificação genética de pelo menos quatorze espécies da Família Loricariidae, a partir do fragmento Citocromo Oxidase subunidade I (COI).

Além disso, este estudo contribuirá com três espécies para o banco de dados público. Apesar da sua eficiência para identificar espécies, sabe-se também que os resultados podem ser afetados por fatores como número amostral, diversidade intraespecífica, estrutura populacional, entre outros fatores. Sugere-se uma revisão morfológica para as espécies que apresentaram valores acima ou abaixo do proposto pela metodologia do DNA *barcode*.

## REFERÊNCIAS

- Azevedo, P.B. 2014. Código de barras de DNA para identificação molecular de espécies de peixes da família Loricariidae (Siluriformes) do rio Araguaia. Relatório Final PAIC/INPA. Manaus, AM.16 p.
- BOLD Systems. 2015. Disponível em: <<http://www.boldsystems.org>>. Acesso em: 09 de junho de 2015.
- BLAST. 2015. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 09 de junho de 2015.
- Felsenstein, J.F. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Ferraris, C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418, 1–548.
- Hebert, P.D.N. 2003. Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 313-321.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95)98)NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hebert, P.D.N.; Ratnasingham, S.; de Waard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of Biological Science*, 270: S96-S99.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Lujan *et al.*, 2012. Trophic diversity in the evolution and community assembly of loricariid catfishes. *BMC Evolutionary Biology*, 12:124.
- Saitou, N. e Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- Soares *et al.* 2008. *Peixes de lado do médio Rio Solimões*. 2. ed. rev.– Manaus: Instituto I-piatam. p. 111.
- Tamura *et al.* 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0.
- Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R.; Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. T. R. Soc. B*, 360: 1847–1857.