

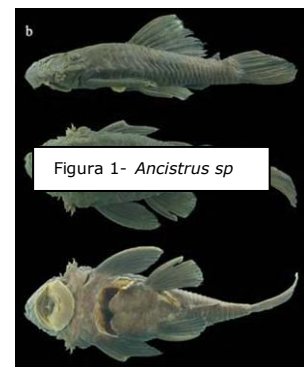
## UTILIZAÇÃO DE CÓDIGO DE BARRAS DE DNA (COI) NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE BAGRES (SILURIFORMES) DE VALOR COMERCIAL

Larissa Melo-NEVES<sup>1</sup>, Kyara FORMIGA-AQUINO<sup>2</sup>, Jacqueline da Silva BATISTA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Orientador/LTBM/COPE/INPA, Co-autor/ LTBM/COPE/INPA.

### 1. Introdução

A pesca é uma das atividades mais importantes da região Amazônica. É dela que populações ribeirinhas dependem para fins de alimentação, comércio, renda e lazer (Megeers, 1977; Roosevelt et al., 1991). No decorrer dos séculos a demanda pelo pescado tem crescido absurdamente e para responder a demanda técnicas de pesca foram se desenvolvendo com o tempo. Santos e Santos (1997), a partir de levantamentos bibliográficos, aborda os vários tipos de pesca realizados na Amazônia. A pesca comercial é feita por pescadores profissionais para comercialização na própria região; a pesca de subsistência, feita pelos ribeirinhos destinada ao consumo próprio; a pesca industrial, feita em grandes quantidades pelos barcos ou navios pesqueiros; e por fim a pesca de peixes ornamentais, realizada por pescadores ornamentais de peixes vivos. Esse tipo de pesca se faz com canoas e puçás, para uso entre a vegetação aquática. Os peixes vivos são transportados em bacias com água até a cidade mais próxima e mantidos em viveiros até o momento da exportação. Dentre as espécies de peixes ornamentais comerciais, da ordem Siluriformes, destacam-se os peixes da família Loricariidae. Conhecidos como cascudinhos, totalizam a maioria das espécies de água doce da América do Sul, apresentando 418 espécies descritas (Buckup et al., 2007). Possui o corpo geralmente achatado na parte dorso-ventral, revertido por placas ósseas, apresentam boca ventral com lábios grossos e inúmeras papilas (Figura 1) (Melo et al., 2005). Adaptados a vida bentônica, alimentam-se de algas e outros organismos fixos nas rochas, folhas e troncos (Abreu & Yuki, 2002). No contexto da comercialização de peixes ornamentais um dos mais freqüentes problemas atuais está na identificação dessas espécies para fins de fiscalização, exportação e comércio. Uma solução para essa questão baseia-se em uma ferramenta sugerida por Hebert, (2003), denominada "DNA barcode", ou código de barras de DNA. Esta ferramenta não propõe nada novo em termos de técnicas de obtenção e de processamento de seqüências, mas propõe uma padronização das metodologias na qual para vertebrados é definido como fragmento padrão o Citocromo Oxidase subunidade I (COI), por ser um fragmento do genoma mitocondrial que faz parte de um complexo gênico codante de proteínas transmembranares, envolvidas no transporte elétrico e catálise da cadeia respiratória de organismos eucariotos. Esse fragmento é utilizado para estudos de população e variabilidade genética e filogenia. Essa ferramenta tem inovado a genética molecular, pois se propõe a solucionar as questões sobre filogenia através da seqüência de DNA, como é o caso deste trabalho. A técnica também permite vantagens como a escolha de material para extração de qualquer parte do indivíduo e em qualquer estado de seu ciclo de vida, inclusive



ainda ovos, o que é fundamental para questão de fiscalização. A técnica de DNA barcode pode se mostrar peça chave para identificação genética de espécies comerciais ornamentais da Família Loricariidae para confirmar sua identificação morfológica. O objetivo principal deste estudo foi caracterizar geneticamente espécies da ordem Siluriformes, de valor comercial para consumo e ornamental, a partir de seqüências do gene mitocondrial COI (DNA barcode).

## 2. Material e Métodos

Foram selecionados 2 a 8 exemplares de espécies comercializadas, provenientes de 5 localidades do rio Araguaia na Amazônia Brasileira, sendo estes: Itaipava, Santa Isabel, São Miguel, Remansos dos botos, Rebojo e São Bento. O material está conservado em álcool 70%, compondo o estoque do banco de tecidos do grupo de pesquisas de peixes eletrosensitivos, no Laboratório Temático de Biologia Molecular, no INPA. As espécies foco do atual trabalho são: *Ancistrus sp.*, *Pseudoancistrus sp.*, *Pseudacanthicus*, *Bariancistrus aff. niveatus*, *Bariancistrus sp. 2*, *Bariancistrus sp. 3*, *Rineloricaria sp.*, *Rineloricaria castroi*, *Rineloricaria aff. lanceolata*, *Rineloricaria phoxocefala*, *Hypostomus aff. plecostomus*, *Lasiansistrus SP.*, *Hypostomus faveolus*, *Peckoltia vitata*, *Peckoltia oligospila*, *Squaliforma emarginata*, *Spatuloricaria sp.* e *Parancistrus aurantiacus*. Todas os exemplares provenientes do rio Araguaia, na região Amazônica. A extração de DNA foi feita via Fenol seguindo o protocolo modificado de SAMBROOK & RUSSEL, 1989, no qual foi macerado aproximadamente 20 mg de tecido muscular para digestão com o auxílio de 1% de SDS, tampão de lise (Tris HCL/EDTA) digestão com 10 µL de Proteinase K (10 mg/mL) na temperatura de 65 °C por uma hora com agitação constante. O produto da digestão foi purificado por sucessivas lavagens utilizando-se fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:1:1); fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio. Em seguida, o DNA total foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70% e eluído em tampão TE 1X ( Tris-HCl 10 mM pH 8,5 e EDTA 0,1 mM). O DNA extraído foi visualizado, após eletroforese, em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídeo (EtBr – 0,5 mg/mL). Algumas amostras foram extraídas com kit de extração comercial (*Qiagen*), devido a pouca quantidade de material biológico. Para a Reação em cadeia da polimerase - PCR reação foram utilizados: DNTPs [0,16 mM], *Primers F e R* [0,5 µM], DNA polimerase [0,02 U/µl] com Tampão [1X], BSA [1mg/ml] e o DNA. Para a amplificação (PCR) do fragmento de *DNA barcode* (COI) do citocromo oxidase I, foram utilizados os primers BOLCOI F3: 5' TCA ACY AAT CAY AAAGAT ATY GGC CAC 3' e COI R3: 5' ACT TCY GGG TGR CCR AAR AAT CA 3' modificados de Ward *et al.* (2005), o material foi processado em termociclador nas seguintes condições: Temperatura de desnaturação à 94°C por 4 minutos; temperatura de anelamento à 55°C por 40 segundos; e a temperatura de extensão à 72°C por 50 segundos. Depois de amplificado, o produto da PCR foi verificado e quantificado – por comparação com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) – em eletroforese padrão (200 V por 1h) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As amostras foram levadas a um seqüenciador automático MegaBace 1000, editadas, alinhadas e analisadas com o auxílio dos programas Bioedit 5.0.9 (Hall, 1999), Chromas 2.31 ([www.techneysium.com.au/chromas.html](http://www.techneysium.com.au/chromas.html)) e Mega 4.0, respectivamente.

## 3. Resultados e discussão

Foram obtidas seqüências de DNA do gene citocromo oxidase I de boa qualidade para 17 indivíduos. A média da distância genética entre as espécies foi de 12,9%. A identificação morfológica da maioria dos indivíduos coletados foi confirmada com as seqüências de DNA obtidas,

conforme observado nos cladogramas das análises de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-joining*) (Figura 2) e de parcimônia (Figura 3). Algumas espécies como *Ancistrus sp* e *Bariancistrus aff. niveatus*, aparecem em dois cladogramas localizadas em clados distintos, porem, indivíduos identificados como da mesma espécie nas análises estão dispostos no mesmo clado como no caso dos quatro indivíduos de *Ancistrus sp*.. Os dados gerados neste trabalho, confirmam a identificação morfológica realizada em campo como se propunha a ferramenta DNA barcode para amplificar o gene citocromo oxidase I.

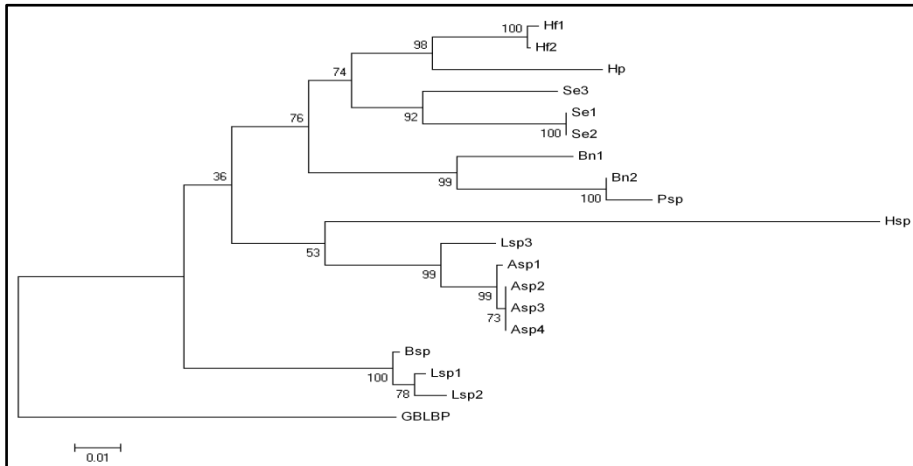


Figura 2- Cladograma da análise de agrupamento de vizinhos

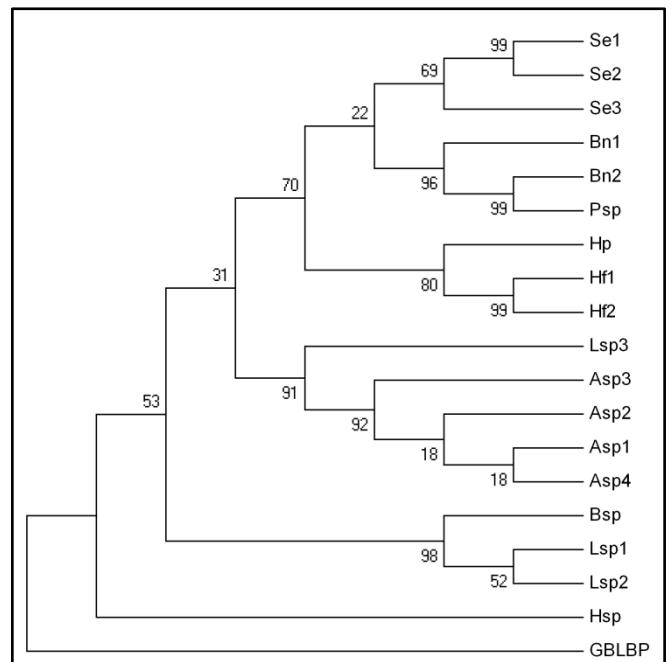


Figura 6- Cladograma da análise de Parcimônia.

#### 4. Conclusão

Os dados gerados neste trabalho, confirmam a identificação morfológica realizada em campo como se propunha a ferramenta DNA barcode para amplificar o gene citocromo oxidase I.

Palavras Chaves: Pesca ornamental; *Loricariidae*; DNA barcode;

Apoio financeiro: CNPQ/ FAPEAM/ INPA.

#### 5. Referências

- Meggers, B. Amazônia: a ilusão de um paraíso. Rio de Janeiro, Civilização Brasileira, 1977, 207p.
- Roosevelt, C.; Housley, R. A; Imazio da Silveira, M.; Maranca, S. e Johnson, R. "Eighth Millenium Pottery from a Prehistoric Shell Medeen in the Brazilian Amazon". Science, n. 254, 1991, pp. 1621 – 1624.
- Santos, g. M. e Santos, a, c, m. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. Estudos avançados 19 (54), 2005 pp. 165-182
- Buckup, P.A.; Teixeira J.M.S. Família Cichlidae. In: Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil – Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. 195p.
- Melo, C.E.; Lima, J.D.; Melo, T.L.; Pinto-Silva, V. Peixes do Rio das Mortes. – Identificação e ecologia das espécies mais comuns. Ed. UNEMAT. Cáceres, MT, 2005. 146p. et al., 2005.
- Abreu, M.L.S.; Yuki, R.N. Lavantamento preliminar da família Loricariidae, para o médio e baixo Tapajós, Pará, Brasil (Teleostei, Siluriforme). In: XI Encontro Anual de Iniciação Científica – Universidade Estadual de Maringá. Maringá/PR, 2002.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. Dewaard, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceeding of the Royal Society of London, 270:313-321.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989), Molecular Cloning: a laboratory manual, 2 nd edn. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY.
- 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.
- Rodrigues, W.A. 1977. Novas espécies de *Virola* Aubl. (Myristicaceae) da Amazônia. *Acta Amazonica*, 7: 459-471.
- Prance, G.T.; Rodrigues, W.A.; Silva, M.F. 1976. Inventário florestal de um hectare de mata de terra firme km 30 da Estrada Manaus-Itacoatiara. *Acta Amazonica*, 6: 9-35. T.A. 2002.

BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuclear Acids Symposium Series*, 41:95-98.

CHROMAS 2.31 URL: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.