

## CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES 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 PAIC/FAPEAM; <sup>2</sup>Orientador CBIO/INPA <sup>3</sup>Co-orientador CBIO/INPA

### INTRODUÇÃO

Os bagres da família Loricariidae (Siluriformes), totalizam a maioria das espécies de peixes de água doce da América do Sul, apresentando 418 espécies descritas (Buckup *et al.* 2007). Caracterizam-se por apresentar o corpo totalmente recoberto por placas ósseas; boca situada em posição ventral e em forma de ventosa favorecendo as espécies adaptação ao ambiente em que vive, no qual, são endêmicos de cachoeiras e corredeiras (Melo *et al.* 2005). Áreas de corredeiras vêm sendo constantemente afetadas, devido à construção de hidrelétricas, provocando alterações que muitas vezes prejudicam a ictiofauna de determinada região. Neste sentido está prevista a construção de um empreendimento hidrelétrico no rio Araguaia-Tocantins. Além disso, muitas espécies dessa família são comercializadas no mercado de peixes ornamentais sem que haja uma identificação correta para fins de fiscalização, exportação e comércio, levantando a possibilidade de entre os indivíduos haver espécies crípticas. Uma provável solução para a problemática exposta é uma ferramenta sugerida por Hebert *et al.* (2003) denominada de “DNA barcode”, em que um pequeno fragmento, padronizado para vertebrados é utilizado, o Citocromo Oxidase subunidade I (COI) do genoma mitocondrial. O marcador molecular DNA *barcode* pode se mostrar peça chave para identificação genética de espécies da Família Loricariidae para validar sua identificação morfológica e identificar prováveis espécies crípticas.

O objetivo deste trabalho foi: Gerar código de barras de DNA de espécies 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 a eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *GelRed* (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: Tampão10X, 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* é 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 *BigDye 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

Após edição e alinhamento das 61 sequências do gene COI geradas, obteve-se uma matriz de dados com 604 pb por sequência obtida das doze espécies da família Loricariidae (Tabela 1).

Tabela 1. Panorama descritivo relacionando as espécies de loricarídeos amostradas no rio Araguaia identificadas com as localidades da coleta e o número de sequências de DNA COI, obtidas por espécie.

Espécie	Itaipava	Sta Isabel	Remanso dos Botos	São Miguel	N Total	Nº de Sequência COI obtido
<i>Bariancistrus niveatus</i>	9	3	1	0	14	14
<i>Bariancistrus sp. 2</i>	2	5	2	0	9	8
<i>Bariancistrus sp. 3</i>	1	4	4	4	9	6
<i>Hartia</i>	2	6	0	4	14	6
<i>Hypostomus aff. plecostomus</i>	2	8	22	1	57	13
<i>Hypostomus faveolus</i>	0	2	7	0	9	5
<i>Lasiancistrus</i>	1	9	11	4	30	6
<i>Oligancistrus sp.</i>	8	1	1	8	25	2
<i>Peckoltia oligospila</i>	16	3	0	4	25	2
<i>Rineloricaria castroi</i>	2	1	0	0	3	2
<i>Rineloricaria aff. lanceolata</i>	0	0	1	1	2	2
<i>Rineloricaria phoxocephala</i>	0	0	2	0	2	2
<i>Spatuloricaria</i>	0	0	2	7	10	4
<i>Squaliforma emarginata</i>	2	15	15	0	34	4
<b>Total Geral</b>	<b>28</b>	<b>54</b>	<b>67</b>	<b>33</b>	<b>199</b>	<b>75</b>

Com a matriz contendo as sequências das 12 espécies foi gerada uma árvore de agrupamento por similaridade (*Neighbour-joining*) corrigida pelo modelo Kimura-2-Parâmetros, entre as 61 sequências das doze espécies, na qual se verifica que a maioria dos indivíduos (com exceção de três espécies) agrupou-se separadamente por espécie (Figura 1). Corroborando a identificação morfológica.

A distância média interespecífica apresentou valores acima de 3,0, corroborando para existência de espécies diferentes, com exceção de apenas um valor encontrado entre as espécies *Rineloricaria castroi* e *Spatuloricaria sp.*, apresentando um valor de 0,17%, havendo a possibilidade de ser apenas uma espécie. Na distância média intraespecífica foi verificada em três espécies valores acima da média esperada, sendo: *Bariancistrus niveatus* com 4,11%, *Hartia sp.* com 17,89% e *Lasiancistrus sp.* com 4,20% podendo haver dentro dessas espécies indivíduos pertencentes à outra espécie. Estes valores podem ser confirmados visualmente na árvore de *Neighbour-joining*.

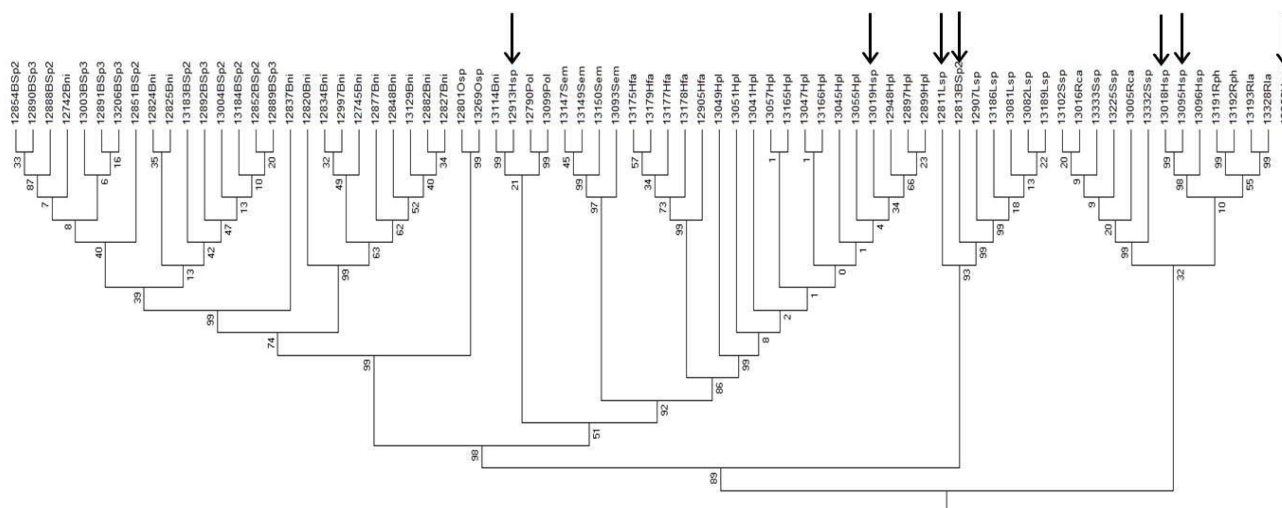


Figura 1. Árvore de Neighbour-joining das 14 espécies da família Loricariidae amostradas no rio Araguaia. Cada espécie em seu respectivo clado (com exceção de 5 indivíduos da espécie *Hartia* sp., 1 indivíduo de *Lasiancistrus* sp e 1 de *Bariancistrus* sp.2.), o primeiro em que os indivíduos ficaram distribuídos ao longo da árvore e o segundo e terceiro que alinhou-se com outro grupo (indivíduos em destaque).

Bni: *Bariancistrus niveatus*, Bsp 2: *Bariancistrus* sp. 2, Bsp. 3: *Bariancistrus* sp. 3, Hsp: *Hartia* sp. H.faveolus: *Hypostomus faveolus*, H.plecostomus: *Hypostomus plecostomus*, Lsp.: *Lasiancistrus* sp., Osp: *Oligancistrus* sp., P.oligospila: *Peckoltia oligospila*, Rca: *Rineloricaria castroi*, Rla: *Rineloricaria lanceolata*, Rph: *Rineloricaria phoxocephala*, Sem: *Squaliforma emarginata*, Ssp: *Spatuloricaria* sp.

Tabela 2. Distância média entre espécies da família Loricariidae do presente estudo. Em negrito as distâncias média intraespecífica.

	Bn1	Bsp2	Bsp3	Hfa	Hpl	Hsp	Lsp	Osp	Pol	Rca	Rla	Rph	Sem	Ssp
Bn1	<b>0,04%</b>													
Bsp2	8,04%	<b>8,34%</b>												
Bsp3	5,20%	4,34%	<b>0,47%</b>											
Hfa	11,09%	12,40%	10,77%	<b>0,20%</b>										
Hpl	10,99%	12,78%	11,32%	3,83%	<b>0,07%</b>									
Hsp	17,65%	18,07%	17,58%	14,74%	14,60%	<b>17,89%</b>								
Lsp	16,29%	13,15%	16,27%	16,28%	15,87%	18,80%	<b>4,20%</b>							
Osp	8,17%	9,89%	7,49%	12,62%	12,80%	18,18%	16,98%	<b>0,33%</b>						
Pol	10,99%	12,67%	11,78%	9,88%	10,79%	15,81%	15,64%	13,64%	<b>0,00%</b>					
Rca	20,51%	21,06%	20,80%	20,28%	20,08%	20,39%	21,22%	19,79%	17,26%	<b>0,33%</b>				
Rla	20,38%	21,28%	21,05%	18,19%	18,54%	20,24%	20,78%	22,39%	18,85%	19,59%	<b>0,50%</b>			
Rph	19,56%	20,80%	20,17%	18,79%	18,50%	19,85%	21,29%	19,44%	17,06%	15,24%	14,87%	<b>0,00%</b>		
Sem	12,26%	13,95%	12,98%	7,49%	7,15%	16,21%	16,23%	14,62%	9,96%	19,65%	19,58%	19,25%	<b>2,95%</b>	
Ssp	20,30%	20,85%	20,59%	20,07%	19,87%	20,17%	21,01%	19,58%	17,06%	0,17%	19,38%	15,04%	19,44%	<b>0,00%</b>

Bni: *Bariancistrus niveatus*, Bsp 2: *Bariancistrus* sp. 2, Bsp. 3: *Bariancistrus* sp. 3, Hsp: *Hartia* sp. H.faveolus: *Hypostomus faveolus*, H.plecostomus: *Hypostomus plecostomus*, Lsp.: *Lasiancistrus* sp., Osp: *Oligancistrus* sp., P.oligospila: *Peckoltia oligospila*, Rca: *Rineloricaria castroi*, Rla: *Rineloricaria lanceolata*, Rph: *Rineloricaria phoxocephala*, Sem: *Squaliforma emarginata*, Ssp: *Spatuloricaria* sp.

A distância intraespecífica apresentou variação significativa para as seguintes espécies: *Bariancistrus niveatus* (0,00% a 17,40%); *Hartia* sp. (0,33% a 24,63%) e *Lasiancistrus* sp. (0,00% a 24,39%). 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. As sequências nucleotídicas das 14 espécies foram comparadas com as depositadas no BOLD- *Barcode of Life Data Systems*, que possui 261 registros, para as espécies da família Loricariidae. Das 14 espécies onde se obteve a sequência do gene COI, apenas três foram encontradas depositadas no BOLD. Foi feito o alinhamento dessas três espécies com as 14 obtidas no presente estudo, em seguida foi gerada uma árvore de agrupamento por similaridade (Figura 3), onde foi verificado que: A espécie *Peckoltia oligospila*, *Hypostomus faveolus* e *Rineloricaria* sp., apresentaram similaridade acima de 80% (Tabela 3) com as sequências nucleotídica das respectivas espécies geradas neste trabalho.

Tabela 3. Tabela com as espécies do presente estudo e as espécies depositadas no BOLD e o respectivo percentual de similaridade entre elas.

Espécie	Espécie Bold	% Similaridade
<i>Hypostomus Plecostomus</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i>	95,87%
<i>Peckoltia oligospila</i>	<i>Peckoltia oligospila</i>	96%
<i>Rineloricaria</i> sp.	<i>Rineloricaria castroi</i>	84%

## CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se comprovar a validação da metodologia do DNA Barcode para identificação genética de pelo menos nove espécies da Família Loricariidae a partir do fragmento Citocromo Oxidase subunidade I (COI), contribuindo na questão da distinção das espécies, uma vez que no mercado de peixes ornamentais, indivíduos de espécies diferentes são comercializados como uma única espécie e ainda para complementar o banco de dados de sequências públicas como o BOLD. Portanto, a metodologia do DNA barcode representa uma nova alternativa para ampliar pesquisas sobre biodiversidade das espécies e identificá-las.

## REFERÊNCIAS

- Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S.A.; Museu, N. 2007. *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Museu Nacional. Rio de Janeiro
- De Melo, C.E. 2005. Peixes do Rio das Mortes: identificação e ecologia das espécies mais comuns. Editora UNEMAT
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95)98)NT. *Nucleic Acids Syposium Series*, 41: 95-98.
- 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.
- 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.
- Saitou, N. e Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- 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.