

PROSPECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DISTINÇÃO DE ESPÉCIES DE *Astyanax* DE RIACHOS E CÓRREGOS DAS BACIAS DOS RIOS PIRAPÓ E IVAÍ

Bárbara Scorsim Arjona¹, Ana Luiza de Brito Portela Castro², Alessandra Valéria de Oliveira³

¹ Acadêmica do programa de iniciação científica (PIC-UEM); Discente do programa de pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), Universidade Estadual de Maringá. barbarascorsim@gmail.com

² Co-orientadora. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA)/Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. albpcastro@nupelia.uem.br

³ Orientadora. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA)/Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. avoliveira@uem.br

RESUMO

A diversidade da ictiofauna na região Neotropical é subestimada devido a identificação e descrição de muitas espécies ser dificultada pela falta de caracteres morfológicos diagnósticos e pela existência de complexos de espécies crípticas. *Astyanax* (família Characidae) se encontra dentre os grupos de difícil taxonomia, devido a esse fator, o objetivo deste trabalho foi averiguar a eficiência de marcadores moleculares COI e ND2 na identificação e discriminação de espécimes de *Astyanax* das bacias dos rios Ivaí e Pirapó. Amostras de tecido muscular dos espécimes tiveram seu DNA extraído, amplificado e sequenciado. Posteriormente, as sequências nucleotídicas foram editadas, alinhadas e em seguida foi estimada a distância p e realizada a construção de cladogramas. As análises demonstraram pouca eficiência para a discriminação das espécies pelo COI e carência de sequências em bancos de dados para o ND2. Contudo, foi possível realizar a identificação inequívoca de alguns espécimes coletados, auxiliando, no esclarecimento de incertezas taxonômicas do grupo.

PALAVRAS-CHAVE: *Astyanax*; COI; ND2; *Oligosarcus*.

1 INTRODUÇÃO

Na região Neotropical a diversidade da ictiofauna é subestimada e usualmente apresenta uma diversidade críptica difícil de ser avaliada exclusivamente por meio de caracteres morfológicos. Quando se trata de riqueza de espécies nessa região, destacam-se as ordens Siluriformes e Characiformes, que juntas somam cerca de 80% do número total de espécies que compõe os grupos dominantes em grande parte dos ambientes lóticos do Alto Paraná (LANGEANI et al., 2007).

Characidae é a maior e mais complexa família de Characiformes, totalizando 1040 espécies (TENORIO et al., 2013). Pertencente a essa família, *Astyanax* Baird & Girard, 1854 é um gênero de peixe de pequeno porte, conhecido popularmente como lambari ou piaba, este grupo apresenta muitos problemas taxonômicos, sendo alocado como *incertae sedis* (LIMA et al., 2003).

Com o intuito de discriminação e identificação de novas espécies e de complexos de espécies crípticas, técnicas moleculares baseadas em sequenciamento de DNA têm sido empregadas com sucesso por taxonomistas (GOMES et al., 2015). Em nosso estudo, a eficiência de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais na discriminação de espécies e populações de *Astyanax* de riachos e córregos das bacias dos rios Pirapó e Ivaí, foi avaliada.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas dos exemplares foram realizadas em três diferentes córregos (Rio Keller, Córrego Itz e Córrego 19) das bacias dos rios Pirapó e Ivaí, com autorizações cedidas pelo Ministério do Meio Ambiente - MMA/Instituto Chico Mendes de Conservação da

Biodiversidade - ICMBio (SISBIO), nº 58187-2. Os espécimes foram anestesiados (CEUA, Nº 4640200717, aprovado em 24/08/2017) e manipulados somente após não responder a nenhum estímulo físico. O DNA total de amostras de tecido muscular foi extraído utilizando o kit de extração Promega Wizard® Genomics, de acordo com instruções do fabricante. Para a estimativa da concentração de DNA presente nas amostras, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1.0% e a comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

Foram amplificados fragmentos parciais dos genes mitocondriais da subunidade I da Citocromo c Oxidase (COI) e subunidade 2 NADH desidrogenase (ND2), que posteriormente foram purificados seguindo o protocolo de Rosenthal et al. (1993). Para a reação de sequenciamento unidirecional foi utilizado o kit Big Dye Terminator. O sequenciamento foi realizado no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP). As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas com o software *BioEdit*, e posteriormente alinhadas pelo algoritmo Clustal W no software MEGA 7 (TAMURA et al., 2013), no qual também foi determinada a distância p . Os cladogramas foram construídos com o algoritmo de *Neighbor-joining* com 1.000 reamostragens de *bootstrap*.

Foram adicionadas às análises sequências de COI (59) e ND2 (3) disponíveis nos bancos de dados *Bold System* e *GenBank*, de espécies de *Astyanax* e *Oligosarcus* relatados para a região da planície de inundação do alto rio Paraná.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sequências do marcador mitocondrial COI, com aproximadamente 585 pares de bases, foram obtidas para cada espécime analisado, totalizando 11 sequências. Além dessas, foram obtidas mais 5 sequências referentes ao locus ND2, com fragmentos de aproximadamente 1080 pares de base.

A análise das sequências obtidas nos permite aferir que no rio Keller estão presentes espécimes de *Oligosarcus pinto* (amostras K1 e K2; distância $p= 0.000$ em relação a sequências do Genbank) e de diferentes espécies de *Astyanax* (amostras k3, k5, k6, k7). As amostras K5, K6 e K7 foram idênticas e apresentaram similaridade com as espécies *A. bockmanni* ($p= 0.006$) e *A. paranae* ($p= 0.013$), enquanto a amostra K3 apresentou similaridade com *A. lacustris* ($p= 0.020$). Em relação ao córrego 19 (espécime C34) foi verificada a presença de uma espécie de *Astyanax*, entretanto não foi possível identificá-la uma vez que, com base na matriz de distância p , ela apresenta similaridade tanto a *A. biotae* ($p= 0.007$) quanto a *A. eigenmanniorum* ($p= 0.004$).

No que diz respeito ao córrego Itz (amostras i1, i2, i5 e i7) podemos inferir, com base nos valores de distância e na análise do cladograma, que há a presença de ao menos duas espécies distintas de *Astyanax*. Os exemplares i2 e i5 estão próximos geneticamente das espécies *A. biotae* ($p= 0.007$) e *A. eigenmanniorum* ($p= 0.004$). Apesar da amostra i7 não apresentar nenhum valor de distância p dentro do parâmetro de 2% previsto por Hebert et al. (2003) e Rossini et al. (2016), para a delimitação de espécies, seus menores valores de distâncias foram em relação a *A. biotae* ($p= 0.027$) e *A. eigenmanniorum* ($p= 0.023$). Já a amostra i1 apresenta similaridade com as espécies *A. bockmanni* ($p= 0.009$) e *A. paranae* ($p= 0.019$).

Como podemos observar na Figura 01, o COI não foi capaz de discriminar totalmente as espécies da área de estudo. Levando em consideração todas as sequências analisadas foi possível a discriminação das espécies: *A. schubarti*, *A. lacustris*, *A. eigenmanniorum*, *O. pinto* e *O. paranensis*. Entretanto, demonstrou problemas na distinção das espécies: *A. fasciatus*, *A. biotae*, *A. bockmanni* e *A. paranae*.

Utilizando o mesmo marcador, Rossini et al. (2016), não conseguiram diferenciar todas as espécies de *Astyanax* estudadas, apenas 17% do total foi identificado com certeza, contrapondo os dados de Pereira et al. (2013), no qual 99,2% das espécies analisadas,

dentre elas o gênero *Astyanax*, das regiões do alto rio Paraná, foram identificadas corretamente. Em contraposição, com o uso do ND2, não foi possível realizar uma identificação assertiva, em função da carência de sequências disponíveis em banco de dados.

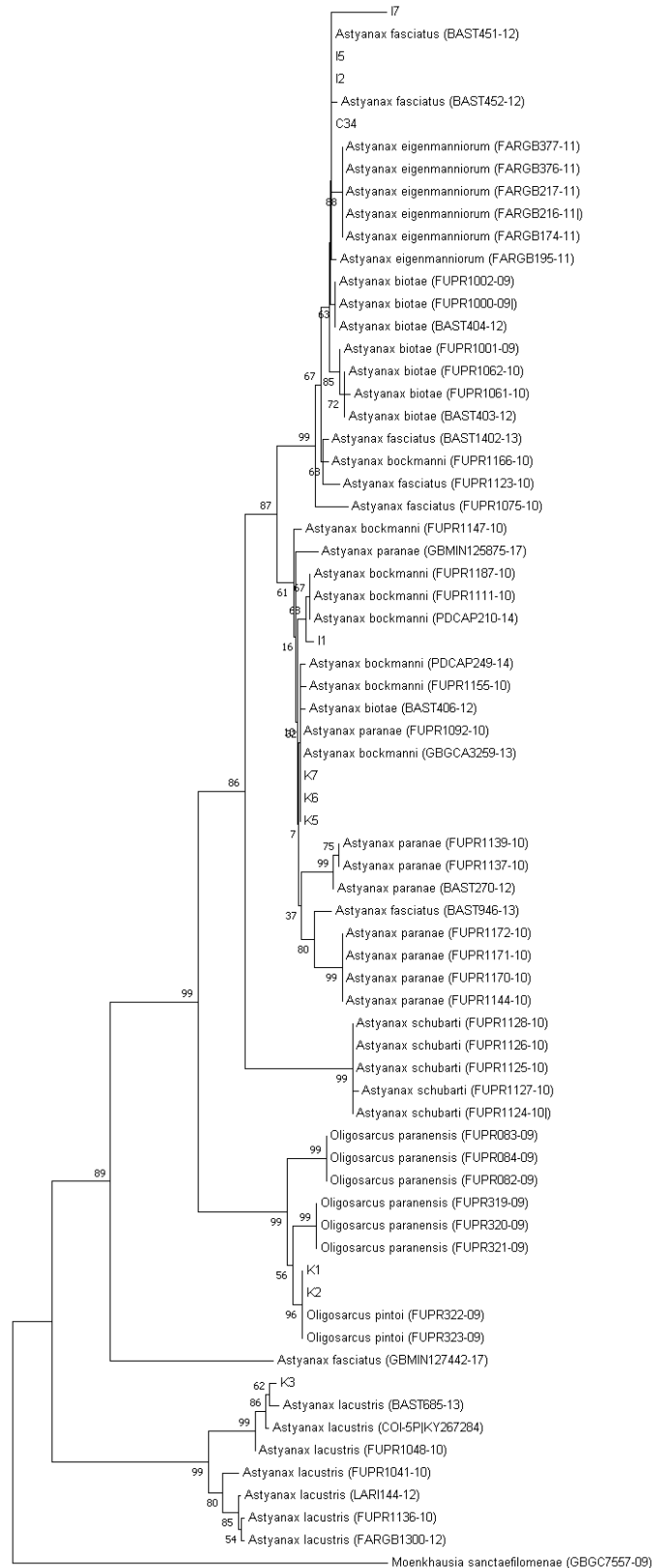


Fig. 01. Cladograma *Neighbor-joining* com 1.000 reamostragens de *bootstrap*, construído a partir de sequências de *COI* de espécies obtidas do *Bold System*, e de *Astyanax* sp e *Oligosarcus* sp. analisados no presente trabalho. *Moenkhausia sanctaefilomenae* foi utilizada como grupo externo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no trabalho, conclui-se que a discriminação de espécies de *Astyanax* por meio do marcador molecular COI é eficiente apenas em alguns casos. Ademais, a carência de sequências de ND2 em bancos de dados impossibilita a comparação e distinção de diferentes espécies do gênero. Entretanto, os resultados se mostraram promissores, uma vez que as análises puderam identificar molecularmente espécimes de *Oligosarcus* e a presença de diferentes espécies de *Astyanax*, contribuindo, desse modo, com os taxonomistas.

REFERÊNCIAS

GOMES, L.C. et al. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica*. 143, 581–588, 2015.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 2003.

LANGANI, F. et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotrop.* 7: 181-197, 2007. Disponível em [<http://www.redalyc.org/html/1991/199114292020>]. Acesso em 27/05/2018.

LIMA, F.C.T. et al. Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America (Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ, eds.) *Edipucrs*, Porto Alegre, 2003.

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

ROSENTHAL, A.; COUTELLE, O.; CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research*. 21: 173 – 174, 1993.

ROSSINI, B.C. et al. Highlighting *Astyanax* Species Diversity through DNA Barcoding, *Plos One*, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0167203

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolucion*. 12: 2725-2729, 2013.

TENORIO, R.C.C.O. et al. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotropical Ichthyology*. 11: 553-564, 2013. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252013000300553&lng=en&nrm=isso]. Acesso em 03/05/2018