AVALIAÇÃO DA DIVERGÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO MARCADOR CITOCROMO C OXIDASE I (COI) EM *Isbrueckerichthys* (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)

Caroline Dias Rosa (UEPG), Rafael Bonfim de Almeida (Pesquisador), Viviane Nogaroto (Pesquisadora) Marcelo Ricardo Vicari (Orientador), e-mail: vicarimr@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento De Biologia Estrutural, Molecular e Genética

Ciências Biológicas, Genética, Genética Animal.

Palavras-chave: Ictiofauna neotropical, DNA barcode, marcadores mitocondriais.

Resumo

O gênero *Isbrueckerichthys* Derijst, 1996 (Loricariidae), apresenta cinco espécies (*I. epakmos*, *I. alipionis*, *I. duseni*, *I. calvus* e *I. saxicola*) que ocorrem nos rios Ribeira e Tibagi. As nascentes destes rios estiveram envolvidas em eventos geológicos pretéritos de capturas de cabeceiras de rios e intercâmbio de faunas. Testes genéticos para compreender a dispersão de espécies e populações são importantes para o entendimento da diversidade de peixes nos rios paranaenses. Neste estudo, exemplares de *Isbrueckerichthys* de dois rios paranaenses foram analisados quanto a identificação molecular e distância genética. Exemplares de *Isbrueckerichthys* coletados em Itaiacoca (bacia do rio Ribeira), Ponta Grossa-PR retornaram identificação molecular de *I. duseni*. Espécimes amostrados em Londrina-PR (bacia do rio Tibagi) não retornaram identificação molecular no *Barcode of Life Data Systems* (BOLD). Às análises de fluxo gênico e diversidade nucleotídica (π) observada indicaram que as duas populações estão separadas geograficamente e não compartilham fluxo gênico. Os exemplares capturados em Londrina-PR correspondem a localidade tipo da espécie *I. saxicola* e são os primeiros dados de identificação molecular para a espécie.

Introdução

A ictiofauna dulcícola neotropical é a mais rica do mundo, extremamente diversificada e numerosa. Apesar desta grande diversificação, boa parcela do número total de espécies é ainda não descrito (BENZAQUEM et al., 2015). As espécies não são homogêneas geneticamente, mas estruturadas em grupos de indivíduos geneticamente semelhantes, estando o grau de isolamento diretamente relacionado à dispersão de indivíduos entre estes grupos (LAIKRE et al., 2005). A separação geográfica, a capacidade de dispersão restrita dos indivíduos e, comportamento de *homing* ou filopatria são os principais mecanismos que promovem o isolamento das populações, as quais acumulam mutações diferenciais. A denominada “estrutura genética populacional” de uma espécie é o padrão de distribuição da variação genética dentro e entre populações (LAIKRE et al., 2005). A identificação desta estrutura e diversos outros parâmetros é possível mediante a utilização de técnicas morfológicas e moleculares (THUESEN et al., 2008). Marcadores mitocondriais podem fornecer informações necessárias para estudos de relações filogenéticas, estimativa de distância genética, discriminação de

subpopulações assim como investigar a história da biogeografia (GARRIGAN; HAMMER, 2006).

O gene Citocoromo Oxidase C Subunidade I (COI) é utilizado estudos populacionais de variabilidade genética pela sua universalidade e importância evolutiva, além disso, é conservado entre os mais diversos genomas e possui suficiente diferenciação entre espécies por apresentarem padrão de sequência barcode espécie-específicos (TAUTZ et al., 2003). Entre os peixes da ictiofauna neotropical, o gênero *Isbrueckerichthys* Derijst, 1996 (Loricariidae), agrupa cinco espécies com distribuição nas bacias dos rios Ribeira de Iguape e Tibagi (JEREP et al., 2006). Três espécies do gênero (*I. duseni*, *I. calvus* e *I. saxicola*) ocorrem nos rios Ribeira e Tibagi no Paraná. Essa região é reconhecida por apresentar eventos geológicos pretéritos de capturas de cabeceiras de rios e intercambio de faunas (RIBEIRO, 2006). Neste contexto, testes genéticos para a compreensão da diversidade e dispersão de espécies e populações foram aplicados neste estudo para o entendimento da diversidade de espécies de peixes nos rios paranaenses.

Material e Métodos

As coletas das espécies de *Isbrueckerichthys* foram realizadas em dois rios paranaenses, um localizado na bacia do rio Tibagi e outro na bacia do rio Ribeira. Os procedimentos de pesquisa envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da UEPG (CEUA 29/2016).

A extração do DNA genômico foi realizada de tecidos do animal (fígado) a partir do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). A realização da PCR para a amplificação do gene COI empregou os primers chamados Fish F1 e Fish R1 (WARD et al., 2005). A reação de PCR foi composta de 1x Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM dNTPs, 2mM $MgCl_2$, 2 U de Taq DNA polymerase, 0.2 µM primers e 50 ng/mL de DNA molde. Para o programa de reação no termociclador foi utilizada a seguinte condição: desnaturação inicial por 5min a 94ºC, 35 ciclos de 94ºC por 45s, 55,4ºC por 1 min, 72ºC por 1min e 30s e, extensão final a 72ºC por 5min.

O produto da PCR foi purificado seguindo o protocolo do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências do COI foram analisadas com o programa Bioedit 5.0.9. Com a análise do produto do sequenciamento foi obtido uma sequência consenso para cada segmento de DNA em cada espécime. Estas sequências foram submetidas a análise de identidade no BOLD. As análises da distância genética entre as populações foram realizadas com o programa MEGA 5.1. (Molecular evolutionary genetics analysis), o qual permitiu a comparação de sequências moleculares bem como a construção de árvores filogenéticas (KUMAR et al., 2008). A distância genética foi calculada utilizando o modelo Kimura-2-parametros (K2P) (KIMURA, 1980).

Para análise filogenética foi realizada a construção de uma árvore enraizada para determinar quão perto ou distante nossa sequência de estudo se encontra de uma outra conhecida. Espécies utilizadas como “outgroup” foram distantes de todos as outras espécies analisadas (considerado como possuindo um ancestral comum com todas as entidades). O método de Neighbor-Joining (NJ) foi utilizado para construção da árvore (SAITOU; NEI, 1987). Como técnica de estimação de erros estatísticos, foi utilizada a análise de bootstrap, o qual foi utilizada para medir o grau de suporte dos nós nas árvores filogenéticas pelo alinhamento das sequências no

programa Mega 5.1, no momento da construção da árvore filogenética. Análises filogenéticas mais robustas foram construídas utilizando os programas JModeltest, PhyML e MrBayes.

Resultados e Discussão

Foram analisadas sete sequências pertencentes à região *folmer* referente à porção inicial 5' do gene COI. As sequências referentes às amostras coletadas em Itaiacoca retornaram resultados na análise de identidade no BOLD que indicam pertencer à *I. duseni* (98,89 – 100 %), enquanto as sequências dos espécimes de Londrina não retornaram correspondência a espécies depositadas no BOLD. A falta de correspondência destas sequências podem ser explicadas devido ao fato de poucas ou nenhuma sequência da espécie em questão estar depositada no BOLD. O ribeirão Jacutinga, Londrina-PR, local de amostragem de espécimes deste estudo, é a localidade tipo de *I. saxicola* (JEREP et al., 2006). Os exemplares coletados no ribeirão Jacutinga também possuem identificação morfológica para *I. saxicola*. Diante destes dados, as sequências COI obtidas para este ribeirão correspondem a *I. saxicola*, o que pode ser uma contribuição deste trabalho com o depósito das sequências no BOLD.

As análises das árvores de verossimilhança, de *neighbour joining* e a análise bayesiana agruparam as sequências em dois ramos (Itaiacoca e Londrina), correspondes à *I. duseni* e *I. saxicola*, respectivamente (Figura 1). Esses resultados corroboram a descrição da espécie *I. saxicola* para o rio Tibagi (JEREP et al., 2006).

A diversidade nucleotídica (π) para as sequências de *I. duseni* amostradas em Itaiacoca foi de 0,01057, enquanto em *I. saxicola* apresentou π = 0,03681. O índice ΦST foi de 0,70675. Este valor de ΦST indica separação populacional e que as espécies não compartilham fluxo gênico. A análise da distância genética de K2P entre *I. duseni* e *I. saxicola* foi de 8,6 %. Em peixes, valores K2P superiores a 2% são considerados válidos para definição de espécies (WARD et al., 2005).

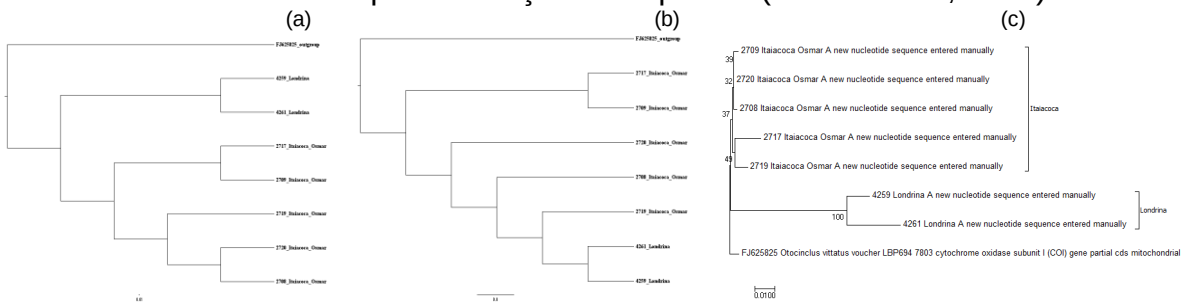


Figura 1 – Agrupamentos gerados com as sete sequências do gene COI de *Isbrueckerichthys*. Em (a) árvore de máxima verossimilhança construída no PhyML com 1.100.000 replicatas utilizando o modelo evolutivo HKY+G descrito no Jmodeltest; em (b) árvore construída através de análise bayesiana com 1.100.000 replicações utilizando o modelo evolutivo HKY+G dado pelo JModeltest e em (c) árvore de neighbour-joining construída utilizando as distâncias K2P. Números abaixo dos ramos representam os valores de bootstrap com 1000 replicações. Os comprimentos dos ramos são proporcionais à distância genética.

Conclusão

As análises conjuntas, tanto moleculares quanto filogenéticas mostram que os exemplares de *Isbrueckerichthys* coletados em Itaiacoca e Londrina correspondem à *I. duseni* e *I. saxicola*, respectivamente. Esses dados são iniciais para a análise da estruturação populacional e dispersão de *Isbrueckerichthys*. Contudo, a ampliação

do número de espécies e populações amostradas podem ajudar no entendimento do dispersão e especiação deste grupo de peixes Neotropical.

Agradecimentos

Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio/SISBIO No. 15117) pela autorização de captura de exemplares de peixes na natureza. O estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico do Estado do Paraná (Fundação Araucária) e bolsa de iniciação cientifica concedida pela Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Referências

BENZAQUEM, D.C.; OLIVEIRA C.; BATISTA, J.S.; ZUANON, J.; PORTO, J.I. DNA Barcoding in Pencilfishes (Lebiasinidae: Nannostomus) Reveals Cryptic Diversity across the Brazilian Amazon. **Plos One** v. 10, n. 2, p. 1-14, 2015.

DOYLE J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** v. 19, p. 11-15, 1990.

GARRIGAN, D.; HAMMER M.F. Reconstructing Human Origins in the genomic era. **Nature Reviews Genetics** v. 7, p. 669-690, 2006.

JEREP, F.C.; SHIBATTA, O.A.; PEREIRA, E.H.L.; OYAKAWA, O.T. Two new species of *Isbrueckerichthys* Derijst, 1996 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paranapanema basin, Brazil. **Zootaxa** v. 1372, p. 53-68, 2006.

KIMURA, M.A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** v. 16, p. 111-120, 1980.

KUMAR, S.; NEI, M.; DUBLEY, J.; TAMURA, K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics** v.9, p. 299-306, 2008.

LAIKRE, L; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **Ambio** v. 34, n. 2, p.111-119, 2005.

RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology** v 4, p. 225–246, 2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4, p. 406-425, 1987.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R.H.; VOGLER, A.P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution** v.18, n. 2, p. 70-74, 2003.

THUESEN, P.A; PUSEY, B.J; PECK, D.R.; PEARSON, R.; CONGDON, B.C. Genetic differentiation over small spatial scales in the absence of physical barriers in an Australian rainforest stream fish. **Journal of Fish Biology** v. 72, p.1174-1187, 2008.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** v. 360, p. 1847-1857, 2005.