



# UTILIZAÇÃO DO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO *C* OXIDASE I PARA DISTINGUIR DUAS ESPÉCIES DE *ZUNGARO* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE) DE DUAS BACIAS NEOTROPICAIS

Panarari - Antunes, R.S.1

Gomes, V.N.2; Bignotto, T.S.2; Maniglia, T.C. 2, Prioli, S.M.A.P.2; Prioli, A.J.2

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Instituto Federal do Paraná Campus Palmas - PR 280, Trevo da Codapar, Palmas - PR

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Celular e Genética Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura Universidade Estadual de Maringá - AV. Colombo 5790, JD Universitário, Maringá - PR

vivianngomes@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

A comunidade ictiofaunística da região Neotropical é considerada a mais diversa, com alto número de espécies endêmicas e *taxa* crípticos. Além disso, inúmeras espécies são enquadradas como sobre - exploradas ou vulneráveis, como o caso das espécies do gênero *Zungaro* Bleeker, 1858 (jaú) (Ministério do Meio Ambiente, 2004), o que potencializa a necessidade de identificação correta das espécies. Indivíduos do gênero *Zungaro* presentes nas bacias do rio Paraná - Paraguai e bacias do rio Amazonas e Orinoco possuem aspectos morfológicos muito semelhantes. Lundberg & Littmann (2003) definiram duas espécies de jaús para essas diferentes bacias, *Zungaro jahu* (Ihering, 1898) com distribuição na bacia do rio Paraná - Paraguai e *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821) encontrado nas bacias do rio Amazonas e Orinoco. Estudos realizados por Boni (2008) corroboraram as duas espécies através de dois marcadores moleculares. Hebert *et al.*, (2003) propuseram uma metodologia padrão, denominada de *DNA barcoding*, com propósito de identificar e descrever a biodiversidade global através de uma porção do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase I (COI). Como tomada de decisão para identificação das espécies foi estipulado um limiar de 10X entre variação intra - específica e interespecífica. Para auxiliar na identificação das espécies de peixes do gênero *Zungaro*, o critério de *DNA barcoding* pode ser uma ferramenta eficaz. Porém,

se faz necessária a avaliação da magnitude do polimorfismo nucleotídico da sequência COI. No presente estudo, o critério de *DNA barcoding* foi avaliado quanto à eficiência na discriminação das espécies *Z. jahu* e *Z. zungaro* presentes na região Neotropical.

## OBJETIVOS

Avaliar a eficiência da sequência padrão do *DNA barcoding* na separação das espécies próximas de *Z. jahu* e *Z. zungaro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e Locais de coleta: Foram coletados oito indivíduos de *Z. jahu*, sendo quatro exemplares do rio Paraná e quatro do rio Manso (bacia do rio Paraná - Paraguai) e dois indivíduos de *Z. zungaro* no rio Tocantins (bacia Amazônica). Amostras do tecido muscular foram retiradas, fixadas em álcool comercial puro e armazenadas sob refrigeração a - 20°C.

Processamento do DNA: Para extração do DNA seguiu - se o protocolo de Monesi *et al.*, (1998), com algumas modificações (Prioli *et al.*, ., 2002). A quantificação do DNA foi realizada por comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago  $\lambda$  em gel de agarose. DNA individual foi utilizado para amplificação por PCR de fragmentos do gene COI com os *primers* descritos por

Ward *et al.*, (2005) sob condições descritas por Prioli *et al.*, (2002). Os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose e comparados com o padrão *Ladder* 100 pb. Posteriormente, as amostras foram purificadas usando - se polietileno glicol segundo protocolo de Rosenthal *et al.*, (1993) e armazenadas a 20°C. O produto final obtido de cada reação de PCR foi utilizado diretamente para o sequenciamento em plataforma MegaBace (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante.

Análise dos dados: As seqüências nucleotídicas foram editadas manualmente e alinhadas com algoritmo *Clustal W* implementado no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1*. As análises de diversidade intra e interespecífica foram feitas no programa *MEGA 4.0* através do modelo de substituição nucleotídica Kimura - 2 - Parâmetros. As árvores filogenéticas foram construídas pelo algoritmo *neighbor - joining* (NJ) com suporte de 10.000 *bootstrap*.

## RESULTADOS

Após a edição e alinhamento das seqüências obtive - se fragmentos de 546 pares de base. Não foram observados *indels* ao longo das seqüências ou códons de terminação após a tradução. Foram constatadas 15 substituições nucleotídicas, sendo quatorze transições e apenas uma transversão que resultou em substituição de fenilalanina na posição 173. Apenas uma substituição nucleotídica promove polimorfismo intra - específico, outras quatorze são espécie - específicas.

As médias das distâncias genéticas intra - específicas para foram baixas variando de 0 a 0,1% em *Z. jahu* e *Z. zungaro*, respectivamente. Esses valores estão em patamar frequente de polimorfismo intra - específico do gene COI em peixes e outros grupos animais. Em contraste, o valor interespecífico obtido foi de 2,7%, sendo baixo quando comparado com valores de outros peixes de água doce. Porém, a diversidade interespecífica foi suficiente para a separação dos indivíduos das duas espécies através do critério do *DNA barcoding*, ou seja, foi pelo menos dez vezes maior do que a média da variabilidade intra - específica. As relações filogenéticas também revelaram a diferenciação entre as duas espécies. A árvore filogenética NJ formou dois diferentes clados, um composto por espécies de *Z. jahu* e outro de *Z. zungaro*. No clado de *Z. jahu*, houve a separação de dois indivíduos da bacia do rio Paraná - Paraguai.

O acesso dos parâmetros genéticos traz benefícios inquestionáveis e extremamente necessários para taxonomia como em revelações de espécies crípticas e estruturação populacional. Da mesma forma, o *DNA barcoding* pode ser aplicado em diversos grupos com empecilhos taxonômicos, como em casos de identificação de ovos e larvas, microorganismos,

conteúdos estomacais e espécies com plasticidade fenotípica. Além de auxiliar em situações de impossibilidade de identificação através da morfologia, como nas espécies aqui estudadas.

## CONCLUSÃO

A magnitude da diversidade nucleotídica do gene COI de *Z. jahu* e *Z. zungaro*, foi suficiente para distingui - las, satisfazendo os critérios da proposta do *DNA barcoding* para separação de espécies. Torna - se evidente o potencial do gene COI para discriminação de espécies próximas do gênero *Zungaro*.

## REFERÊNCIAS

- Boni, T.A. Comparação Molecular de Populações Naturais de Jaú (*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das bacias Amazônicas e do Paraná - Paraguai. Programa de Pós - Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Maringá, PR, UEM. 2008, 59 p.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 313 - 321, 2003.
- Lundberg, J.G., Littmann, M.W. Family Pimelodidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, 2003, p. 432 - 446.
- Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção. Instrução Normativa nº 5 (21/maio/2004). 2004. Disponível em <http://www.mma.gov.br>.
- Monesi, N., Jacobs - Lorena, M., Paço - Larson, M.L. The DNA puff gene BhC4 - 1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 107: 559 - 569, 1998.
- Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J., Júlio - Jr, H.F., Pavanelli, C.S., Oliveira, A.V., Carrer, H., Carraro, D.M., Prioli, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.*, 25: 421 - 430, 2002.
- Rosenthal, A., Coutelle, O., Craxton, M. Large - scale of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res.*, 21: 173 - 174, 1993.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. DNA Barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. London*, 360:1847 - 1857, 2005. (Apoio: CNPq - PELD; NUPELIA/UEM; Furnas Centrais Elétricas; CAPES.)