

Diversidade genética entre populações do gênero *Trichomycterus* do rio Jirau Alto, Bacia do Rio Iguaçu

Genetic diversity among *Trichomycterus* population from Jirau Alto River, Iguaçu river Basin

RESUMO

Edina Fernanda Baranoschi
edinabaranoschi@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Hilda Vanessa Poquioma Hernandez
vpoquiomah@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Indianara Carniel da Silva
indyhh@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Elton Celton de Oliveira
eltonoliveira@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Thiago Cintra Maniglia
tmaniglia@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Todelo, Paraná, Brasil

Nédia de Castilhos Ghisi
nediaghisi@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Este trabalho tem por objetivo estudar a diversidade genética entre populações do gênero *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae) através do uso do gene COI, avaliando a variação hereditária das espécies para construir uma árvore filogenética. As coletas foram realizadas no rio Jirau Alto, localizado no município de Dois Vizinhos, Paraná. O rio Jirau Alto é um corpo hídrico afluente indireto do rio Iguaçu. Os animais foram identificados, seus dados biométricos anotados e as amostras retiradas para extração de DNA. Após a extração do DNA dos *Trichomycterus* foi realizada a amplificação do COI (Citocromo Oxidase I) ampliando-os através da PCR, e foi feito o seu sequenciamento e alinhamento. Até o momento foram identificadas 57 espécimes de *Trichomycterus*, com as seguintes espécies: 32 *T. stawiarski*, 20 *T. sp.1*, 04 *T. mboyce* e 01 *T. davis*. Destaca-se que *T. mboyce* é uma espécie ameaçada de extinção. O sequenciamento foi feito em quatro espécies de *T. stawiarski* e realizado um blast, o qual nos mostrou muita semelhança com *T. diabolus* e um pouco menos com *T. iheringi*. A semelhança encontrada entre as espécies de *Trichomycterus* e *T. diabolus* está na região organizadoras nucleares (NORs), sendo segmentos de DNA localizados nos braços curtos dos cromossomos.

PALAVRAS-CHAVE: Espécies endêmicas. Marcador molecular. DNA mitocondrial. Gene nuclear.

ABSTRACT

This work aims to study the genetic diversity between the genera *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae) using the COI gene, to evaluate an inherited variation of species for the creation of a phylogenetic tree. As collections were carried out in the Jirau Alto river, located in Dois Vizinhos, Paraná. The Jirau Alto river is a water body and indirect tributary of the Iguaçu river. The animals were used, their biometric data noted and as taken for DNA extraction. After extraction of *Trichomycterus* DNA, IOC (Cytochrome Oxidase I) amplification was performed, amplified by PCR, and sequenced and aligned. So far 57 specimens of *Trichomycterus* have been identified, with the following species: 32 *T. stawiarski*, 20 *T. sp.1*, 04 *T. mboyce* and 01 *T. davis*. It is noteworthy that *T. mboyce* is an endangered species. The sequencing was done on four *Trichomycterus* species and carried out in an explosion, or similarly to *T. diabolus* and somewhat less to *T. iheringi*. A similarity found between *Trichomycterus* and *T. diabolus* species is in the nuclear organizer region (NOR), with DNA records found in the short arms of chromosomes.

KEYWORDS: Endemic species. Molecular marker. Mitochondrial gene. Nuclear gene.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial, a poluição das águas está cada vez mais preocupante, pois as atividades humanas, sejam, domésticas, industriais ou comerciais geram resíduos, que alcançam os corpos d'água, causando graves implicações. Porém, a consequência que cada poluente traz depende da sua composição (PEREIRA, 2004).

Existem três principais fontes de poluição, sendo a primeira o aumento da urbanização e falta de saneamento básico. Por segundo o despejo de dejetos industriais com seus mais variados tipos de composição química e pôr fim a poluição provinda das atividades agrícolas, bem como pesticidas e fertilizantes (ARAUJO,1997).

Desta forma a biota aquática fica exposta a essas substâncias tóxicas proveniente dessas diversas fontes pontuais ou difusas. A partir do momento que essas substâncias entram nos corpos aquáticos começam interagir com os organismos residentes. Essas substâncias podem gerar um desequilíbrio ambiental, dependendo do tempo e grau de contaminação que esses organismos ficaram expostos (ARIAS et al., 2007).

Muitos rios brasileiros apresentam grande número de espécies endêmicas. Como exemplo, está o Rio Iguaçu, o qual apresenta uma grande taxa de peixes exclusivos, onde aproximadamente 70% não ocorrem em outra região do mundo. Isto significa que extinções locais nesse rio ocasionam uma extinção global (BAUMGARTNER et al., 2012).

A redução das espécies em consequência da degradação do seu habitat, está fortemente associada a uma perda da diversidade genética destas, fazendo com que elas simplesmente fiquem tão fragilizadas que não serão mais viáveis na natureza (SECRETARIADO DA CONVENÇÃO SOBRE BIODIVERSIDADE BIOLÓGICA - CBD, 2010). Neste sentido, o estudo da diversidade genética de espécies é muito importante para compreender a relação entre os indivíduos e o processo da evolução, e também é utilizada na conservação de populações e espécies (SANTOS et al., 2009).

Um exemplo de um grupo ameaçado de extinção são peixes da espécie *Trichomycterus mboycei*. Estes ainda não possuem suficiente literatura relevante e poucos conhecimentos sobre sua biologia. Os *Trichomycterus* fazem parte da ordem siluriformes, e popularmente recebem o nome de bagres. Para obter mais informações sobre espécie antes que ela desapareça é necessário estudar a sua diversidade genética e um método bem indicado é através de técnicas moleculares. Para isso deve ser feito coletas dos indivíduos, a extração do DNA e amplificação do material genético *in vitro* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Um marcador molecular indicado nestes estudos é o marcador mitocondrial D-loop, o qual se originou da palavra “Displacement loop”, essa região é responsável por controlar a replicação e transcrição do DNA mitocondrial, pelo fato de não possuir nenhum gene codificador essa região pode sofrer mutações e assim ter mais variações (FRANCISCO, 2003). A região D-loop, tem aproximadamente 1122 pares de bases (pb), sendo dividida em regiões hipervariáveis I, II e III (CARVALHO; CÂNDIDO; QUEIROZ, 2013). Outro marcador de interesse é o ITS. A região Internal Transcribed Spacer (ITS) é bastante utilizada devido ao fato de ser conservada entre espécies e possuir pouca variação entre gêneros (ROSA et al., 2006). Outro gene de interesse é o do gene mitocondrial citocromo C Oxidase 1 (“COI”), um pequeno trecho de DNA padronizado no genoma - em animais, 648 pb. A vantagem de usar COI é que é curta o suficiente para ser sequenciada de forma rápida, e longa o suficiente para identificar variações entre as espécies (GOMES, 2011).

Este estudo tem por objetivo fazer a análise da diversidade genética entre espécies de *Trichomycterus*, utilizando os marcadores COI e construir uma árvore filogenética para bem entender sua relação genética e a evolução do gênero, e assim conhecer um pouco mais da espécie *T. mboycy* que corre risco de ser extinta.

METODOLOGIA

O Rio utilizado para coleta das espécies foi o rio Jirau Alto, afluente indireto do rio Iguaçu, localizado no município de Dois Vizinhos. A microbacia do rio Jirau Alto possui uma área de 31,46km² e faz divisa com aproximadamente 125 propriedades rurais.

O projeto foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA - UTFPR) e pelo SISBIO. Para captura dos peixes foram utilizados quatro covos, os quais são colocados nos pontos do rio com coordenadas 25°45'1.253"S 53°2'39.822"W. Os covos foram dispostos uma semana por mês, em semana de lua cheia, com vistoria a cada 24 horas. Dentro dos covos foi usado pão como isca. As coletas começaram no mês de abril de 2018 e ainda estão sendo feitas.

Depois de coletados os peixes foram submetidos a eutanásia, levados ao laboratório e identificados através da chave de identificação descrita por Baumgartner et al. (2012). Nesta triagem, medidas morfométricas de peso, comprimento total e padrão foram anotadas. Depois da identificação e mensuração, foram feitas alíquotas de um pequeno fragmento do músculo do animal e o restante é fixado em álcool PA e armazenado em tubos em freezer. Estes fragmentos de tecido são usados para extração de DNA total. Para extrair o DNA é utilizado o protocolo descrito no Kit Wizard PROMEGA® (2009), ajustado para tecido fixado em etanol. Para verificar o sucesso da extração é realizada corrida eletroforética em gel de agarose.

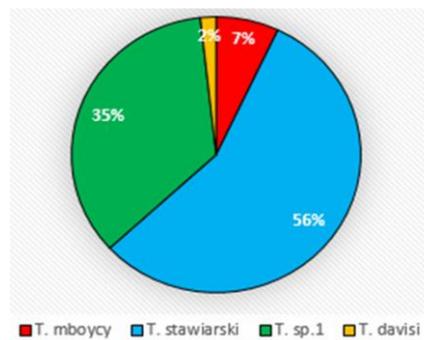
Após isso, é realizada a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Com a PCR as regiões de interesse serão amplificadas, ou seja, milhões de cópias desta mesma região serão geradas. Para amplificação do gene COI por PCR foram utilizados os primers universais FishF1 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGC3' e FishR1 5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAAT3' (WARD, 2012).

Depois da PCR as amostras passam por uma purificação com PEG para envio ao sequenciamento para empresa especializada. As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas manualmente e alinhadas em Clustal Ômega, com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1. Para fazer análise das sequências será utilizado o programa MEGA 6. Sequências do GeneBank foram buscadas para comparação. A árvore filogenética será construída pelo algoritmo neighbor-joining (NJ). As diversidades intra-específicas foram obtidas pela média dentre todos os indivíduos da espécie estudada.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Até o momento foram identificadas 57 espécies de *Trichomycterus*, sendo 32 *T. stawiarski*, 20 *T. sp1*, 4 *T. mboyce* e 1 *T. davis*, como mostra a figura 1. Podemos observar que a espécie ameaçada *T. mboyce* representa 4% dentre todas as espécies. As espécies identificadas também tiveram uma média de 5,32 gramas de peso, média de 7,03cm de comprimento padrão e 7,09cm de comprimento total.

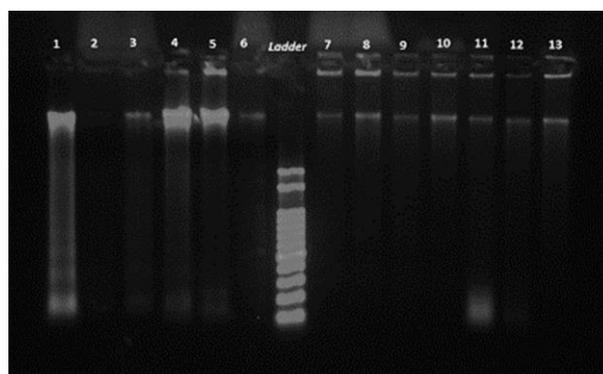
Figura 1 – Gráfico representando a porcentagem das espécies de *Trichomycterus* já coletadas do Rio Jirau Alto.



Fonte: Autoria própria (2019).

A eletroforese foi feita em gel de agarose depois da extração do DNA para verificar o sucesso da extração como mostra a figura 2.

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação do sucesso da extração do DNA. *T. stawiarski* (1), *T. stawiarski* (2), *T. stawiarski* (3), *T.sp1* (4), *T.sp1* (5), *T. stawiarski* (6), *T. stawiarski* (7), *T.sp1* (8), *T.sp1* (9), *T.sp1* (10), *T. stawiarski* (11), *T.sp1* (12), *T.sp1* (13).

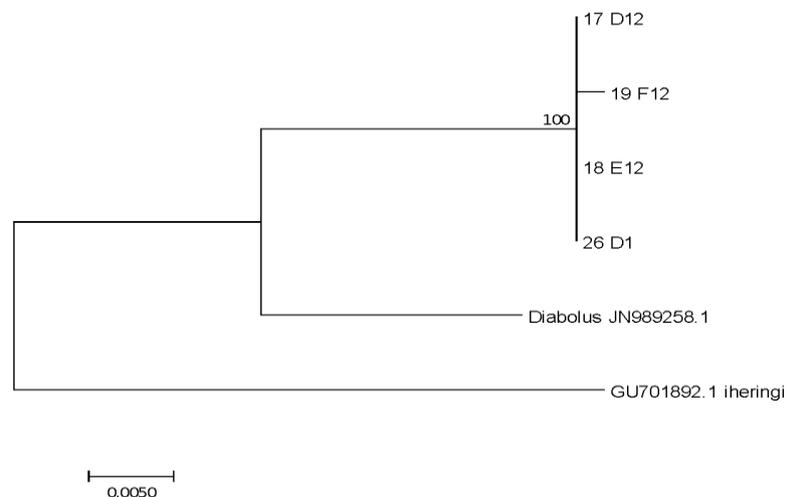


Fonte: Autoria própria (2019).

As análises do sequenciamento foram realizadas com amostras de 4 animais, o que nos forneceu um resultado deveras interessante. Realizamos um blast para prospectar com quais espécies mais se aproximavam as nossas sequências observamos muita semelhança com *T. diabolus* e um pouco menos com *T. iheringi*. Assim, utilizamos amostra de cada uma dessas espécies para realizar as comparações. As análises estatísticas foram todas feitas com a distância p. No entanto, como eram poucas amostras, não se determinou qual o melhor modelo evolutivo. Obteve-se o gráfico presente na figura 3.

Entre as amostras a distância p variou de 0 a 0,2%, com média de 0,1%. E a distância entre as amostras e *T. diabolus* variou de 3,4 a 3,6%. Entre as nossas amostra e *T. iheringi* houve distância de 0,68 a 0,7. Vale ressaltar que entre *T. diabolus* e *T. iheringi* distanciaram-se 0,65. Portanto, as 4 amostras pertencem a mesma espécie, e de acordo com a análise de BLAST, a espécie mais próxima é *T. diabolus*. Entretanto a distância entre nossas amostras e *T. diabolus* foi de 17 a 36 vezes maior do que a distância interna das 4 amostras. De acordo com a teoria do COI essa magnitude de distância é suficiente para ser considerado espécies diferentes. Sendo assim essas amostras poderiam ser consideradas de uma espécie diferente de todas que tem o COI disponível no GeneBank. No entanto, destaca-se que só obtivemos até agora quatro amostras e mais estudos são necessários, pois as análises de COI recomenda-se uma população grande para avaliar a distância genética dentro da população. Assim, se a distância entre as amostras e outra espécie comparada for 10 vezes maior do que dentro da população serão consideradas espécies diferentes.

Figura 3 - ÁRVORE NJ p distance 10.000 bootstrapping



Fonte: Autoria própria (2019).

CONCLUSÃO

As coletas terão continuidade, bem como as extrações e amplificações de DNA. Todas as amostras resultantes da PCR irão ser enviadas para sequenciamento

de DNA e depois disso iremos fazer as análises filogenéticas para concluir este estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação Araucária e a UTPR pela ajuda financeira para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, S. M. Apostila Engenharia Sanitária e Ambiental – **Introdução às ciências do Ambiente para Engenharia.** – UFPB. João Pessoa. 1997.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in streams and rivers. p. 61–72, 2007.

BAUMGARTNER, G. et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu.** Maringá: EDUEM, 2012.

CARVALHO, N. R.; CÂNDIDO, I. M.; QUEIROZ, P. Potenciais de uso forense do DNA mitocondrial. p. 1–19, 2012.

CEUA-UTPR. Função da CEUA. Disponível em: <http://portal.utpr.edu.br/comissoes/permanentes/comissao-de-etica-no-uso-de-animais-da-utpr/comissao-de-etica-no-uso-de-animais>. Acesso em: 18 Abr. 2019.

GOMES, V. N. Avaliação da sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo oxidase I na identificação de espécies de peixes neotropicais. Universidade Estadual de Maringá, 2011.

SANDOVAL, R. C. D. S. Marcadores moleculares como ferramentas para a identificação de dípteros de importância forense (CALLIPHORIDAE, MUSCIDAE). p. 1–69, 2011.

SANTOS, F. R. et al. Diversidade Genética. **Biota Minas: diagnóstico sobre o conhecimento da biodiversidade no estado de Minas Gerais**, p. 389–410, 2009.

SECRETARIADO DA CONVENÇÃO SOBRE BIODIVERSIDADE BIOLÓGICA - CBD. **Panorama Biodiversidade Global 3.** 3. ed. Brasília: MMA, 2010.

PEREIRA, R. S. **Poluição Hídrica: Causas E Consequências.** Revista Eletrônica de Recursos Hídricos, v. 1, n. 1, p. 20–36, 2004.

ROSA, D. D. et al. Diversidade de *Phytophthora parasitica* isolados de Citrus usando sequências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. Summa Phytopathologica, v. 32, n. 2, p. 188–191, 2006.

WARD, R. D. FISH-BOL, A Case Study for DNA Barcodes. v. 858, p. 423–439, 2012.