



Diferenciação molecular em peixes do gênero *Cambeva* em afluentes do rio Iguaçu

Molecular differentiation in fish of the genus Cambeva in tributaries of the Iguaçu River

Camila Luiza Comelli*, Nédia de Castilhos Ghisi[†], Indianara Carniel da Silva[‡],
Elton Celton de Oliveira[§]

RESUMO

Nas últimas décadas, nosso planeta vem sofrendo com a degradação do meio ambiente devido a ações antrópicas. Isso inclui espécies aquáticas de grande importância para o equilíbrio do ecossistema. Muitos rios já se encontram extremamente poluídos como é o caso da bacia do rio Iguaçu. Esse rio possui espécies endêmicas, ou seja, espécies que, no mundo inteiro só ali são encontradas. Dentre essas espécies está o gênero *Cambeva* que possui uma espécie com status de ameaçado de extinção. Esse trabalho tem como objetivo estudar a diferenciação molecular entre espécies do gênero *Cambeva* através do uso de marcadores moleculares como o gene ITS e D-loop. O rio utilizado para a coleta foi o Jirau Alto localizado no município de Dois Vizinhos e mais cinco riachos situados na cidade de Cascavel- PR. Com os 113 indivíduos coletados foi realizada extração de DNA, e posteriormente serão amplificados genes ITS e D-loop. O material amplificado será sequenciado, editado e alinhado para a determinação da proximidade genética de indivíduos de diferentes espécies com os dois genes.

Palavras-chave: Marcador molecular, diversidade genética, ictiofauna

ABSTRACT

In recent decades, our planet has been suffering from the degradation of the environment due to anthropic actions. This includes aquatic species of great importance for the balance of the ecosystem. Many rivers are already extremely polluted, as is the case of the Iguaçu River basin. This river has endemic species, that is, species that are only found there in the whole world. Among these species is the genus *Cambeva*, which has one species threatened with extinction status. This work aims to study the molecular differentiation between species of the genus *Cambeva* through the use of molecular markers such as the ITS and D-loop genes. The river used for the collection will be the Jirau Alto located in the municipality of Dois Vizinhos and five other streams located in the city of Cascavel- PR. With the 113 individuals collected, DNA extraction was performed, and subsequently ITS and D-loop genes will be amplified. The amplified material will be sequenced, edited and aligned to determine the genetic proximity of individuals of different species with the two genes.

Keywords: Molecular marker, genetic diversity, ichthyofauna

1 INTRODUÇÃO

* Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; milacomelli@gmail.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; nediaghisi@gmail.com

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; indy.cdasilva@gmail.com

[§] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; elton.c.oliveira2@gmail.com



Devido ao fato de a população humana ter aumento significativamente nas últimas décadas, a poluição da água está cada vez maior, pois as práticas antrópicas sejam para fins domésticos, industriais, comerciais ou agrícolas geram resíduos, os quais estão chegando ao leito dos rios, causando graves danos ao meio ambiente. As consequências de cada poluente dependem da sua composição (PEREIRA, 2004).

Os peixes são muito utilizados como bioindicadores para monitorar ambientes aquáticos. O uso desses animais é eficiente pois além de serem comuns, são de fácil amostragem e podem ser estudados em laboratório (FREITAS; SIQUEIRA-SOUZA, 2009). Existem muitas espécies aquáticas que ainda nem se quer foram descritas na literatura e uma das principais consequências pela poluição dos rios de água doce é a perda da biodiversidade (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014).

Muitos rios brasileiros possuem espécies endêmicas. O rio Iguaçu, por exemplo, apresenta uma elevada taxa de peixes endêmicos, aproximadamente 70% não são encontrados em outra região do mundo. Isso significa que extinções nesse rio ocasionam uma extinção global (BAUMGARTNER et al., 2012).

Um exemplo de espécie endêmica que é classificada como ameaçada de extinção é os *Cambeva mboycey*, segundo a portaria de N. 445 do MMA (BRASIL / (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015). Em virtude disso, é muito importante estudar a diversidade genética desses animais, pois além de compreendermos a relação entre os indivíduos e o processo de evolução, esses estudos auxiliam na conservação de espécies e populações.

Os *Cambeva* fazem parte da ordem siluriformes e são popularmente conhecidos como bagres. Recentemente, houve uma realocação, alguns indivíduos do gênero que antes era alocados como *Trichomycterus* foram destinados a um novo gênero chamado *Cambeva* (KATZ et al., 2018).

Para conhecermos um pouco mais desse gênero, antes que espécies como o *Cambeva mboycey* sejam extintas, utiliza-se técnicas moleculares para estudar sua diversidade genética. Para demarcar a região de interesse do DNA existem vários marcadores moleculares, sendo utilizados para isolar o gene/locus de interesse e posteriormente estudar o nível de relação entre as espécies. Marcadores do DNA ribossomal nuclear vem sendo muito utilizados nos últimos tempos. Esse DNA está localizado no núcleo da célula e é composto por genes e cada gene encontra-se em uma região específica chamada de locus (SANDOVAL, 2011).

Além dos marcadores de DNA ribossomal nuclear, os marcadores de DNA mitocondrial também são muito utilizados, esses por sua vez, possuem duas grandes vantagens. A primeira é o fato de ser haploide, a segunda é que a transmissão é dada pela mãe com ausência da recombinação genética. Sua evolução é dez vezes mais acelerada do que em genes nucleares de cópia única. Com uma taxa elevada, permite-se uma maior chance de serem criados marcadores espécie-específico, tornando-se uma excelente opção para a técnica de DNA *barcoding* (TRESBACH et al., 2015).

Esse trabalho tem como objetivo estudar a diferenciação molecular de espécies do gênero *Cambeva* através do uso de marcadores moleculares como o ITS e D-loop, para entender a sua relação genética e a evolução desse gênero.

2 METODOLOGIA

2.1 Área de estudo



O estudo ocorreu em um rio localizado na área urbana da cidade de Dois Vizinhos, na qual possui uma área de aproximadamente 418 km² e uma população estimada de 40.234 habitantes (IBGE, 2018). Outros pontos de coleta foram cinco riachos localizados na cidade de Cascavel- PR, são eles com suas respectivas coordenadas: rio Afluente de Quati (25° 0'1.33"S- 53°28'45.86"O), rio Pedregulho do Iguaçu (25° 6'7.17"S- 53°18'42.25"O), rio São José (25° 0'43.32"S- 53°19'50.53"O), rio Arquimedes (25° 9'10.25"S - 53°16'41.86"O) e rio Bom Retiro (25° 4'48.38"S- 53°24'2.86"O).

2.2 Coleta

A licença para a coleta desses animais foi cedida através do sistema de atendimento à distância que permite aos pesquisadores solicitarem autorizações para a coleta de material biológico (SISBIO- N° 62556-1). Esse projeto passou pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA), descrita na Lei 11.794/2008, visando o comprometimento da universidade em seguir os procedimentos para pesquisas envolvendo animais (2018-013/CEUA).

Para coletar as amostras foi utilizado o covó, sendo uma armadilha usada para pescar peixes e caranguejos. A coleta foi feita todo mês desde o mês de março de 2018 no Rio Jirau Alto, no total foram 4 covos que permaneceram no rio por uma semana, sendo vistoriado todos os dias.

A semana escolhida para colocar o covó no rio é a semana de lua cheia, pois nessa fase a lua tem uma iluminação mais forte, assim os peixes ficam mais ativos, podendo subir para a superfície para se alimentar havendo maior chance de captura.

Os covos foram colocados dentro do rio em quatro pontos, os pontos escolhidos são lugares onde possuem rochas, pois a espécie alvo são indivíduos que se desenvolvem em rios com bastante rochas. Os covos têm que ficar totalmente cobertos pela água e paralelos a correnteza, para que os peixes consigam entrar com mais facilidade.

No covó é colocado isca (pão) para capturar os indivíduos. Os peixes coletados são da família Trichomycteridae, sendo que os indivíduos dessa família são difíceis de capturar, pois são pequenos e se camuflam no meio dos restos vegetais presentes na água que acabam entrando no covó. Após serem capturados através do covó, são submetidos a eutanásia segundo o protocolo aprovado pela CEUA e de acordo com as normativas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Os animais foram posteriormente congelados até a triagem.

Na triagem, as espécies são identificadas através da chave de identificação de *Cambeva* (BAUMGARTNER et al., 2012), em seguida, amostras de músculo foram fixados no álcool P.A e feito duplicatas, ficam guardados em freezer, a temperatura de aproximadamente -2°C. No total foram coletados 113 indivíduos.

2.3 Extração de DNA

Para extrair o DNA foi utilizado o kit Promega®. Esse kit de purificação do DNA genômico Wizard é dividido em quatro etapas. A primeira etapa consiste na lise das membranas de células e núcleos, a segunda etapa ocorre digestão do RNA, na terceira etapa remoção das proteínas e por último concentração do DNA



genômico (PROMEGA, 2009). O DNA genômico será obtido através do tecido muscular dos peixes, utilizando o protocolo descrito por (PROMEGA, 2009), ajustado para tecido fixado em etanol.

2.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A região do DNA nuclear onde o gene ITS e a região do DNA mitocondrial onde o gene D-loop estão presentes foi amplificado por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Para PCR foi utilizado o kit da Qiagen no qual para fazer o Mix utilizamos para um volume de 50 µl, 5 µl da 10x Top Taq (Buffer), 1 µl de dNTPs, 0,8 de primer específico para cada região, 0,25 µl de Top Taq DNA Polimerase, 30,65 µl de água miliQ para completar a reação e 10 do DNA extraído.

Os primers para a região ITS são SBR (5' GTAGGTGAACCTGCAGAAGG) e o JM5 (5' TACCGGCCTCACACCGTCC) e para região D-loop são utilizados os primers H8331 (5'-AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC-3') e L9236 (5'-GTTAGTGGTCAKGGGCTTGRTTC-3').

A mistura foi colocada nos tubos de 0,2 mL no termociclador e à amplificação do DNA foi feita através de desnaturação, anelamento e extensão do DNA, as quais ocorrem ao longo do ciclo. O termociclador foi programado para os seguintes ciclos: 94°C por 4 minutos, 94°C por 15 segundos, 51°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, 72°C por 10 minutos, o qual ocorreu durante 35 ciclos e ao final para ser conservado 4°C por 5 minutos.

2.5 Sequenciamento

Ao final, as amostras serão purificadas seguindo um protocolo de purificação com PEG e em seguida enviadas para o serviço de sequenciamento especializado.

2.6 Análise

As seqüências nucleotídicas obtidas serão editadas e alinhadas manualmente através do bloco de notas com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1. Para serem analisadas utilizaremos o programa MEGA 10. As diversidades intraespecíficas serão alcançadas pela média dentre todos os indivíduos da espécie estudada, comparada com os bancos de dados genéticos disponíveis para outras espécies de *Cambeva*.

As árvores filogenéticas serão construídas pelo algoritmo neighbor-joining (NJ) com suporte de 10.000 bootstrap. O padrão utilizado será o mesmo proposto por Hebert et al. (2003), ou seja, metodologia padronizada para análise de DNA barcoding, fundamentada no pressuposto de que o modelo evolutivo é satisfatório quando distâncias genéticas são baixas e o algoritmo é conveniente e rápido em análises de espécies em larga escala (NEI; KUMAR, 2000).

3 RESULTADOS

Na busca por resultados satisfatórios, diversas tentativas de padronização da PCR foram feitas com várias variáveis consideráveis, como por exemplo, primers e temperatura de anelamento. Após diversas tentativas as condições ideais para amplificação do material genético com os primers ITS -5' GTAGGTGAACCTGCAGAAGG 3' e o JM5 -5' TACCGGCCTCACACCGTCC 3' e para região D-loop



H8331 - 5'-AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC-3 e L9236 5'- GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC-3'
(Figura 1).

Figura 1- Resultado de PCR



Fonte: autoria própria (2021)

A figura 1 mostra a amplificação do DNA pela PCR, onde o gene ITS apresentou em torno de 400 a 500 pb enquanto o gene D-loop em torno de 900 a 1000 pb. Posteriormente, espera-se realizar a extração e PCR dos 113 indivíduos coletados, a fim diferenciar geneticamente as espécies do gênero *Cambeva* através de análises moleculares e de uma quantidade significativa de indivíduos a ponto de separar as espécies de *Cambeva* presentes no rio Jirau Alto e em rios da região de Cascavel, todos afluentes do rio Iguaçu.

4 CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos analisados, para obtermos conclusões mais significativas, é necessário realizar o sequenciamento das amostras, com o objetivo de identificar esses animais através do uso de marcadores moleculares e assim contribuir para a manutenção da vida nesses ambientes aquáticos, visto que é por meio dela que mantem-se ativa as interações entre os seres vivos.

Através da continuidade dessa pesquisa, também será possível analisar se a estrutura geomorfológica do ambiente em que esses indivíduos se encontram, contribuem para a diferenciação genética e o surgimento de uma alta taxa de endemismo evidenciada nesse estudo.



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a CNPq por financiar esse projeto bem como pela concessão da bolsa, a UTFPR por ceder o espaço e os equipamentos, a Fundação Araucária e ao laboratório de biologia molecular e a todos os envolvidos direta ou indiretamente que de alguma forma dedicaram seu tempo e sua atenção a esse projeto.

REFERÊNCIAS

- BAUMGARTNER, G. et al. Peixes do baixo rio Iguaçu. **Peixes do baixo rio Iguaçu**, 2012.
- BRASIL / (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). Portaria MMA n° 445, de 17 de dezembro de 2014. . 2015, p. 445.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Main aspects of the pollution in Brazilian rivers by pesticides. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296–1301, 2014.
- FREITAS, C. E. C.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 2, p. 39–45, 2009.
- IBGE. **Dois Vizinhos**.
- HEBERT, P. D. N. et al. biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.
- KATZ, A. M. et al. Multigene analysis of the catfish genus *Trichomycterus* and description of a new South American trichomycterine genus (Siluriformes, Trichomycteridae). **Zoosystematics and Evolution**, v. 94, n. 2, p. 557–566, 2018.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford, 2000.
- PEREIRA, R. S. Régis da Silva Pereira Instituto Federal Sul-Rio-Grandense (IFSUL) - Campus Pelotas. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 20–36, 2004.
- Prefeitura Municipal de Dois Vizinhos**.
- PROMEGA. Wizard® Genomic DNA Purification Kit. p. 21, 2009.
- SANDOVAL, R. C. D. S. **MARCADORES MOLECULARES COMO FERRAMENTAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE DÍPTEROS DE IMPORTÂNCIA FORENSE (CALLIPHORIDAE, MUSCIDAE)**. p. 1–69, 2011.
- TREBACH, R. H. et al. DNA Barcoding: Uma Ferramenta de Apoio Molecular para Identificação de Espécies de Peixes. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 2, p. 77–81, 2015.