

DNA BARCODING DE *Platanichthys platana* (REGAN, 1917) (CLUPEIFORMES, CLUPEIDAE) DE DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS BRASILEIRAS

Laura Ivana Ramos¹, Alessandra Barbosa da Silva², Carla Simone Pavanelli³, Alessandra Valéria de Oliveira⁴

¹Pós graduanda em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. Bolsista CAPES. lauraivramos@gmail.com

²Pós graduanda em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. Bolsista CNPq. alessandra.biouem@gmail.com

³Doutora, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia/Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais – PEA. Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. carlasp@nupelia.uem.br

⁴Orientadora. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia/Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais – PEA. Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. avoliveira@uem.br

RESUMO

Os primeiros registros atribuídos a *Platanichthys platana* na planície de inundação do alto rio Paraná foram em 2012, entretanto a diferença de porte entre os exemplares adultos dessa bacia comparada com as demais regiões onde a espécie ocorre, gerou a incerteza de que os indivíduos atribuídos a esta espécie fossem de fato pertencentes à *P. platana*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente as populações de *P. platana* da planície de inundação do alto rio Paraná e compará-las com populações de outras bacias hidrográficas brasileiras com o uso do marcador molecular *COI*. Além disso, as sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis em banco de dados, calculando os valores de distância genética. Os resultados obtidos até o momento indicam que os exemplares coletados na planície de inundação do alto rio Paraná pertencem, de fato, à espécie *P. platana*.

Palavra-chave: Alto Rio Paraná; *COI*; Distância genética; Marcador molecular.

1 INTRODUÇÃO

Os clupeídeos são peixes predominantemente marinhos em regiões tropicais e subtropicais com representatividade de espécies de sardinhas, arenques e manjubas. *Platanichthys platana* (Regan, 1917) é considerada a sardinha de menor tamanho da família Clupeidae ocorrente no Brasil. Diferentemente da grande maioria dos clupeídeos, essa espécie não reside em ambientes marinhos, visto que invadem as regiões costeiras, podendo viver em água doce e salobras encontradas em lagoas, estuários e partes inferiores de rios no sudeste da América do Sul, na Argentina, Brasil e Uruguai (WHITEHEAD, 1985; FIALHO *et al.*, 2000).

Em 2012, houve os primeiros registros atribuídos a *P. platana* na planície de inundação do alto rio Paraná. Esses registros inéditos, assim como a diferença no porte dos exemplares adultos, gerou uma suspeita se os exemplares atribuídos a esta espécie na planície de inundação do alto rio Paraná pertencem à *P. platana*. Uma alternativa de se resolver a questão da identificação de *P. platana* é a realização de estudos genéticos, envolvendo o DNA mitocondrial. O Citocromo c Oxidase subunidade I (*COI*), é considerado o marcador mitocondrial mais utilizado para se identificar e catalogar espécies, discriminar subespécies e estudar a evolução de inúmeros animais. O *COI* é considerado um código de barras de DNA (DNA barcode), o qual tem como objetivo auxiliar a filogenética e catalogação da biodiversidade. O código de barra baseado em sequências de *COI* é fácil de ser sequenciado para vários táxons usando um número pequeno de *primers*, além de possuir diferenciação suficiente entre espécies para apresentarem padrão de sequência “barcode” espécie-específicos (PEREIRA *et al.*, 2013).

Dada a importância da utilização de marcadores mitocondriais como ferramentas para compreender a distribuição da variação genética de populações, o presente estudo

teve por objetivo caracterizar geneticamente as populações de *P. platana* de diferentes bacias hidrográficas brasileiras por meio do uso do marcador mitocondrial *COI*, bem como comparar as sequências obtidas com as disponíveis em banco de dados, calculando os valores de distância genética e estabelecendo relações genéticas entre os espécimes analisados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nove exemplares identificados previamente como *P. platana* foram utilizados, sendo que três foram obtidos da Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), coletados na lagoa das Garças, planície de inundação do alto rio Paraná (Mato Grosso do Sul) e seis obtidos da Coleção Ictiológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo cinco de bacias litorâneas dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e um da bacia do rio Negro (Uruguai).

Para a extração do DNA das amostras de tecido muscular dos espécimes foi utilizado o kit de extração Promega Wizard® Genomics. A região mitocondrial do gene *COI* foi parcialmente amplificada utilizando o par de *primers* L6448 e H7152. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 1% e purificados seguindo o protocolo de Rosenthal *et al.* (1993). Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit Big Dye Terminator. O sequenciamento foi realizado na ACTGene Análises Moleculares Ltda, utilizando o sequenciador automático ABI-3500.

Na análise dos dados, as sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando os programas BioEdit e *software* MEGA 7, respectivamente. As sequências desse estudo foram comparadas com sequências do *Genbank* utilizando a ferramenta BLASTn. O algoritmo de alinhamento utilizado foi o ClustalW. O melhor modelo de substituição nucleotídica foi selecionado e a distância Kimura 2-parâmetros (K2P) entre as espécies analisadas foi calculada utilizando o MEGA 7. Sequências do *Genbank* de *P. platana* foram adicionadas às análises. A sequência KJ205205.1, referente à *Sprattus sprattus* foi utilizado como grupo externo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Sequências parciais do gene *COI*, de 555 pb, após edição e alinhamento, foram obtidas para as nove amostras de *P. platana*. Cada sequência foi analisada na ferramenta BLASTn e o percentual de identidade dos espécimes desse estudo variaram de 99,64% a 100% para *P. platana*. Foi realizado o cálculo da distância genética com o modelo Kimura 2-parâmetros entre os espécimes e os valores obtidos variaram de 0 a 0,4% (Tabela 01). A análise de sequências de *COI* de mais de mil espécies de peixes confirmou que pares de sequências com divergência inferiores a 2% entre si têm grandes chances de os indivíduos serem pertencentes a mesma espécie, e a chance de serem congêneros aumenta para 99% quando a distância é de menos de 1% (WARD *et al.*, 2009). Segundo a metodologia de Hebert e colaboradores (2003) e Rossini e colaboradores (2016), valores de distância superiores a 2% são considerados incompatíveis para indivíduos de uma mesma espécie.

Tabela 1: Matriz de distância genética, calculada a partir do modelo Kimura 2-parâmetros, utilizando o marcador *COI*, entre as amostras de *P. platana* e do grupo externo *S. sprattus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1 2
1. JN989134.1												
2. JX111823.1	0,0 02											
3. <i>P. platana</i> MS 001	0,0 02	0,0 00										
4. <i>P. platana</i> MS 002	0,0 02	0,0 00	0,0 00									
5. <i>P. platana</i> MS 026	0,0 02	0,0 00	0,0 00	0,0 00								
6. <i>P. platana</i> RS 006	0,0 04	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 02							
7. <i>P. platana</i> RS 015	0,0 04	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 00						
8. <i>P. platana</i> RS 016	0,0 04	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 00	0,0 00					
9. <i>P. platana</i> SC 007	0,0 04	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 04	0,0 04	0,0 04				
10. <i>P. platana</i> SC 021	0,0 04	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 04	0,0 04	0,0 04	0,0 00			
11. <i>P. platana</i> UY 018	0,0 04	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 02	0,0 04	0,0 04	0,0 04	0,0 04	0,0 04		
12. <i>Sprattus sprattus</i> (KJ205205.1)	0,2 15	0,2 12	0,2 12	0,2 12	0,2 12	0,2 09	0,2 09	0,2 09	0,2 09	0,2 09	0,2 15	

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, o marcador mitocondrial *COI* foi eficiente e possibilitou concluir que os espécimes analisados na planície de inundação do alto rio Paraná podem ser atribuídos a *P. platana*. Além disso, o sequenciamento de mais exemplares, de outras bacias hidrográficas, permitirá a análise de possíveis novas variações genéticas nas populações.

REFERÊNCIAS

FIALHO, C. B.; NUNES, D. M.; HARTZ, S. M. Biologia reprodutiva de *Platanichthys platana* (Regan, 1917) da Lagoa das Custódias, Tramandaí, RS, Brasil (Clupeiformes, Clupeidae). **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia**, v. 13, n. 2, p. 167-176, 2000.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Proceedings of the Royal Society of London**, v. 270, n. 1512, p. 313 - 321, 2003.

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

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

ROSSINI, B. C.; OLIVEIRA, C. A. M.; GONÇALVES DE MELO, F. A. Highlighting

Astyanax species diversity through DNA barcoding. **PLoS**, v. 11, n. 12, p. 1-20, 2016.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 2, p. 329 - 56, 2009.

WHITEHEAD, P. J. P. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeiodei). **FAO Species Catalogue**, v. 7, n. 125, part. 1, p. 303, 1985.