

## INTRODUÇÃO

A bacia do rio Tramandaí (fig.1) é composta por diversos rios e lagoas, estima-se que a mesma possua uma diversidade de aproximadamente 100 espécies de peixes de água doce conhecidas, este número representa cerca de um quarto da diversidade da ictiofauna do Rio Grande do Sul. A tarefa de catalogar grupos taxonômicos e grupos ecológicos é de grande urgência, como medidas para contrabalançar as taxas de extinção e homogeneização atuais que atualmente são em grande parte de origem antropogênica.

Estudos recentes têm proposto a metodologia de DNA *Barcode* como um sistema global, rápido, eficaz e padronizado de identificação de espécies. Essa técnica utiliza como marcador o sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), um fragmento de DNA de aproximadamente 650 pares de bases.

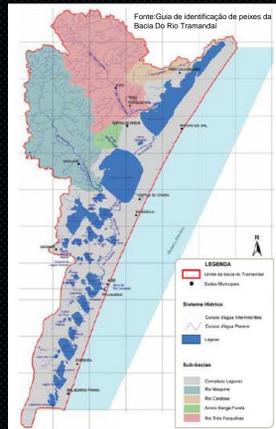


Fig.1 Bacia do Rio Tramandaí

## OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo obter sequências do gene COI para as espécies de peixes da bacia do rio Tramandaí auxiliando na delimitação e identificação das espécies da bacia e verificar a eficácia do método na identificação de possíveis novas espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta do material biológico

As coletas foram realizadas ao longo da Bacia do rio Tramandaí posteriormente os espécimes foram identificados e fixados em álcool 90% e armazenados em freezer -20 C.

### Procedimentos moleculares

As extrações de DNA total foram realizadas utilizando método CTAB modificado (Doyle e Doyle, 1987). A reações de PCR para amplificar a região COI utilizaram o coquetel de *primers forward* FishF25' TCGACTATCATAAAGATATCGGCAC3', V125' TCACCAACCACAA AGACATTGGCAC3' e *reverse* FishR2 5'ACTTCAGGCTGACCGAGATCAGAA3', FR15' CACCTCAGGGTGTCCG ARAAYCARAA3' seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial 94°C-3min, 35 ciclos de 94°C-30seg, 52°C-1min e 72°C-1min, finalizando com uma extensão final de 72°C-5min. O resultado das amplificações foram visualizadas em gel de agarose 1%. A purificação dos PCRs foram realizadas com as enzimas EXO-SAP e os sequenciamentos foram realizadas em sequenciador automático pela empresa ACTGene.

### Análise dos dados

As sequências foram visualizadas e editadas no programa BioEdit (Hall et AL 2007) e alinhadas no clustalW (THOMOPSON et AL 1994). O método de distancia Kimura 2P foi empregado para avaliar a distancia genética entre as sequencias analisadas e o método Neighbor-Joining foi utilizado para a construção de uma árvore de distancia entre os indivíduos analisados através do programa Mega 6.06 (Tamura et. Al 2013).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas sequências de DNA de 502 indivíduos de peixes que ocorrem na bacia do rio Tramandaí, correspondendo a 92 diferentes espécies. Na figura 2 encontramos a árvore obtida através de análise de Neighbor-Joining utilizando método de distancia K2P.

A distância K2P média encontrada entre indivíduos dentro das espécies do rio Tramandaí foi de 1,3 % e 20% entre todas as espécies da região. Cerca de 94% das espécies estudadas puderam ser devidamente discriminadas. Mesmo que muito bem definidas morfologicamente as espécies *Astyanax fasciatus*, *Astyanax eigenmaniorum* e *Astyanax procerus*, formaram o mesmo clado e não puderam ser definidas pelo *Barcode*, bem como todas as espécies do gênero *Odonthestes* e as espécies *Gymnogeophagus lacustris* e *Gymnogeophagus labiatus*. A espécie identificada morfologicamente como *Corydoras paleatus* apresentou dois grupos bem distintos, com uma distância genética de 0,062 entre esses grupos, indicando duas possíveis diferentes espécies. Isso também ocorreu para a espécie *Rhamdia quelen*, com uma distancia genética de 0,022 entre os peixes que ocorrem nos rios e os que ocorrem em lagoas. Outro fato que pode ser destacado é o possível sinal filogeográfico encontrado nas espécies que ocorrem apenas nos rios da encosta da Serra, das 21 espécies encontradas apenas nesses ambientes 11 apresentam uma pequena variação genética entre os dois rios amostrados.

## CONCLUSÃO

A abordagem *Barcode* mostrou-se parcialmente eficaz para a delimitação das espécies da bacia do rio Tramandaí, visto que cerca de 94% das espécies estudadas puderam ser devidamente discriminadas. Embora algumas espécies proximamente relacionadas filogeneticamente não tenham sido discriminadas, o DNA *Barcode* demonstrou ser uma ferramenta importante para o estudo da biodiversidade.

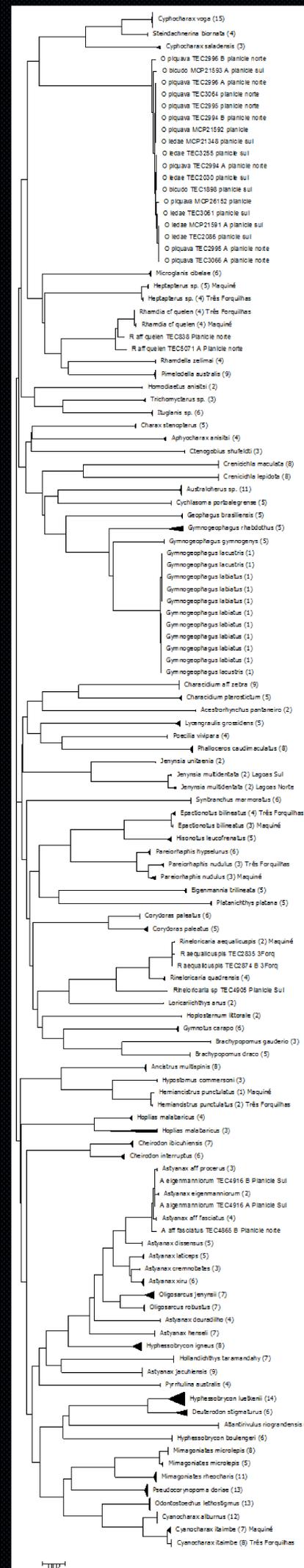


Fig.2 Árvore gerada no Mega 6.06 para as sequências analisadas.

## Referências bibliográficas :

- HALL, Tom A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series*. 1999, p. 95-98.
- MALABARBA, Luiz Roberto et al. Guia de identificação dos peixes da bacia do rio Tramandaí. *Porto Alegre: Via Sapiens*. [Links]. 2013.
- TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- THOMOPSON, J. D.; HIGGINS, Desmond G.; GIBSON, Toby J. *ClustalW. Nucleic Acids Res*. v. 22, p. 4673-4680, 1994.