

DNA *barcoding*: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes

TRESBACH, Rafael Hencke¹; PONTE, Letiane Nascimento da²; CERQUEIRA, Natalia Menezes²; RODRIGUES, Marília Danyelle Nunes^{3,4}

¹Graduação em Biotecnologia, UNIPAMPA; ²Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, UNIPAMPA; ³Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPEL; ⁴Genética Animal, UNIPAMPA.
tresbach@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A sistemática é uma área de estudo que nos permite identificar gêneros e espécies através da observação de características morfológicas e anatômicas, as quais são o resultado da manifestação dos genes – o fenótipo. Entretanto, há espécies diferentes que apresentam fenótipos semelhantes – devido à manifestação gênica que também depende da interação com o ambiente e que pode acarretar numa característica semelhante entre espécies diferentes, as quais podem possuir diferenças sutis ou não naqueles genes (MANCEAU, *et al.*, 2010).

O sistema de identificação molecular por *Barcode* genético foi proposto por Hebert *et al.* (2003). A técnica de DNA *barcoding* é uma ferramenta de apoio molecular à sistemática, baseando-se na sequência do gene COI localizado no DNA mitocondrial, sendo um sistema “bioidentificador”, semelhante aos códigos de barras universais (CARVALHO, *et al.*, 2008).

Alguns conceitos empíricos sobre o *Barcode* em trabalhos com invertebrados (HEBERT *et al.*, 2004), pássaros (HOGG E HEBERT, 2004) e peixes (WARD *et al.*, 2005), apresentam controvérsias na efetividade desse sistema de identificação genética (MORITZ E CICERO 2004). Segundo Hurst e Jiggins (2005), para que haja uma efetividade da técnica de *Barcode*, as sequências de DNA dentro de uma mesma espécie precisam apresentar maior similaridade do que entre espécies, e que em estudos recentes esta é a situação mais comum, mas que existem exceções. Em híbridos, por exemplo, isso pode gerar dúvidas taxonômicas, devido ao fato de que o mtDNA tem origem apenas materna (CARVALHO, *et al.*, 2008).

Devido a algumas dúvidas taxonômicas e outros problemas de identificação de espécies, a análise de genes ou seus produtos funcionais (RNAs, proteínas), são uma alternativa a se considerar para reforçar a identificação pela sistemática clássica.

Em peixes, a identificação é de extrema importância, tanto em ovos, alevinos, adultos e seus produtos, pois levam à detecção de fraude ou substituição de espécies em operações comerciais (SMITH *et al.*, 2008). Se identificados corretamente, permitem a assistência na sustentabilidade, no manejo da pesca a longo prazo (METCALF *et al.*, 2007) e ainda, auxilia a pesquisa, visando a conservação de espécies em risco (CARVALHO, *et al.*, 2008), além de solucionar algumas dúvidas taxonômicas como é o caso do gênero *Rhamdia*.

O presente trabalho tem por objetivo a busca de um método de apoio molecular para a sistemática clássica envolvida na identificação de peixes.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O presente trabalho foi desenvolvido através do levantamento de dados obtidos em artigos técnico-científicos publicados em periódicos da área, os quais foram pesquisados nas bases de dados Scielo e PubMed, através das palavras chaves: *molecular identification*, *barcode*, *molecular taxonomy* e *species identification*. Além disso, utilizou-se teses, as quais foram obtidas através do banco de dados Domínio Público, utilizando-se como palavra-chave *DNA barcode*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há diversas maneiras de se analisar a nível molecular, de forma a identificar as espécies dos organismos vivos em estudo, cada qual contendo seus prós e contras. Com o advento das tecnologias que permitem trabalhar com o DNA, como a PCR, novas portas foram abertas: a identificação de espécies pelo DNA ribossomal e após, pelo DNA mitocondrial.

O DNA mitocondrial apresenta como vantagem, o fato de ser haplóide e a transmissão ser materna (há ausência de recombinação gênica), o que o torna menos diferenciado entre indivíduos da mesma espécie. Além disso, tem estrutura circular dupla fita, sendo fechado, compacto e não apresenta macromutações – sua evolução é cerca de 10 vezes mais rápida que a de genes nucleares de cópia única. Esta taxa permite que haja uma maior chance de ser gerado marcadores espécie-específicos, o que torna este DNA excelente para a técnica de *DNA barcoding*.

Outra vantagem é a abundância de DNA mitocondrial, devido à presença dele em vários tecidos, necessitando de amostras pequenas ou até mesmo degradadas (KOSMANN, 2009). A partir desse DNA pode ser realizado o sequenciamento da região mitocondrial, o qual geralmente utiliza-se a região que codifica para a Citocromo C oxidase subunidade I (ZEHNER *et al.* 2004; WEELS *et al.*, 2007, WEELS e STEVENS, 2008), pois este gene apresenta algumas vantagens como iniciadores universais que são fortes, recuperáveis e também apresenta uma maior variação de sinal filogenético em relação aos outros genes. Além disso, ele é rodeado por sequências conservadas, o que permite isola-lo e estudá-lo através de iniciadores universais (KOSMANN, 2009). Apesar da regulação deste gene por outros, ele pode proporcionar uma visão mais profunda em relação as alternativas filogenéticas.

Para auxiliar melhor nas descobertas sobre o *DNA barcoding*, foi desenvolvido o *Barcode of Life Data Systems* (BOLD), uma ferramenta bioinformática aonde foi compilado os dados, suportando desde a coleta do espécime à validação da sequência deste como *barcode*. Esta comporta as sequências e analisa os dados obtidos, sendo também um veículo de colaboração entre diversos grupos de pesquisa do mundo, permitindo um fácil acesso a diversas informações, obtidas dos mais diversos laboratórios de pesquisa. Critérios como nome da espécie, dados da instituição que detêm o material testemunho, dados da coleta, sequência de COI com os iniciadores usados na PCR e eletroferogramas são necessários para que aquele espécime obtenha a classificação de *barcode* (KOSMANN, 2009).

Barreiras como baixa diversidade gênica de alguns grupos em suas sequências, espécimes que divergiram recentemente, detecção de híbridos e pseudogenes nucleares (Numts) devem ser vencidos para que a aplicação da

técnica obtenha alto sucesso. Para a identificação de anomalias nas sequências de *barcode* obtidas, além de sequências de baixa qualidade, o BOLD é uma ferramenta de extrema importância, pois todas as sequências ali inseridas são traduzidas para aminoácidos e comparadas com a proteína do COI, visando confirmar a origem. Feito isso, é buscado sequências de parada (*stop* códons – detecção de possíveis pseudogenes) e contaminantes (sequências de outros organismos). Na detecção destes, o pesquisador é contatado e a sequência fica marcada, necessitando de revisão para aumentar a confiabilidade desta (KOSMANN, 2009).

Segundo Ward, *et al.* (2005), trabalhando com peixes uma região de 655 pb do citocromo oxidase subunidade I, gene (COX1) da mitocôndria foi sequenciada, utilizando-se múltiplas amostras e com isto, gerou-se 754 sequências. Os autores concluem que o sequenciamento da região do gene COX1 pode ser utilizado como uma sequência de *Barcode*. No futuro, espera-se colaborações de forma a montar um banco de dados contendo sequências que permitam identificar uma gama maior de espécies de peixes, com colaborações globais. É salientado também o fato de que espécies distintas podem ter sequência de COX1 idêntica ou com alta semelhança, o que sugere uma possível fusão entre espécies. Casos desta natureza exigirão a união de profissionais da área molecular e taxonômica, visando identificar e resolver este problema (WARD, *et al.*, 2005).

Carvalho, *et al.*, 2008 utilizou a técnica de DNA *barcoding* para a identificação de Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). Os autores salientam que a utilização de marcadores de mtDNA para híbridos apresenta limitações, mas pode ser utilizada para indicação de pureza; sendo observado que surubins ditos puros na verdade eram híbridos e o uso do mtDNA serviu para indicar a origem materna dos peixes híbridos.

4 CONCLUSÃO

Até o momento, uma grande variedade de métodos vem sendo utilizada para a identificação de espécies de peixes. O *Barcode*, técnica universal de identificação genética de espécies, é uma delas e tem sido aplicada em todo o mundo, com pelo menos 8795 espécies analisadas (Fish-Bol - <http://www.fishbol.org/> acessado em julho de 2012).

A identificação a nível molecular através da técnica de código de barras de DNA se mostra uma excelente opção para confirmar a sistemática clássica, principalmente em espécies de difícil identificação por meio da observação de características morfológicas. Padronizar estas técnicas auxilia na confiabilidade, além da diminuição de custos.

5 REFERÊNCIAS

CARVALHO, D. C. de; SEERIG, A.; MELO, D. C. de; SOUSA, A. B. de; PIMENTA, D.; e OLIVEIRA, D. A. A. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). **Rev. Bras. De Reprod. Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 215-219, 2008.

HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; e HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **PNAS**, v. 41 n. 101, p. 14812-14812, 2004.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; e DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Lond.**, B (2003) 270, p. 313-321, 2003.

HOGG, I. D.; e HEBERT, P. D. N. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. **Can. J. Zool.** 82(5), p. 794-754, 2004.

HURST, G. D. D.; e JIGGINS, F. M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. **Proc. R. Soc. B** (2005) n. 272, p. 1525-1534, 2005.

KOSMANN, C. Código de barras (DNA barcode) de dípteros de interesse forense. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 18 de fevereiro de 2009.

MANCEAU, M.; DOMINGUES, V. S.; LINNEN, C. R.; ROSENBLUM, E. B.; e HOEKSTRA, H. E. Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. **Phil. Trans. R. Soc.**, B (2010) 365, p. 2439-2450, 2010.

METCALF, J. L.; PRITCHARD, V. L.; SILVESTRI, S. M.; JENKINS, J. B.; WOOD, J. S.; COWLEY, D. E.; EVANS, R. P.; SHIOZAWA, D. K.; e MARTIN, A. P. Across the great divide: genetic forensics reveals misidentification of endangered cutthroat trout populations. **Mol. Ecol.**, v. 16, n. 21, p. 4445-4454, 2007.

MORITZ, C.; e CICERO, C. DNA Barcoding Promise and Pitfalls. **PLoS Biol.** v. 2, n. 10, p. 1529-1531, 2004.

SMITH, P. J.; MCVEAGH, S. M.; e STEINKE, D. DNA barcoding for the identification of smoked fish products. **J. Fish Biol.** v. 72, n. 2, p. 464-471, 2008.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; BRONWYN, H. I.; LAST, P. R.; e HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil. Trans. R. Soc.**, B (2005) 360, p. 1847-1857, 2005.

WELLS, J. D.; WALL, R.; e STEVENS, J. R. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. **Int. J. Legal Med.** v. 121, n. 3, p. 229-233, 2007.

WEELS, J. D.; e STEVENS, J. R. Application of DNA-Based Methods in Forensic Entomology. **Annu. Rev. Entomol.** v. 53, p. 103-120, 2008.

ZEHNER, R.; AMENDT, J.; SCHÜTT, S.; SAUER, J.; KRETTEK, R.; e POVOLNÝ, D. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). **Int. J. Legal Med.** v. 118, n. 4, p. 245-247, 2004.