

Caracterização Molecular e Variabilidade Genética em Populações de *Hoplias* aff. *malabaricus* da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná

LUCIO¹, Léia C.; MANIGLIA¹, Thiago C.; PRIOLI^{1,2}, Alberto J.*; PRIOLI^{1,2}, Sônia M. A. P.; JÚLIO Jr^{1,2}, Horácio F.; PRIOLI^{1,3}, Laudénir M.

¹Nupélia – Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura; ²Depto. Biol. Celular e Genética; ³Depto. Biologia – Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brazil. *Autor para correspondência (Fone: (44) 261-4750 / Fax: (44) 263-1424; e-mail: ajprioli@nupelia.uem.br)

RESUMO

As traíras são peixes com ampla distribuição na América do Sul e América Central. Estão incluídas no gênero *Hoplias*, mas a taxonomia desse gênero é confusa e o que se considera como espécie *Hoplias* aff. *malabaricus* constituir-se-ia em um complexo de espécies diferentes. Vários citótipos foram caracterizados dentro do grupo *malabaricus*, indicando que algumas populações poderiam estar reprodutivamente isoladas. Neste trabalho foi proposta a análise do polimorfismo molecular, com as técnicas RAPD e SPAR para a identificação de marcadores moleculares associados com os citótipos e determinação de frequências de citótipos de traíras em diferentes ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná. Os três citótipos podem ser discriminados com tanto com marcadores moleculares RAPD quanto com SPAR. Os resultados mostram que os citótipos A, C e D constituem populações geneticamente isoladas e, possivelmente, espécies diferentes. O citótipo C é invasor e colonizou com sucesso a região, onde aparece com frequência superior a 90%. Aparentemente, o citótipo C é mais versátil que os citótipos A e D na adaptação e exploração de diferentes ambientes.

Palavras-chave: *Hoplias* aff. *malabaricus*, planície de inundação, RAPD, SPAR.

INTRODUÇÃO

As traíras, peixes pertencentes ao gênero *Hoplias*, são carnívoros, de comportamento sedentário e com ampla distribuição na América do Sul e América Central. Entre os especialistas não há consenso quanto à taxonomia dentro de *Hoplias*, com conflitos entre os autores quanto ao número de espécies (Bertollo *et al.*, 1997a, b; Bertollo *et al.*, 2000). Neste gênero são reconhecidas e bem definidas as diferenças entre os grupos *malabaricus* e *lacerdae* (Moreira, 1998). Cada um desses grupos poderia ser composto por espécies ainda não definidas. Assim, o que se considera como espécie *Hoplias* aff. *malabaricus* constituir-se-ia em um complexo de espécies, com pelo menos cinco citótipos diferentes. As divergências ao nível cromossômico são, às vezes, de tal magnitude que revelam, inclusive, a possibilidade de isolamento reprodutivo entre algumas populações conhecidas. Essas constatações talvez forcem, futuramente, uma revisão taxonômica do gênero *Hoplias* (Bertollo *et al.*, 1997a,b; Dergan *et al.*, 1998; Dergan e Bertollo, 1990). A emergência desses citótipos poderia resultar, pelo menos parcialmente, do hábito sedentário da espécie. Essa característica talvez induza a formação de populações locais ou subpopulações com pouca conexão por fluxo gênico, como decorrência de isolamento-por-distância. Portanto, seria de se esperar que populações de diferentes bacias hidrográficas divergissem geneticamente. Para verificar esta divergência podem ser utilizadas técnicas moleculares que detectam variações genômicas. Algumas técnicas moleculares não exigem conhecimento prévio de seqüências nucleotídicas do organismo estudado. Entre as

metodologias com estas características estão disponíveis o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) conforme Willians *et al.* (1990) e o SPAR (*Single Primers Amplifications Reactions*) apresentado por Gupta *et al.* (1994). Ambas as técnicas são baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Resultados anteriores comprovaram a eficiência destas metodologias. De acordo com Lucio (2001), os mesmos citótipos puderam ser identificados para *H. aff. malabaricus* e caracterizados por marcadores moleculares SPAR exclusivos. Portanto, o mapeamento e o monitoramento da distribuição dos citótipos, que de outra forma seriam difíceis e demorados, atualmente podem ser realizados rapidamente. Neste trabalho foi proposta a investigação da distribuição e das frequências dos citótipos de *H. aff. malabaricus* em diferentes ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná.

Os objetivos propostos para este trabalho foram identificar marcadores moleculares RAPD e SPAR citótipo-específicos e determinar as frequências de citótipos de *H. aff. malabaricus* na planície de inundação do alto rio Paraná.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 118 indivíduos em ambientes lótico, semi-lótico e lântico na planície de inundação do alto rio Paraná, que foram armazenados em etanol e mantidos em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram retiradas amostras de tecido muscular para a extração do DNA, que se baseou na metodologia fenol/clorofórmio. Em seguida, realizou-se a quantificação do DNA por comparação com o DNA do fago λ . Para a quantificação e análise da variabilidade genética, foram realizadas duas reações de RAPD-PCR, utilizando os *primers* OPW-19 e OPX-04, e duas reações de SPAR, utilizando-se os *primers* micro 11 e $(\text{GGAC})_3\text{T}$. As condições de amplificação do DNA foram apresentadas por Bardakci e Skibinski (1994). O RAPD-PCR, baseia-se na amplificação de segmentos de DNA genômico com *primers* curtos (10-11 bases) de seqüências nucleotídicas arbitrárias, que amplificam seqüências desconhecidas do DNA. Na técnica SPAR, o *primer* é construído por uma seqüência tetranucleotídica repetitiva, que amplifica regiões que se encontram entre dois blocos de microssatélite. Os segmentos de DNA amplificados de cada amostra foram fracionados em gel de agarose 1,4%, coradas com brometo de etídio, em campo elétrico de 70 V. As bandas produzidas por cada amostra foram fotografadas no transluminador e todos os indivíduos foram comparados entre si pelos padrões de bandas produzidas.

Os resultados da amplificação, via RAPD, com os *primers* selecionados mostraram que é possível separar os indivíduos estudados em três grupos distintos. Para determinar estes grupos, cada indivíduo foi analisado pela presença e ausência de bandas. Ou seja, os indivíduos que apresentam o mesmo perfil eletroforético, foram classificados como pertencentes ao mesmo grupo, e aqueles com padrões eletroforéticos diferentes, foram classificados em grupos diferentes, isto é, os grupos foram identificados por não compartilharem os alelos dominantes revelados por RAPD. O fato dos grupos encontrados não compartilharem quase todos os alelos amplificados sugere que há grande distância genética entre eles e que estariam reprodutivamente isolados e podendo abranger um complexo de espécies. Após tais observações e devido à necessidade de um estudo mais detalhado, utilizando padrões moleculares, via SPAR, foi possível detectar os mesmos três grupos de indivíduos no alto rio Paraná, correspondentes aos encontrados com marcadores RAPD, e denominados de A, C, D. Com relação aos estudos dos 3 citótipos presentes na planície de inundação do alto rio Paraná, 108 indivíduos foram associados ao citótipo C, seis corresponderam ao citótipo A e quatro ao citótipo D. Estes resultados revelam que os três citótipos coexistem em simpatria. Entretanto, inequivocamente, há predominância do citótipo C na região da planície. Deve ser notado, além disso, que no ambiente lótico foram capturados apenas indivíduos com o citótipo C. Também foi verificada a ocorrência do citótipo D apenas no ambiente lântico. A ampla distribuição do citótipo C pode ser decorrente de maior versatilidade e eficiência na exploração de ambientes diversos. Como mencionado, os resultados revelaram que o citótipo C é o mais freqüente na planície. No

entanto, esta constatação é intrigante, na medida em que este citótipo não ocorria na planície até o barramento do rio Paraná e formação do reservatório de Itaipu. Em 20 anos, o grupo C invadiu e colonizou com tanto sucesso que representa, atualmente, mais de 90% das capturas de *H. aff. malabaricus*. Se não houver estabilização nas populações, e a permanecer esta tendência, em poucas décadas os citótipos autóctones A e D estarão extintos na região.

CONCLUSÕES FINAIS

É possível identificar molecularmente os mesmos três citótipos tanto por marcadores RAPD quanto SPAR. Logo, os mesmos são eficientes em estudos de determinação de frequências de variantes que não podem ser facilmente diferenciadas morfológicamente. Os resultados mais recentes encontrados para os indivíduos da planície de inundação do alto rio Paraná permitem inferir que os citótipos A, C e D constituem populações geneticamente isoladas e, possivelmente, espécies diferentes. O citótipo C é invasor e colonizou com sucesso a planície de inundação do alto rio Paraná, com frequência superior a 90%, sendo portanto, aparentemente mais versátil que os citótipos A e D na exploração de diferentes ambientes. As populações de *Hoplias aff. malabaricus* deverão ser avaliadas e monitoradas periodicamente. Alterações nas frequências poderão indicar se há risco de extinção local dos citótipos que ocorrem na região. Além disso, como em estudos iniciais de cinho citogenético, foram detectadas a possível existência de cinco citótipos, embora, apenas três foram nitidamente identificados, talvez exista a possibilidade de outros grupos ocorrerem na região e que ainda não foram constatados.

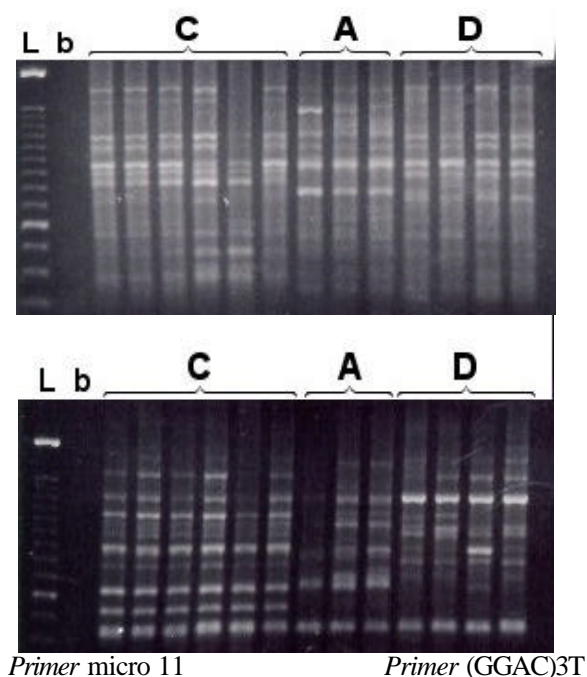


Figura 1 -Produtos da amplificação SPAR com os primers micro 11 e $(GGAC)_3T$ identificando os três citótipos e seus respectivos marcadores na espécie estudada. Em ambas as Figuras, a pista 1 corresponde ao Ladder 100 pb (L); a pista 2 corresponde ao controle negativo (b); as pistas de 2 a 8 correspondem ao citótipo C; as pistas de 9 a 11 correspondem ao citótipo A e as pistas de 12 a 15 ao citótipo D.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Nupélia e ao PEA pelo apoio e ao CNPq-PELD e CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. 1994. Application of the RAPD technique in Tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73: 117-123.
- BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; FONTES, M.S. 1997a. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Cytotypes with 2n=40 chromosomes. *Brazilian Journal of Genetics* 20: 237-342.
- BERTOLLO, L.A.C.; FONTES, M.S.; FENOCCHIO, A.S.; CANO, J. 1997 b. The X₁X₂Y Sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I, G-, C- and chromosome replication banding. (1997 b.) *Chrom. Res.* 5: 493-499.
- BERTOLLO, L.A.C.; BORN, G.G.; DERGAN, J.A.; FENOCCHIO, A.S.; MOREIRA-FILHO, O. 2000. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 8: 603-613.
- DERGAN, J.C.; BERTOLLO, L.A.C. 1990. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná Basins. *Brazilian Journal of Genetics* 13: 755-766.
- DERGAN, J.C.; SUZUKI, H.I.; SHIBATTA, O.A.; DUBOC, L.F.; JÚLIO JR., H.F.; GUILIANO CAETANO, L.; BLACK IV, W.C. 1998. Molecular biogeography of the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi, and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology* 21: 493-496.
- MORELLI, S. 1998. Citogenética Evolutiva em Espécies do Gênero *Hoplias*, grupo lacerdae. Macroestrutura Cariotípica, Heterocromatina e Regiões Organizadoras de Nucléolo. São Carlos: UFSCar. 76p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; IIVAK, J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.