

2.9 - Genética – seqüências nucleotídicas

Introdução

Com o fechamento da barragem e enchimento do reservatório de Itaipu, em 1982, os saltos de Sete Quedas ficaram submersos. Como consequência, um trecho de aproximadamente 150 km da província Parano-Platense foi incorporada a província do alto rio Paraná. Portanto, a ictiofauna atual da planície de inundação do alto rio Paraná é peculiar, porque durante os últimos 20 anos várias espécies da província Parano-Platense têm coexistido com a ictiofauna local. Levantamentos realizados nos últimos anos na planície de inundação do alto rio Paraná identificaram mais de 170 espécies de peixes. Destas espécies, pelo menos 35 foram introduzidas após o fechamento da barragem de Itaipu (Agostinho *et al.*, 2003; Júlio Jr. & Agostinho, 2003). Além disso, várias outras espécies de peixes, originárias de outras bacias brasileiras e de outros países, foram introduzidas com objetivo de estocagem e/ou repovoamento (Agostinho *et al.*, 2003).

Dentro da família Characidae o gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 constitui o maior e mais diversificado grupo (Britski *et al.*, 1988; Reis *et al.*, 2003), largamente distribuído pelo território das Américas do Sul e Central. No Brasil são conhecidos como “lambaris”. Cerca de uma centena de espécies e subespécies estão descritas no gênero *Astyanax*, mas muitos aspectos taxonômicos ainda são desconhecidos. Morfológicamente caracterizam-se por serem peixes de pequeno porte (aproximadamente 10 cm), apresentarem linha lateral completa, dentes pré-maxilares dispostos em duas fileiras e escamas cobrindo a base dos raios da nadadeira caudal. São peixes generalistas, incluindo na sua dieta pequenos peixes, vegetais delicados, insetos e larvas. A reprodução ocorre em todas as épocas do ano (Garutti e Britski, 2000).

Na província ictiofaunística do alto rio Paraná ocorrem várias espécies de *Astyanax*, incluindo uma popularmente conhecida como “tambuí” ou “lambari-de-rabo-amarelo”. Esta espécie, que era anteriormente identificada como *Astyanax bimaculatus*, teve sua taxonomia revisada por Garutti e Britski (2000) e foi descrita como a nova *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000. Atualmente tem sido admitido que *A. bimaculatus* não ocorre na província do alto rio Paraná e que *A. altiparanae* representa um exemplo do endemismo ictiofaunístico decorrente do isolamento dessa província desde sua formação (Garutti and Britski, 2000).

Astyanax altiparanae é parte da ictiofauna local da planície de inundação do alto rio Paraná e é endêmica da província do alto Paraná, não tendo sido encontrada na província Parano-Platense. Recentemente, características morfológicas e marcadores moleculares identificaram a espécie *A. altiparanae* no rio Iguaçu (Graça e Pavanelli, 2002; Prioli *et al.*, 2002). Marcadores RAPD e do DNA mitocondrial (mtDNA) demonstraram que a população de *A. altiparanae* do rio Iguaçu foi introduzida a partir da província do alto rio Paraná e sugeriram que esta introdução deve ter ocorrido recentemente (Prioli *et al.*, 2002). *A. altiparanae* é abundante e de alta importância na cadeia alimentar, mas ainda é pouco conhecida do ponto de vista genético-populacional.

Estudos prévios de citogenética em *Astyanax* revelaram uma alta variabilidade cariotípica inter e intraespecífica (Morelli *et al.*, 1983; Fernandes, 2002). Contudo, ainda existem poucas informações sobre diversidade genética, estrutura de populações e relações evolutivas entre as espécies compreendidas no gênero *Astyanax*. Além disso, não há evidências de monofilia para o gênero *Astyanax*, acreditando-se ser constituído por linhagens evolutivas independentes (Zanata, 1995; Weitzman e Malabarba, 1998).

Técnicas moleculares associadas com análises morfológicas têm sido aplicadas, com eficácia, à sistemática de peixes. Marcadores moleculares também têm sido amplamente utilizados para caracterizar a biodiversidade e a estrutura genética de populações de peixes.

Seqüências nucleotídicas mitocondriais são considerados marcadores moleculares importantes e têm sido intensamente utilizados em estudos evolutivos. Como marcador molecular, o mtDNA apresenta características convenientes, tais como herança predominantemente uniparental materna, taxa relativamente rápida de substituição de bases, pouca recombinação e fácil isolamento (Avisé, 2004; Avisé *et al.*, 1987). Além disso, o mtDNA mostrou-se um eficiente marcador para estudos de estrutura de populações, variação geográfica e caracterização de espécies (Avisé, 2004; Graves, 1998; Sivasundar *et al.*, 2001).

Estudos da variação genética inter e intraespecífica têm utilizado variações na seqüência de nucleotídeos da região controle do DNA mitocondrial como marcadores. A região controle é a maior região não codificadora do mtDNA e também a mais variável do genoma mitocondrial dos metazoários, incluindo os peixes. É caracterizado pelo *displacement loop* (*D-loop*), que corresponde à região de origem de replicação e da transcrição da fita H do mtDNA (Meyer, 1994). A taxa de evolução da região controle é de duas a cinco vezes mais alta do que a dos genes que codificam proteínas mitocondriais, acumulando mutações principalmente na extremidade 5'. Coseqüentemente, a região controle tem sido a principal seqüência do mtDNA utilizada em estudos da variação genética intraespecífica e para a avaliação do parentesco entre espécies muito próximas, incluindo espécie de peixes (Meyer, 1994; Faber e Stepien, 1997; Sivasundar *et al.*, 2001; Prioli *et al.*, 2002).

Neste trabalho, seqüências nucleotídicas da região controle do mtDNA foram utilizadas para analisar a diversidade genética entre populações de *A. altiparanae* de diversas localidades da província do alto rio Paraná e de uma população

de *A. asuncionensis* da sub-bacia do rio Paraguai. Com as informações obtidas pretende-se contribuir para melhor caracterizar a espécie *A. altiparanae* e verificar a possibilidade de *A. asuncionensis* ter se estabelecido no alto rio Paraná.

Materiais e métodos

Exemplares de *Astyanax altiparanae* foram coletados em cinco localidades da província do alto rio Paraná, acima da região dos antigos saltos de Sete Quedas. No rio Paraná, foram realizadas coletas em Guaíra (GU), no reservatório de Itaipu e em Porto Rico (PR), na planície de inundação do alto rio Paraná. Na província do alto rio Paraná, também foram coletados indivíduos no reservatório de Barra Bonita (BB) no rio Tietê e na represa municipal de Monte Aprazível (MA), ambos locais no estado de São Paulo. Foi selecionado um ponto de coleta em Entre Rios (ER), no segmento do rio correspondente ao médio rio Paraná e que foi incorporado ao alto rio Paraná, após a formação do reservatório de Itaipu. Espécimes de *A. asuncionensis* foram coletados no rio Manso e no rio Cuiabá (CB), na sub-bacia do rio Paraguai. Os pontos de coleta estão indicados no Anexo B, item 2.9, Figura 1.

Reservatório de Itaipu

O reservatório de Itaipu corresponde ao segmento do médio rio Paraná, na fronteira Brasil-Paraguai, que passou a ter continuidade com o alto rio Paraná depois da formação do lago. Está localizado, entre os paralelos 24° 05' e 25° 33' de latitude Sul e entre os meridianos 54° 00' e 54° 37' de longitude Oeste. Esse trecho situa-se entre a foz do rio Piquiri e a do rio Iguazu no estado do Paraná, respectivamente nos municípios de Guaíra e de Foz do Iguazu.

No reservatório de Itaipu foram coletados e analisados cinco exemplares de *A. altiparanae* no município de Entre Rios do Oeste (PR). Também foram coletados e analisados cinco indivíduos no reservatório de Itaipu na altura do município de Guaíra, no estado do Paraná.

Planície inundação do alto rio Paraná

O Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura – Nupélia – da Universidade Estadual de Maringá possui uma base avançada no município de Porto Rico (PR) (22° 47' 37" Sul e 53° 19' 03" Oeste). Esta área localiza-se imediatamente a jusante da barragem de Porto Primavera, cerca de 200 km a montante do remanso do reservatório de Itaipu, e pertence ao terço inferior do alto rio Paraná. Do lado do Estado do Mato Grosso do Sul, encontra-se a planície de inundação do alto rio Paraná, constituída por intensa rede de canais secundários, o rio Baía e os cursos inferiores de rios marginais e várzeas. As coletas foram realizadas na base do Nupélia e na praia da Ilha da Bandeira, no município de Porto Rico, estado do Paraná. No total, foram amostrados e analisados 20 exemplares de *A. altiparanae* nesta área de coleta.

Reservatório de Barra Bonita

No reservatório de Barra Bonita foram coletados e analisados sete espécimes de *A. altiparanae*. Barra Bonita é um dos reservatórios mais antigos do rio Tietê, com início de sua construção em meados de 1962. Está situado a 20° 31' Sul e 48° 32' Oeste. Na altura do reservatório de Barra Bonita, o rio Tietê faz a divisa entre os municípios Barra Bonita e Igarapú (SP).

Água Limpa

Foram coletados e analisados 15 espécimes de *A. altiparanae* na represa municipal de Monte Aprazível, estado de São Paulo, no rio Água Limpa. O município situa-se a latitude 20° 46' 21" Sul e longitude 49° 42' 51" Oeste. O rio Água Limpa é afluente do rio São José dos Dourados, que por sua vez é tributário do rio Paraná no reservatório de Ilha Solteira. Atualmente, o rio São José dos Dourados está ligado ao rio Tietê pelo canal Pereira Barreto.

Rio Manso e Rio Cuiabá

Cinco exemplares de *A. asuncionensis* foram coletados no rio Manso e no rio Cuiabá, nas proximidades da APM Manso de Furnas Centrais Elétricas S/A. APM Manso está localizada no rio Manso, na chapada dos Guimarães, no estado de Mato Grosso.

Os espécimes coletados foram imediatamente colocados em frascos com álcool comercial. O álcool foi trocado pelo menos duas vezes, em intervalos de 24 horas. Depois de transferidos para o Laboratório de Genética – Nupélia, os frascos contendo os espécimes foram armazenados a -20°C. Os experimentos para as análises moleculares foram executados no Laboratório de Genética do Nupélia –UEM.

Para extração do DNA genômico foram utilizadas fragmentos de tecido muscular (aproximadamente 100 mg) foram macerados em nitrogênio líquido em *graal* de porcelana. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão PS (Tris–HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e sacarose 5%) e 500 µL de tampão TH (Tris–HCL 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, sacarose 5%, espermina 0,15 mM e espermidina 0,15 mM) pH 8,0 e 5 µL de proteinase K (20 µg/µL) e o macerado foi incubado em banho-maria com agitação lenta (aprox. 60 rpm) a 37°C, durante 1 hora. O DNA foi então extraído duas vezes e purificado em um volume equivalente de fenol/clorofórmio (1:1, v:v), lavado com clorofórmio e centrifugado a 12.000 rpm por 12 min. A seguir, o DNA foi precipitado com a adição de solução salina (NaCl 5 mM) e etanol absoluto gelado, seguido de uma incubação a -20°C por 12 a 24 horas. O pellet obtido foi ressuspenso em 50

μL de tampão TE (0,1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,01 mM EDTA), com RNase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A suspensão de DNA foi estocada a -20°C . Alíquotas dessas amostras foram utilizadas para uma estimativa visual da quantidade de DNA em comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago λ em gel de agarose (0,8%) e corado com brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$).

Foi feita a amplificação de fragmentos específicos do genoma mitocondrial via PCR com amostras de DNA de peixes *Astyanax* de cada população. A metodologia de amplificação dos fragmentos de mtDNA foi baseada em Prioli *et al.* (2002). Segmento de aproximadamente 760 pb, contendo parte da região *D-loop*, os genes *tRNA^{Thr}*, *tRNA^{Pro}* e *cyt b*, foram amplificados, via PCR, com o DNA de 44 indivíduos. Para cada indivíduo foram realizadas duas reações independentes de PCR, como réplicas.

Os *primers* utilizados foram o H16498 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Meyer *et al.*, 1990) e L15774M 5'-CAACATGAATTGGAGGTATACCAGT-3' (Prioli *et al.*, 2002). A mistura do PCR consistiu de Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl_2 , 2,5 μM de cada primer, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U *Taq*-DNA polimerase, 15 ng de DNA e água deionizada e filtrada em equipamento Milli-Q para completar o volume para 25 μL . O DNA foi desnaturado por aquecimento da mistura de reação a uma temperatura de 94°C por 4 minutos e a amplificação ocorreu em 40 ciclos a 94°C por 15 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, seguido de uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, alíquotas de cada mistura da reação com o fragmento do DNA amplificado foi quantificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) e comparado com quantidades conhecidas de DNA do marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Invitrogen) (Anexo B, item 2.9, Figura 2).

O produto final obtido de cada reação de PCR foi utilizado diretamente como amostra para o seqüenciamento em seqüenciador automático ABI-3100 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) na ESALQ-USP. As seqüências foram amplificadas com o kit BigDyeTM terminator v. 3.0 (Perkin Elmer Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Um total de 50 ng de cada amostra de DNA e 20 pmoles de cada *primer* foi adicionado na reação de seqüenciamento. Imediatamente após a elevação da temperatura da mistura da reação para 94°C por 4 min, as amplificações do fragmento de *D-loop* mitocondrial foram realizadas em 35 ciclos de 30 s a 94°C , 30 segundos a 55°C , 1 min e 30 s a 60°C , seguidos de 5 min a 60°C . Os dados do seqüenciamento foram coletados pelo programa de análise do seqüenciamento (Perkin Elmer) e submetidos a um teste de qualidade pelo software Vector NTI Suite 6.0 (Informax, Inc.). A seqüência de nucleotídeos de cada peixe foi confirmada nas duas fitas de DNA das duas amostras de PCR obtidas independentemente. Os fragmentos de DNA amplificados de diferentes amostras foram alinhados e regiões com e sem homologia foram avaliadas para a identificação de sítios polimórficos.

Seqüências de DNA de 383 a 418 pb, amplificadas do segmento hipervariável da região controle do DNA mitocondrial (Acesso *GenBank* números AY395494 a AY395513), foram usada em análises de relações genéticas. Essa região parcial do *D-loop* foi seqüenciada em quarenta e cinco exemplares de *A. altiparanae* e cinco exemplares de *A. asuncionensis*. Seqüências correspondentes de populações do Keller (Ke), Pirapó (Pi), e Iguazu (Ig) (Acessos *GenBank* AY125820 a AY125843) foram incluídos nas análises (Prioli *et al.*, 2002).

Sítios com deleção não foram incluídos nas análises, seguindo o consenso de que o significado evolutivo das deleções em seqüências do DNA não é bem conhecido (Nei e Kumar, 2000). Análises genéticas foram realizadas com o programa MEGA 2.1 para obtenção da matriz de distâncias genéticas de Tamura e Nei com distribuição *gamma*. Os coeficientes *gamma* foram estimados utilizando-se o programa PAUP* 4.0. Foram incluídos nas análises todos os exemplares da planície de inundação, do reservatório de Itaipu (Guaíra e Entre Rios), do reservatório de Barra Bonita, da bacia São José dos Dourados (Água Limpa) e de Cuiabá/Manso. As seqüências dos rios Keller, Pirapó e Iguazu, disponíveis no *GenBank*, foram utilizadas sem a repetição de haplótipos. Dendrogramas *neighbor-joining*, com e sem a população de *A. asuncionensis* de Cuiabá/Manso, foram construídos com base em matriz de distâncias Tamura e Nei. Gráficos de dispersão em coordenadas principais também foram construídos com e sem a população de *A. asuncionensis*. Antes da construção dos gráficos, as matrizes de distâncias de Tamura e Nei foram corrigidas como proposto por Lingoes (Legendre e Anderson, 1999).