

2.9. Diversidade em seqüências D-loop do DNA mitocondrial de peixes

Alberto José Prioli
 Sônia Maria Alves Pinto Prioli
 Laudenir Maria Prioli
 Thatiana Vanessa Soria
 Vivian Amanda de Carlos
 Horácio Ferreira Júlio Jr.
 Carla Simone Pavanelli
 Renata de Souza Panarari
 Paula Silveira Perieto
 Thaís S. Bignotto
 Thiago Cintra Maniglia
 Talge Aiex Boni

Introdução

Na planície do alto rio Paraná ocorrem várias espécies de *Astyanax*, incluindo um grupo popularmente conhecido como “tambuí” ou “lambari-de-rabo-amarelo”. Entretanto, são complexas as questões relacionadas à taxonomia deste gênero. Por exemplo, uma espécie do alto rio Paraná, anteriormente identificada como *Astyanax bimaculatus*, teve sua taxonomia revisada por Garutti e Britski (2000) e redescrita como *Astyanax altiparanae*. Esta espécie representa um exemplo do endemismo ictiofaunístico, decorrente do isolamento, pelos saltos de Sete Quedas, dessa província desde sua formação (Garutti and Britski, 2000). Além disso, a espécie do médio Paraná e bacia do rio Paraguai conhecida como *A. bimaculatus* passou ser identificada como *A. asuncionensis*.

Atualmente, supõe-se que *A. asuncionensis* não ocorre na planície do alto rio Paraná. Mesmo que, de fato, que a barreira geográfica de Sete Quedas tenha sido eficiente para impedir que *A. asuncionensis* colonizasse o alto rio Paraná, a construção do reservatório de Itaipu alterou o cenário. A submersão de Sete Quedas, com a incorporação de um segmento de 150 km do médio Paraná à província do alto rio Paraná, criou condições para o estabelecimento de pelo menos 35 espécies do médio Paraná no terço inferior do alto rio Paraná (Agostinho *et al.*, 1993; 2003; Agostinho e Júlio Jr, 1999; Oliveira *et al.*, 2002).

Portanto, é alta a probabilidade de *A. asuncionensis* também ter se estabelecido no alto rio Paraná. Apesar da intensidade com que são realizados estudos da sua ictiofauna, pelo Nupélia-UEM e outras instituições, *A. asuncionensis* ainda não foi identificado no alto rio Paraná. Por outro lado, a grande semelhança morfológica entre *A. altiparanae* e *A. asuncionensis* pode ter dificultado sua discriminação nas amostras estudadas e, conseqüentemente, seu registro na região.

Técnicas moleculares associadas com análises morfológicas têm sido aplicadas, com eficácia, à sistemática de peixes e à filogeografia. Marcadores moleculares também estão sendo amplamente utilizados para caracterizar a biodiversidade e a estrutura genética de populações de peixes. Entre os marcadores moleculares, seqüências do mtDNA têm se mostrado uma poderosa metodologia para estudos da variação genética intra e interespecífica (Avice, 2004).

Neste trabalho, seqüências nucleotídicas da região controle, ou D-loop (*displacement loop*) do mtDNA foram utilizadas para analisar a diversidade genética entre populações de *Astyanax*, com perfil morfológico de *A. altiparanae*, de diversas localidades do alto rio Paraná e de uma população de *A. asuncionensis* da sub-bacia do alto rio Paraguai. Este trabalho pretende contribuir para melhor caracterizar a espécie *A. altiparanae* e detectar evidências para verificação da hipótese do estabelecimento de *A. asuncionensis* no alto rio Paraná.

Material e Métodos

Amostragem

Exemplares identificados como *Astyanax altiparanae*, com base em características tradicionais (Garutti e Britski, 2000) 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 na planície de inundação do alto rio Paraná, região de Porto Rico (PR), em Guaíra (GU) e Entre Rios do Oeste (ER), no estado do Paraná e correspondente ao lado brasileiro do reservatório de Itaipu. Na bacia do rio Paranapanema foram realizadas coletas no rio Pirapó (PI), em Maringá, estado do Paraná, e na bacia do rio Ivai foram coletados exemplares no rio Keller (KE), no município de Marialva, Paraná. Foram coletados indivíduos no reservatório de Barra Bonita (BB) no rio Tietê e na represa municipal de Monte Aprazível (MA), no rio Água Limpa (bacia do rio São José dos Dourados), ambos locais no estado de São Paulo. Os indivíduos coletados no rio Iguaçu (IG) também foram identificados como *A. altiparanae*, de acordo com Prioli *et al.* (2002) e Graça e Pavanelli (2002). Espécimes identificados como *A. asuncionensis*, conforme Lima *et al.* (2003), foram coletados no rio Cuiabá e rio Manso (CM), na sub-bacia do rio Paraguai. Os pontos de coleta estão indicados na Figura 1.

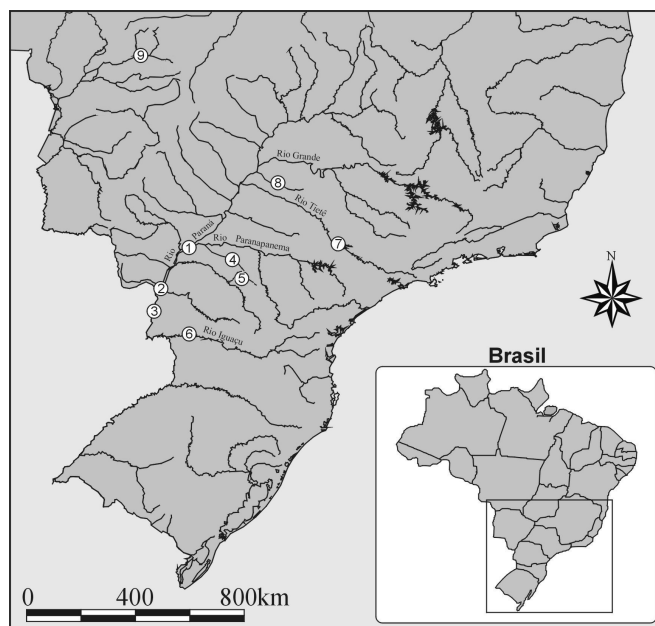


Figura 1. Pontos de coleta de *A. altiparanae* e *A. asuncionensis*. Os números correspondem aos pontos de coleta: (1) Planície de inundação do alto rio Paraná (região de Porto Rico-PR); (2) Itaipu – município de Guaíra-PR; (3) Itaipu – município de Entre Rios do Oeste-PR; (4) rio Pirapó (região de Maringá-PR); (5) rio Keller (Marialva-PR); (6) rio Iguaçu (IG); (7) reservatório de Barra Bonita-SP (rio Tietê); (8) rio Água Limpa (região de Monte Aprazível-SP) e (9) Sub-bacia do rio Paraguai-MT (rio Manso e rio Cuiabá).

Extração de DNA Total

Os espécimes coletados foram imediatamente colocados em frascos com álcool comercial. Os procedimentos para as análises moleculares foram executados no Laboratório de Genética Geral do DBC–UEM e no Laboratório de Genética do Nupélia –UEM. Para extração do DNA genômico foram utilizadas amostras de tecido muscular. A extração de DNA foi realizada de acordo com Monesi *et al.* (1998). O DNA na suspensão foi quantificado e, em seguida, estocado a -20°C .

PCR e seqüenciamento de DNA mitocondrial

Um segmento de DNA mitocondrial, que compreende a parte hipervariável da região *D-loop*, a extremidade do gene *cyt b* e os genes dos RNA transportadores da Polina (*tRNA^{Pro}*) e da treonina (*tRNA^{Thr}*), foi utilizado para a análise genética. Foram estudados 45 indivíduos identificados como *A. altiparanae* e cinco indivíduos identificados como *A. asuncionensis*. A amplificação, via PCR, foi realizado com os *primers* H16498 (Meyer *et al.*, 1990) e L15774M (Prioli *et al.*, 2002). A metodologia de amplificação dos fragmentos de mtDNA foi baseada em Prioli *et al.* (2002). O produto final obtido de cada reação de PCR foi utilizado diretamente como amostra para o seqüenciamento em seqüenciador automático ABI-3100.

Análise de dados

As seqüências de DNA foram alinhadas com o programa CLUSTAL W e as análises genéticas foram realizadas com MEGA 3.1 e PAUP 4.0. Distâncias genéticas de Tamura e Nei para as regiões *D-loop*, com distribuição gama, foram utilizadas para agrupamento *neighbor-joining*. Análises de *bootstrap* foram baseadas em 1.000 reamostragens. Em complementação ao agrupamento, a matriz de distância de Tamura e Nei foi utilizada para obtenção do gráfico de dispersão em coordenadas principais. 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 com a correção proposta por Lingoes (Legendre e Anderson, 1999).

Resultados e discussão

A seqüência da extremidade dos genes *cyt b*, *tRNA^{Pro}* e *tRNA^{Thr}* não apresentaram polimorfismos significativos e foram descartados das análises. A seqüência hipervariável da região controle do mtDNA analisada consistiu de aproximadamente 382 pb em 19 indivíduos identificados como *A. altiparanae* e os cinco indivíduos identificados como *A. asuncionensis*. Os outros 26 espécimes analisados foram identificados como *A. altiparanae* e possuíam cerca de 417 pb na seqüência *D-loop*. Foram identificados 42 haplótipos da região controle entre os 45 indivíduos *A. altiparanae* estudados (Figura 2).

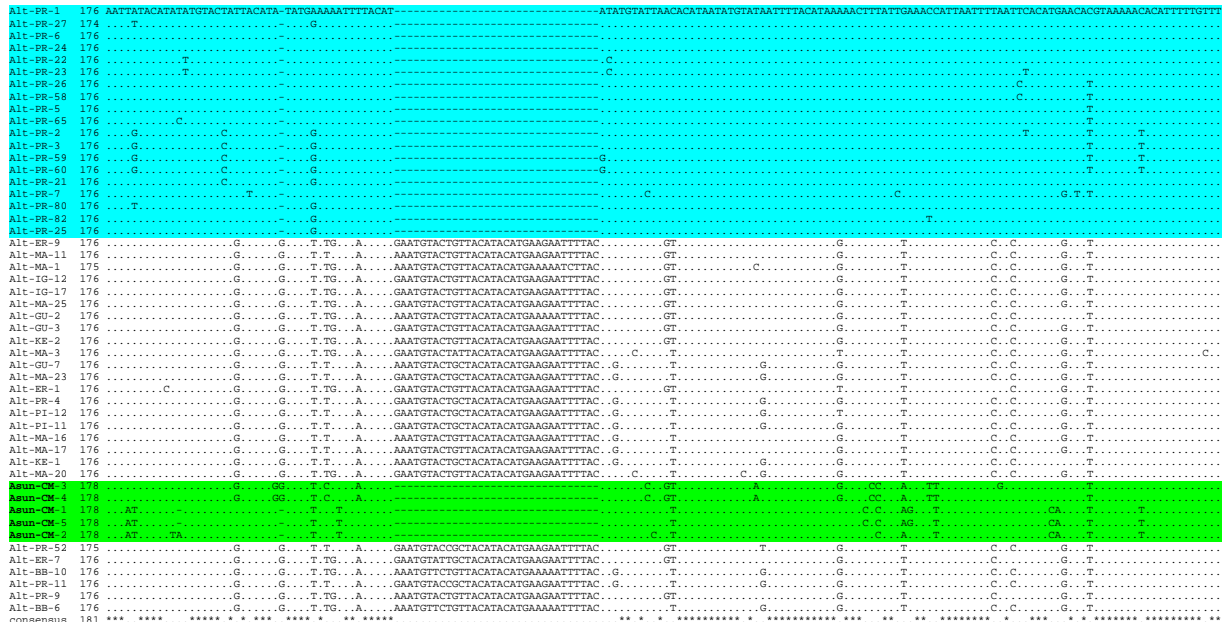


Figura 2. Multialinhamento ClustalW das seqüências nucleotídicas da região *D-loop* do DNA mitocondrial de indivíduos identificados como *Astyanax altiparanae* (Alt) da bacia do alto rio Paraná e rio Iguazu e de *A. asuncionensis* (Asun) foram coletados nos rios Manso e Cuiabá, da sub-bacia do rio Paraguai. As seqüências destacadas em colorido possuem uma deleção de 32 pb entre as posições 225 e 257

Entre os indivíduos supostamente *A. altiparanae* os haplótipos estão claramente distribuídos em dois grupos, caracterizados pela presença ou ausência de uma deleção de 32 pb correspondendo ao trecho entre as posições 225 e 257 (Figura 2). Os dois grupos de haplótipos ainda diferem pelo polimorfismo em outros 24 sítios nucleotídicos. Dentro de cada grupo há alta similaridade entre os variantes haplotípicos.

O grupo de haplótipos com a deleção de 32 pb foi registrado apenas na planície de inundação, onde foi predominante. Na planície de inundação os dois tipos ocorrem em simpatria, mas haplótipo sem deleção foi encontrado em apenas quatro espécimes (Figura 2). Em todas as outras amostras do alto rio Paraná e do Rio Iguaçu foram encontrados somente haplótipos sem a deleção de 32 pb.

A análise das seqüências *D-loop* dos indivíduos da espécie *A. asuncionensis* mostrou cinco haplótipos, que formam dois grupos. Dentro de cada grupo há poucos sítios polimórficos, mas foram encontrados 53 sítios polimórficos entre eles (Figura 2).

Todos os haplótipos de *A. asuncionensis* compartilham a deleção de 32 pb na região controle dos indivíduos identificados como *A. altiparanae*, encontrados na planície de inundação do alto rio Paraná. Por outro lado, cada grupo de haplótipos de *A. asuncionensis* difere em cerca de 30 sítios nucleotídeos em relação a cada um dos grupos de haplótipos, com e sem deleção, encontrados na planície de inundação do alto rio Paraná (Figura 2).

Como pode ser constatado nas Figuras 3 e 4, tanto o agrupamento quanto a dispersão em coordenadas principais separou os indivíduos identificados como *A. altiparanae* em dois grupos. Os indivíduos *A. asuncionensis* também foram separados em dois grupos. No dendrograma, os braços curtos e os baixos valores de *bootstrap* revelam alta similaridade entre os haplótipos dentro de cada grupo.

No dendrograma (Figura 3), em um dos grupos encontram-se os 26 indivíduos analisados que não apresentam a deleção de 32 pb na seqüência *D-loop*. Esse grupo é composto por uma mistura de quatro haplótipos da planície de inundação do alto rio Paraná e todos os haplótipos do Iguaçu, Keller, Pirapó, Entre Rios, Guaira, Barra Bonita e Água Limpa. O outro grupo de haplótipos incluiu somente os 19 indivíduos da planície de inundação do alto rio Paraná que apresentam a deleção de 32 pb. Os dois grupos de haplótipos de *A. asuncionensis* posiciaram-se separadamente em relação aos grupos do alto rio Paraná e rio Iguaçu.

É possível verificar no gráfico em coordenadas principais (Figura 4) a separação dos grupos de haplótipos. Aqui fica mais clara a aproximação dos haplótipos de *A. asuncionensis* com os haplótipos com deleção de 32 pb associado a *A. altiparanae*. Note-se que em relação ao primeiro eixo, um grupo de haplótipos de *A. asuncionensis* ocupa a mesma posição de ordenação do grupo da planície de inundação com deleção de 32 pb.

Deve ser ressaltado que a distância de Tamura e Nei é calculada apenas com o polimorfismo de substituição nucleotídica, sem considerar deleções. Embora a deleção de 32 pb possa ser considerada um indicativo de semelhança entre a população dos rios Manso e Cuiabá e a população da planície de inundação, essa característica não foi utilizada nas análises. Portanto, a similaridade de *A. asuncionensis* com a subpopulação da planície não está limitada à deleção de 32 pb, mas se estende a outros sítios nucleotídicos.

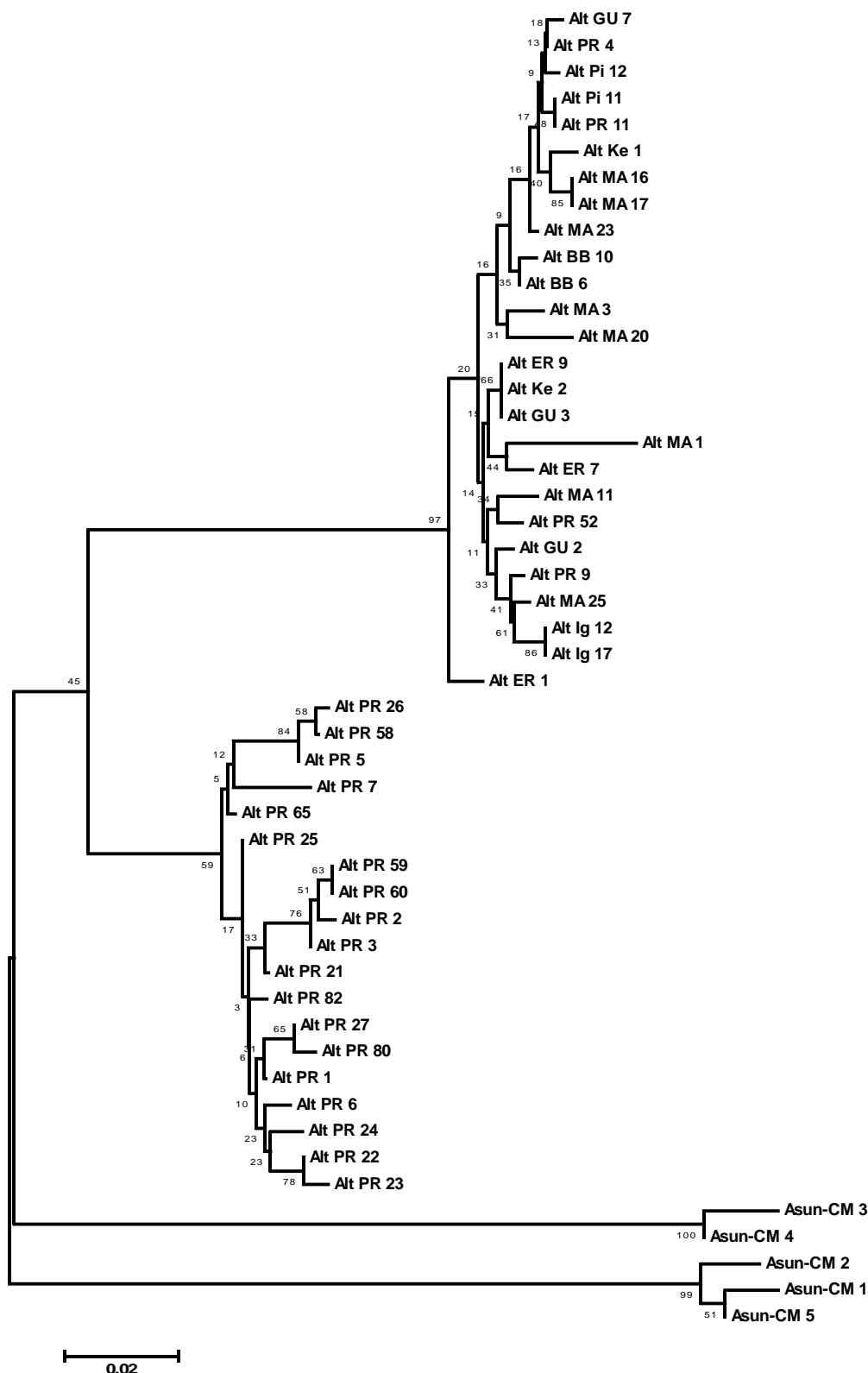


Figura 3. Dendrograma *neighbor-joining* das seqüências da região *D-loop* mitocondrial de indivíduos identificados como *Astyanax altiparanae* (Alt) da bacia do alto rio Paraná e rio Iguazu e de *A. asuncionensis* (Asun) foram coletados nos rios Manso e Cuiabá, da sub-bacia do rio Paraguai. A distância genética de Tamura-Nei foi calculada com distribuição gamma ($\alpha = 0,27$) e o número de cada nó indica a probabilidade *bootstrap* baseada em 10.000 reamostragens.

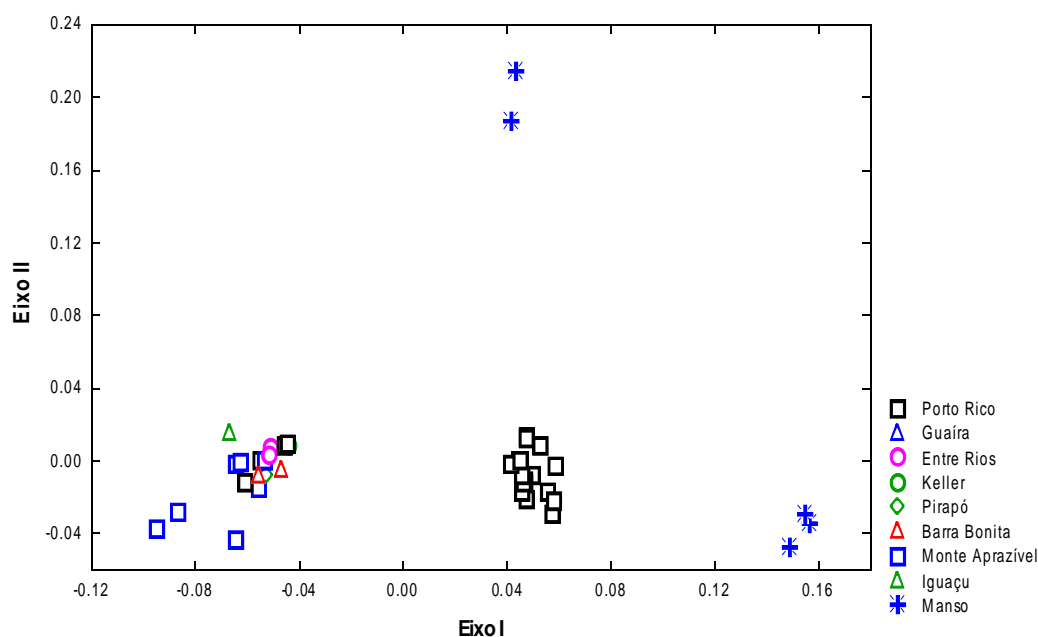


Figura 4. Gráfico de dispersão de coordenadas principais dos exemplares identificados como *Astyanax altiparanae* (Alt) da bacia do alto rio Paraná e rio Iguaçu e de *A. asuncionensis* (Asun) foram coletados nos rios Manso e Cuiabá, da sub-bacia do rio Paraguai. A matriz de distâncias de Tamura-Nei, com distribuição gamma ($\alpha = 0,27$), obtida da seqüência do *D-loop* foi corrigida com o método de Lingoes.

Discussão

O polimorfismo acentuado da região *D-loop*, representado principalmente pela deleção de 32 pb, não se mostrou correlacionado com os caracteres morfológicos analisados. Os indivíduos da planície com e sem deleção não puderam ser discriminados morfometricamente. Conseqüentemente, apesar da elevada divergência entre os haplótipos, a variação encontrada poderia ser considerada como um padrão de diversidade intraespecífico.

Os resultados obtidos aqui sugerem que o grupo de haplótipos com a deleção de 32 pb não está muito disseminado para fora da planície de inundação. De fato, não é uma variante muito comum, tanto que no reservatório de Itaipu (Entre Rios e Guaíra), região próxima da planície, nenhum exemplar desse haplótipo foi encontrado. A presença de haplótipos com a deleção na planície pode ter pelo menos duas explicações plausíveis. Esse seria um polimorfismo intraespecífico, originado de duas populações ancestrais, que se diferenciaram em decorrência de isolamento geográfico, mas atualmente coexistem na planície. Em contraste, a diversidade constatada poderia estar indicando a existência de uma espécie ainda não diagnosticada na planície de inundação do alto rio Paraná.

Essa espécie hipotética pode ser relacionada com *A. altiparanae*, mas não é reconhecida com base na avaliação de marcadores morfológicos. O grupo de haplótipos exclusivo da planície de inundação pode representar esta espécie desconhecida. Poderia ser uma espécie recentemente introduzida na planície de inundação e ainda não estar dispersa em tributários próximos ou distantes do rio Paraná.

A introdução de espécies de peixes do médio rio Paraná, do trecho abaixo dos saltos de Sete Quedas, na planície de inundação do alto rio Paraná tem sido extensivamente reportadas (Agostinho *et al.*, 1993; Agostinho e Julio Jr, 1999; Oliveira *et al.*, 2002). Portanto, se o grupo de haplótipos prevalente for de uma espécie introduzida na planície de inundação, é mais provável que a introdução tenha ocorrido durante o alagamento dos saltos de Sete Quedas, depois da construção do reservatório de Itaipu há pouco mais de 20 anos.

De acordo com Garutti e Britski (2000), *A. altiparanae* não era encontrado no médio rio Paraná, mas ocorriam outras espécies similares, tais como o *A. abramis* (Jenyns, 1842), *A. asuncionensis* Géry, 1972, e *A. paraguayensis* (Fowler, 1918) (Garutti, 1995). Destas três espécies, *A. asuncionensis* é a que se assemelha com *A. altiparanae*. Comparações preliminares morfométricas entre *A. asuncionensis* e os exemplares com e sem deleção da planície de inundação, baseadas em características tradicionais morfológicas, não apresentaram resultados conclusivos. Considerando-se que *A. altiparanae* também era identificado como *A. bimaculatus* (Garutti e Britski, 2000), pode-se prever dificuldades acentuadas na discriminação das duas espécies, com sobreposição das características utilizadas na identificação.

Diante da dificuldade de discriminação das espécies existe a possibilidade de *A. asuncionensis* ter se estabelecido na planície do alto rio Paraná e, por enquanto, não ter sido identificado com base em caracteres morfológicos. De acordo com essa interpretação, o grupo de haplótipos com deleção encontrado na planície representaria uma população de um variante molecular de *A. asuncionensis*. Isto é possível, pois os dois grupos de haplótipos de *A. asuncionensis* amostrados possuem a deleção de 32 pb, mas são diversificados. Esses resultados sugerem que na sub-bacia do rio Paraguai e no médio rio Paraná a espécie *A. asuncionensis* poderia estar representada por grupos de haplótipos bastante diferenciados. Como o número de indivíduos da bacia do rio Paraguai foi restrito, há chance dos haplótipos atualmente existentes na planície existirem abaixo de Itaipu e não terem sido amostrados para as análises moleculares no presente estudo. Portanto, os resultados não permitem excluir a hipótese de que *A. asuncionensis* se estabeleceu no alto rio Paraná depois do alagamento do reservatório de Itaipu. Ao contrário, fortalecem essa hipótese.

Estudos adicionais com marcadores moleculares e morfológicos devem ser conduzidos para esclarecer as questões aqui levantadas. O ponto crítico será determinar se o grupo de haplótipos com a deleção de 32 pb surgiu como evento independente dentro da espécie *A. altiparanae* ou se está relacionado com a espécie *A. asuncionensis*. Coletas em diversos pontos da província Parano-Platense e da sub-bacia do rio Paraguai poderiam oferecer novos indicativos para a hipótese do estabelecimento de *A. asuncionensis* no alto rio Paraná. Por outro lado, evidências para a origem dentro de *A. altiparanae* poderiam ser obtidas com coletas de amostras amplas em diversos pontos da província do alto rio Paraná, principalmente em pontos inacessíveis a um possível invasor, isolados por cachoeiras ou barragens sem eclusas ou escadas de peixes, por exemplo.

Finalmente, restará a questão da alta frequência e a aparente exclusividade dos haplótipos com a deleção 32 pb na planície de inundação do alto rio Paraná. Aparentemente, a resposta menos complexa estaria relacionada com uma espécie invasora que ainda não se dispersou no alto rio Paraná e seus tributários.