

Capítulo 12

Variabilidade Nucleotídica Mitocondrial de *Hoplias* aff. *malabaricus* da Planície de Inundação do Alto rio Paraná

Introdução

As duas espécies do gênero *Hoplias* formalmente descritas, *H. lacerdae* e *H. malabaricus*, podem ser facilmente discriminadas. Entretanto, existem evidências citogenéticas (Dergam & Bertollo, 1990; Bertolo *et al.*, 2000), genéticas (Prioli *et al.*, 2004) e morfológicas (Graça e Pavanelli, 2007), entre outros, que dão sustentação à hipótese de que *H. malabaricus* representa um complexo de espécies.

Na planície de inundação do alto rio Paraná os citótipos A, C e D de *H. aff. malabaricus* foram detectados ocorrendo em simpatria (Pazza e Júlio Jr, 2003). A presença do citótipo C na planície foi uma novidade. Possivelmente, antes da formação do reservatório de Itaipu, o citótipo C ocupava apenas o médio Paraná, pois não há registros anteriores de sua ocorrência no alto rio Paraná. Com a formação do reservatório e submersão de Sete Quedas, em 1982, o citótipo C poderia ter atingido o alto rio Paraná.

A identificação de grupos diferenciados dentro do complexo *H. aff. malabaricus* pode ser efetuada com marcadores moleculares baseados em DNA. Em uma etapa anterior, citótipos os grupos de *H. aff. malabaricus* da planície de inundação do alto rio Paraná foram associados a marcadores moleculares ISSR (Prioli *et al.*, 2004). Agora estão sendo apresentados resultados de identificação de grupos dentro de *H. aff. malabaricus* da planície de inundação, utilizando seqüências nucleotídicas da região *D-loop* do DNA mitocondrial.

Materiais e Métodos

As coletas de exemplares de *H. aff. malabaricus* foram realizadas em diversos pontos das bacias do alto rio Paraná e no rio Manso, na bacia do rio Paraguai. Na bacia do alto rio Paraná, foram efetuadas coletas no rio Baía (RB), Lagoa dos Patos (LP), Lagoa das Garças (LG), Lagoa Fechada (LF), Canal do Cortado (CC) e Ressaco do Pau Veio (PV). Além desses locais, foi realizada coleta no Canal de Migração (CM) no reservatório de Itaipu.

Após a coleta, amostras de tecido muscular foram fixadas em álcool etílico comercial. Para a extração e quantificação do DNA total, foi utilizada a metodologia adaptada por Prioli *et al.* (2002). Os marcadores ISSR foram obtidos por PCR, sob as condições propostas por Albert *et al.* (1999), com pequenas modificações. Foram selecionados os *primers* (GGGAC)₃T, (CCAC)₃C, (GGAC)₃A, (GGAC)₄, (AACC)₄, (AAGC)₄.

Uma seqüência parcial do gene mitocondrial foi amplificada, via PCR, a partir de amostras do DNA total. Foram utilizados os *primers* L D-Loop e H D-loop para amplificar a extremidade hipervariável da região *D-loop* do DNA mitocondrial. O produto da PCR foi seqüenciado. A amplificação e o seqüenciamento foram realizados de acordo com as condições apresentadas por Prioli *et al.* (2002).

Com as seqüências nucleotídicas *D-loop* foi obtida uma matriz de distância de Tamura e Nei e construído um dendrograma com o algoritmo *neighbor-joining*. Os valores de *bootstrap* foram baseados em 10.000 reamostragens.

Resultados e Discussão

A técnica ISSR permitiu a detecção de bandas espécie-específicas que diferenciaram três grupos bem determinados de traíras, identificados como citótipo A, C e D (Figura 1). Contudo, alguns dos exemplares da Lagoa das Garças não apresentaram perfil eletroforético que permitisse o seu agrupamento em algum dos três citótipos.

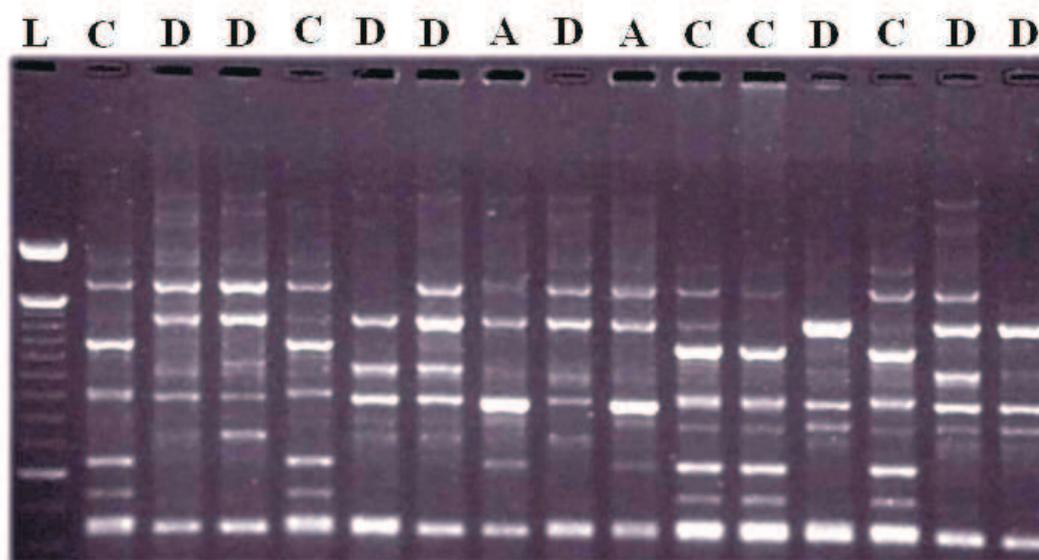


Figura 1: Perfis eletroforéticos dos citótipos A, C e D, caracterizados pelo *primer* (GGAC)₃T. Coluna L - Padrão molecular (Ladder 100 pb, Invitrogen).

Em etapa anterior, conforme apresentado por Prioli *et al.* (2004), os marcadores ISSR agruparam os indivíduos analisados em três, associados aos citótipos A, C e D. Nenhuma divergência foi detectada que pudesse indicar a existência de um quarto grupo. Por si só, a dificuldade em associar alguns indivíduos da Lagoa das Garças aos citótipos já conhecidos sugere a ocorrência, na planície de inundação, de um grupo do complexo *malabaricus* ainda não identificado.

A matriz de distância de Tamura e Nei, obtida com as seqüências *D-loop*, foi utilizada para construir o dendrograma *neighbor-joining* mostrado na Figura 2. Os altos valores de *bootstrap* demonstram a diferenciação genética entre os haplogrupos identificados. Ficaram bem definidos os grupos associados aos citótipos A, C e D, que formaram três haplogrupos distintos.

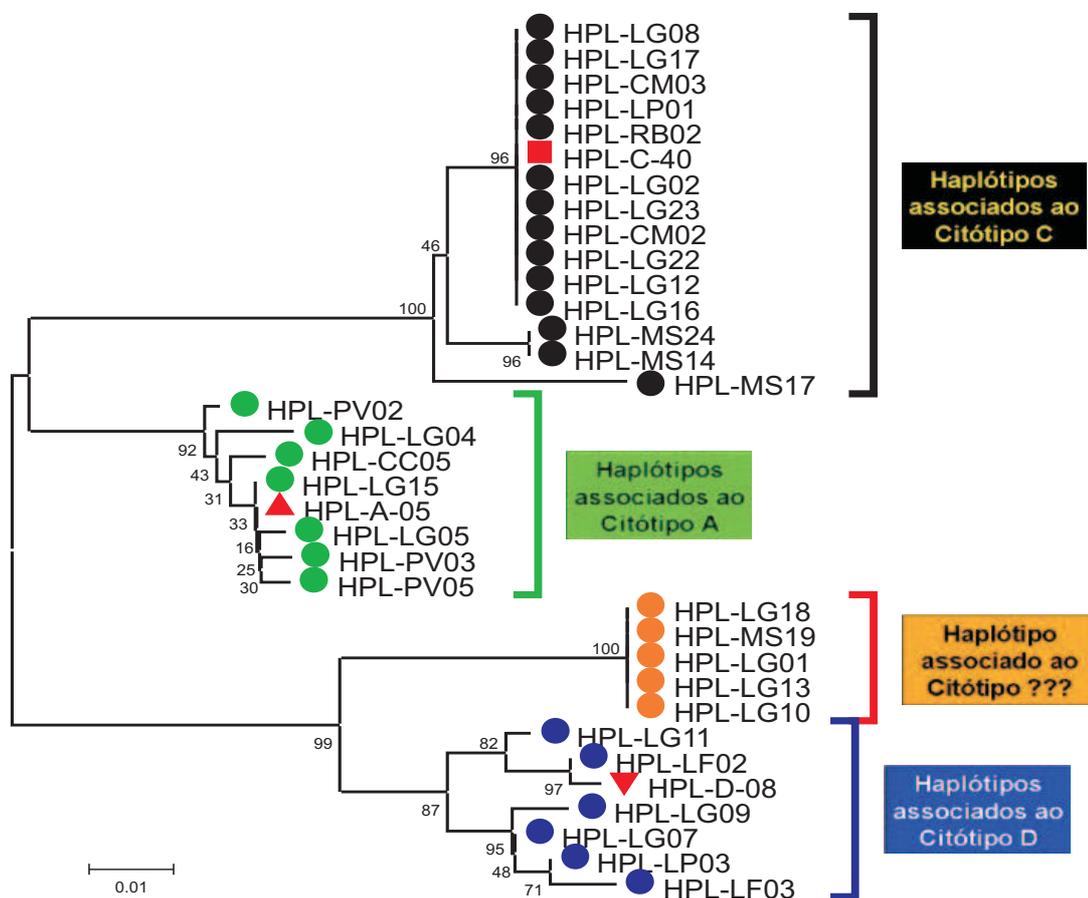


Figura 2: Dendrograma *neighbor-joining*, obtido com a matriz de distância de Tamura and Nei, a partir da seqüência *D-loop* de *Hoplias aff. malabaricus* da planície de inundação do alto rio Paraná.

Alguns indivíduos da Lagoa das Garças e um indivíduo do rio Manso formaram um haplogrupo separado. Correspondem aos mesmos indivíduos que na análise com marcadores ISSR não se enquadraram nos grupos determinados na etapa anterior para a planície de inundação, de acordo com Prioli *et al.* (2004).

O novo grupo *malabaricus* identificado está próximo do grupo identificado como citótipo D. É possível que a análise cariotípica desse grupo venha a revelar um citótipo ainda não caracterizado.

Certamente, os dados são escassos e há necessidade de ampliação da amostragem. Mas, deve ser notado que o haplótipo encontrado na Lagoa das Garças também foi encontrado em um indivíduo da bacia do rio Manso. Portanto, se esse haplótipo não estiver disseminado na bacia do alto rio Paraná, seria plausível supor que sua presença na planície é uma decorrência da formação do reservatório de Itaipu.

A respeito de *Hoplias* aff. *malabaricus* há um consenso de que os citótipos correspondem a espécies ainda não descritas. Com as seqüências nucleotídicas *D-loop* são identificados haplótipos inequivocamente associados aos citótipos. Por conseqüência, os haplogrupos poderiam também representar espécies não descritas. Assim, embora haja necessidade de análises complementares, foram encontradas evidências da ocorrência de variantes genéticas *H. aff. malabaricus* até então desconhecidas. Esta variação pode ser interpretada como indicativo da presença, na planície de inundação, de uma espécie do grupo *malabaricus* ainda não registrada na região.

Referências

- Albert, J.S, Fernandes-Matioli, F.M.C. & Almeida-Toledo, L.F. New species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from Southeastern Brazil: towards the deconstruction of *Gymnotus carapo*. *Copeia* 2: 410-421. 1999.
- Bertollo, L. A. C.; Born, G. G.; Dergam, J. A.; Fenocchio, A. S. and Moreira-Filho, O. A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research* 8: 603-613. 2000.
- Dergam, J.A; Bertollo, L.A.C. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of São Francisco and Alto Paraná Basis. *Brazilian Journal of Genetics* 13: 755-766. 1990.
- Graça, W.J.; Pavanelli, C.S. *Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes*. Maringá: EDUEM, 2007, 241 p.
- Pazza, R. ; Júlio Jr, H.F. Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná river floodplain (Brazil). *Cytologia*. 68: 159-163. 2003.
- Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J.; Júlio Jr, H.F.; Pavanelli, C.S.; Oliveira, A.V.; Carrer, H.; Carraro, D.M.; Prioli, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25: 421-430. 2002.
- Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.P.; Maniglia, T.C.; Lucio, L.C.; Júlio Jr, H.F.; Pazza, R ; Carrer, H.; Prioli, L.M. Molecular Markers and Genetic Variability of *Hoplias* aff. *malabaricus* Populations from the Upper Paraná River Floodplain. In: Agostinho, A.A.; Rodrigues, L.; Gomes, L.C.. (Org.). *The Upper Parana River Floodplain: Structure and Process*. Maringá: EDUEM, 2004, p. 122-126.
- Vicari, M.R.; Pazza, R ; Artoni, R.F.; Margarido, V.P.; Bertollo, L.A.C. Cytogenetics and biogeography: a critical analysis in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49: 297-303. 2006.

