

DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA MITOCONDRIAL ENTRE AS POPULAÇÕES DE *ZUNGARO* (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) DAS BACIAS DO RIO PARANÁ E DO RIO TOCANTINS

Alberto José Prioli (Coordenador)

Sônia Maria Alves Pinto Prioli

Laudenir Maria Prioli

Horácio Ferreira Júlio Júnior

Carla Simone Pavanelli

Leia Carolina Lúcio

Rodrigo de Mello

Sílvia Aparecida Machado

Talge Aiex Boni

Thaís Souto Bignotto

Thiago Cintra Maniglia

Vivian Nunes Gomes

RESUMO

Peixes do gênero *Zungaro* são conhecidos como jaú e são apreciados na alimentação humana e na pesca esportiva. É um dos maiores peixes migradores do Brasil, podendo atingir até 150 Kg. Estão distribuídos nas bacias do Paraná-Paraguai e Amazônica e há um conflito taxonômico em relação às populações dessas duas bacias. Nas últimas décadas o jaú tem enfrentado um severo declínio populacional na bacia do alto rio Paraná. Neste trabalho foram caracterizadas molecularmente as populações de *Zungaro* das bacias do Paraná-Paraguai e do rio Tocantins. A análise de sequências mitocondriais *D-loop* oferece suporte para a interpretação de que as populações das bacias do Paraná-Paraguai e Amazônica são de espécies diferentes. Os resultados representam forte evidência em favor de alguns autores que sugerem que o jaú do Paraná-Paraguai deve ser identificado como *Zungaro jahu* e que na amazônia ocorre a espécie *Zungaro zungaro*.

INTRODUÇÃO

A ordem Siluriformes inclui 37 famílias de bagres amplamente distribuídos em águas doces (Sullivan *et al.*, 2006). A família Pimelodidae inclui o gênero *Zungaro*, antigamente identificado como *Paulicea*. São peixes de couro, podendo chegar a 144 cm e 150 Kg (Agostinho *et al.*, 2003). São piscívoros, de hábito migratório e preferem águas profundas de ambientes lóticos. Popularmente são conhecidos como jaú e apreciados na alimentação humana e na pesca esportiva.

O jaú ocorre nas bacias do rio Paraná-Paraguai e Amazônica. Entretanto, as populações dessas duas bacias foram caracterizadas morfologicamente como duas espécies diferentes. Até o início da década de 90, o jaú era identificado como *Paulicea luetkeni*, mas Silfvergrip (1992) reconheceu que o gênero *Pauliceia* é sinônimo júnior de *Zungaro*. De acordo com Lundberg e Littmann (2003) a espécie *Zungaro jahu* (Ihering, 1898) é encontrada na bacia do rio Paraná-Paraguai. Segundo os mesmos autores, na bacia do rio Amazonas e Orinoco ocorre a espécie *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821). Por outro lado, em revisão feita por Graça e Pavanelli (2007) foi adotada a interpretação de que todas as populações de “jaú” são da espécie *Zungaro zungaro*, em conformidade com Silfvergrip (1992) e Silvano *et al.* (2001).

O jaú ainda não se encontra nas categorias criticamente em perigo, ou em perigo, mas corre o risco de extinção a médio prazo, em função do declínio populacional e da fragmentação da sua área de ocupação. Segundo Alves (2006), o jaú pode ser considerado localmente extinto em vários trechos das bacias dos rios Grande e Paranaíba devido às cascatas de reservatórios nesses rios. Informações sobre a produção da pesca profissional no reservatório de Itaipu revelam a diminuição da pesca de jaú desde o início da década de 90 (Okada *et al.*, 2005). Além disso, informações sobre a biologia da espécie são escassas (Agostinho *et al.*, 2003).

Várias regiões do DNA mitocondrial são utilizadas para estudos populacionais e filogenéticos. Por acumular mutações rapidamente, a região controle (*D-loop*) está entre as mais utilizadas para avaliações de espécies próximas (Awise, 2004; Oliveira *et al.*, 2006; Perdices e Doadrio, 2001; Panarari-Antunes *et al.*, 2008; Prioli *et al.*, 2002).

Nesse trabalho, as populações de jaú das bacias do Paraná-Paraguai e Tocantins foram caracterizadas molecularmente. As informações podem auxiliar na resolução de problemas taxonômicos e contribuir para o conhecimento, hoje praticamente inexistente, da diversidade genética das populações naturais do gênero *Zungaro*.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de peixes identificados como *Zungaro* foram realizadas nas bacias do Paraná-Paraguai e na bacia Amazônica, como mostrado na Figura 1. Na bacia do alto rio Paraná as coletas ocorreram na região de Porto Rico (PR) e na bacia do rio Paraguai as coletas foram no rio Manso. Na bacia amazônica, os exemplares de *Zungaro* foram capturados no rio Tocantins. Imediatamente após a coleta, de cada indivíduo foi retirada uma amostra de tecido muscular, que foi fixada em álcool etílico comercial, e armazenada a -20°C .

Para a extração do DNA total das amostras foi utilizada a metodologia baseada em fenol/clorofórmio (Monesi et al., 1998), com pequenas modificações. A quantificação e avaliação da qualidade do DNA foi realizada em gel de agarose, por comparação com quantidades conhecidas de DNA λ .

Os fragmentos de DNA mitocondrial foram amplificados via PCR, a partir de amostras de DNA total, de acordo com Prioli *et al.* (2002). Foi amplificado uma sequência nucleotídica parcial da região *D-loop*, correspondente à região hipervariável 5' da fita pesada. O produto final de cada reação de PCR foi utilizado diretamente para sequenciamento em plataforma MegaBace (Amersham), seguindo instruções do fabricante. As sequências nucleotídicas, sob o formato de cromatograma, foram editadas manualmente com o programa BioEdit e alinhadas utilizando-se o CLUSTAL W.

Além das sequências de *Zungaro* obtidas neste trabalho, foram utilizadas sequências de espécies dos gêneros *Pseudobagrus* e *Hypostomus* da ordem Siluriformes disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html), como mostrado na Tabela 1. Para garantir maior confiabilidade nas análises, as sequências foram alinhadas e só aproximadamente os primeiros 355 pb da extremidade 5' da fita pesada foram considerados. Ainda, apenas as sequências disponibilizadas que faziam parte de artigos já publicados em periódicos indexados na base Thompson-ISI (www.webofscience.com) foram selecionadas para as comparações. Todos os nomes científicos das espécies do *GenBank* foram pesquisados na base de dados www.fishbase.org para evitar comparações entre espécies sinônimas. Essas espécies foram utilizadas como grupo externo e referência para distâncias interespecíficas.

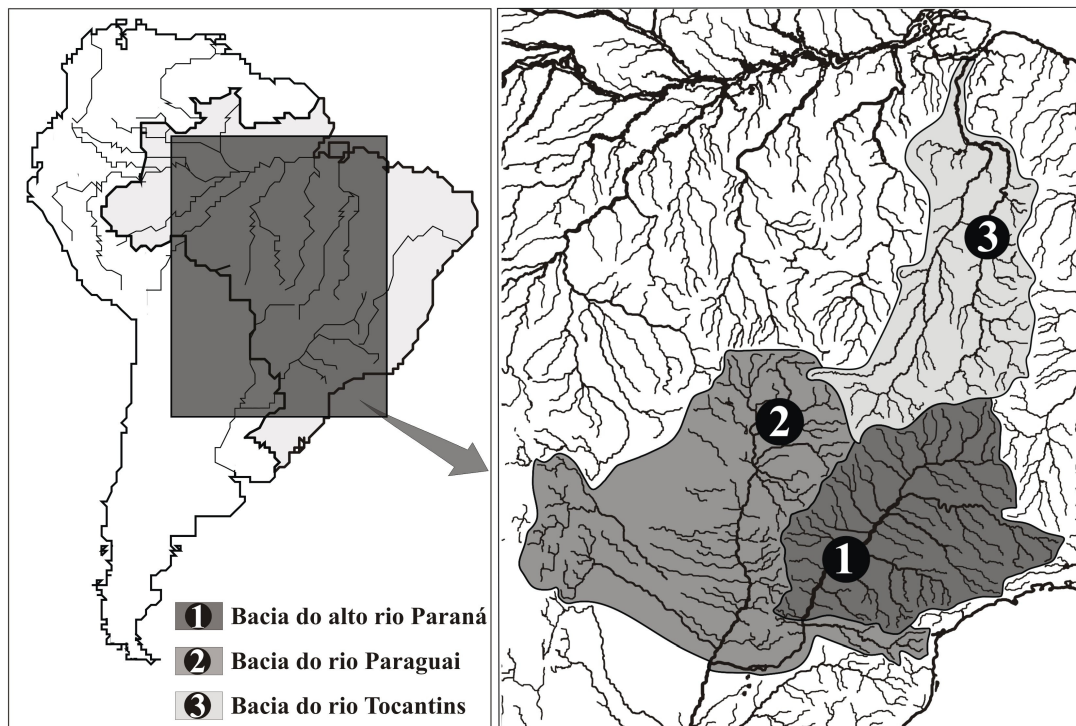


Figura 1 - Área de coleta de jaú *Zungaro*. Os números correspondem aos pontos de coleta: (1) Rio Paraná, região de Porto Rico-PR; (2) Rio Manso, na bacia do rio Paraná-Paraguai; (3) Rio Tocantins, na bacia Amazônica.

Tabela 1 Sequências região *D-loop* de espécies dos gêneros de Siluriformes, *Pseudobagrus* e *Hypostomus*, obtidas no *GenBank*.

| Família | Espécie | Acesso <i>Genbank</i> | Bibliografia |
|------------------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Bagridae | <i>Pseudobagrus taeniatus</i> | AB097696 | Watanabe e Nishida, 2003. |
| | <i>Pseudobagrus aurantiacus</i> | AB097694 | |
| | <i>Pseudobagrus nudiceps</i> | AB097693 | |
| | <i>Pseudobagrus ichikawai</i> | AB097692 | |
| | <i>Pseudobagrus tokiensis</i> | AB097691 | |
| Loricariidae | <i>Hypostomus affinis</i> | AJ318358 | Montoya-Burgos, 2003. |
| | <i>Hypostomus punctatus</i> | AJ318357 | |
| | <i>Hypostomus commersoni</i> | AJ318356 | |
| | <i>Hypostomus nigromaculatus</i> | AJ318355 | |
| | <i>Hypostomus watwata</i> | AJ318352 | |
| | <i>Hypostomus plecostomus</i> | AJ318351 | |
| | <i>Hypostomus fonchii</i> | AJ318350 | |
| <i>Hypostomus boulengeri</i> | AJ318344 | | |

O número de nucleotídeos polimórficos e as distâncias-p (porcentagem de diferenças nucleotídicas) foram calculados com o programa MEGA 4.0. A matriz de distância-p, foi utilizada para o agrupamento com o algoritmo *neighbor-joining*. Análises de *bootstrap* basearam-se em 10.000 reamostragens.

RESULTADOS

Para a região do *D-loop*, foram analisados quatro indivíduos do Rio Manso e três do Tocantins. Nas sequências (A = 36,7; C = 17,7; G = 13,7; T = 31,9%) foi encontrada uma alta proporção de nucleotídeos AT, o que é esperado para a região *D-loop*. O alinhamento dessas sequências apontou 20 pontos de substituições nucleotídicas, sendo 15 transversões e quatro transições. Essa maior taxa de transição ($R = si/sv = 3.7$) concorda com o esperado para o fragmento correspondente à região *D-loop* (Nei e Kumar, 2000). Dessas substituições 16 estão associadas aos indivíduos coletados no rio Tocantins. As demais substituições não caracterizam nenhuma região. Além disso, os indivíduos do rio Tocantins apresentam um *indel* correspondente a uma citosina.

Na Tabela 2 são apresentados os polimorfismos da região hipervariável do *D-loop*, em número e em porcentagens, entre sequências de indivíduos dos rios Paraná, Manso e Tocantins, comparadas duas a duas. Entre as sequências dos rios Paraná e Manso as diferenças foram de, no máximo, três sítios polimórficos (distância-*p* = 0,008 ou 0,8%). Em contraste, a comparação entre as sequências dos indivíduos da bacia Paraná/Manso com as sequências do indivíduos do rio Tocantins revelou 16-17 sítios polimórficos. Isso representa, em porcentagem, uma distância-*p* de 4,5 a 4,8%.

Tabela 2 Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos da região do *D-loop* (~355 pb) que discriminam espécies de *Zungaro* das bacias dos rios Paraná (PR), Manso (MS) e Tocantins (RT).

| Espécie | PR05 | PR08 | PR13 | MS04 | MS05 | MS06 | MS09 | RT02 | RT03 | RT05 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| PR05 | — | 0,8 | 0,6 | 1,1 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 4,8 | 4,8 | 4,8 |
| PR08 | 3 | — | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 4,5 | 4,5 | 4,5 |
| PR13 | 2 | 1 | — | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 4,8 | 4,8 | 4,8 |
| MS04 | 4 | 1 | 2 | — | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 4,8 | 4,8 | 4,8 |
| MS05 | 3 | 0 | 1 | 1 | — | 0,0 | 0,0 | 4,5 | 4,5 | 4,5 |
| MS06 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | — | 0,0 | 4,5 | 4,5 | 4,5 |
| MS09 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | — | 4,5 | 4,5 | 4,5 |
| RT02 | 17 | 16 | 17 | 17 | 16 | 16 | 16 | — | 0,0 | 0,0 |
| RT03 | 17 | 16 | 17 | 17 | 16 | 16 | 16 | 0 | — | 0,0 |
| RT05 | 17 | 16 | 17 | 17 | 16 | 16 | 16 | 0 | 0 | — |

Entre espécies congêneras, para a região D-loop frequentemente são encontrados valores da ordem de 4-5%, semelhantes aos registrados entre as bacias do Paraná/Paraguai e do rio Tocantins. Nas Tabelas 3 e 4 também são mostrados os valores, em número e em porcentagem, de sítios polimórficos, do segmento correspondente da região *D-loop*, entre espécies dentro dos gêneros *Pseudobagrus* e *Hypostomus*, da ordem Siluriformes. Como pode ser constatado, as diferenças entre *Zungaro* do Paraná/Paraguai e do Tocantins mantiveram-se nos mesmos patamares, de aproximadamente 5%, de muitas das distâncias entre espécies congêneras de *Pseudobagrus* e *Hypostomus*.

Tabela 3 Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos da região do *D-loop* (~355 pb) que discriminam espécies de *Pseudobagrus*.

| Espécie | <i>P.taeniatus</i> | <i>P.aurantiacus</i> | <i>P.nudiceps</i> | <i>P.iehikawai</i> | <i>P.tokiensis</i> |
|----------------------|--------------------|----------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| <i>P.taeniatus</i> | — | 1.1 | 4.7 | 7.8 | 5.3 |
| <i>P.aurantiacus</i> | 4 | — | 5.0 | 8.3 | 5.5 |
| <i>P.nudiceps</i> | 17 | 18 | — | 6.6 | 5.0 |
| <i>P.iehikawai</i> | 28 | 30 | 24 | — | 7.5 |
| <i>P.tokiensis</i> | 19 | 20 | 18 | 27 | — |

Tabela 4 Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos da região do *D-Loop* (~355 pb) que discriminam espécies de *Hypostomus*. **Haf** = *H. affinis*, **Hpu** = *H. punctatus*, **Hco** = *H. commersoni*, **Hni** = *H. nigromaculatus*, **Hwa** = *H. watwata*, **Hpl** = *H. plecostomus*, **Hfo** = *H. fonchii*, **Hbo** = *H. boulengeri*.

| Espécie | Haf | Hpu | Hco | Hni | Hwa | Hpl | Hfo | Hbo |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Haf | — | 5.7 | 6.0 | 7.4 | 8.7 | 7.3 | 10.3 | 6.8 |
| Hpu | 21 | — | 4.4 | 7.4 | 6.0 | 4.6 | 8.4 | 4.6 |
| Hco | 22 | 16 | — | 7.2 | 5.8 | 6.0 | 8.8 | 5.2 |
| Hni | 27 | 27 | 26 | — | 9.6 | 7.9 | 8.5 | 6.6 |
| Hwa | 32 | 22 | 21 | 35 | — | 6.8 | 11.1 | 6.1 |
| Hpl | 27 | 17 | 22 | 29 | 25 | — | 9.8 | 4.6 |
| Hfo | 38 | 31 | 32 | 31 | 41 | 36 | — | 9.5 |
| Hbo | 25 | 17 | 19 | 24 | 28 | 17 | 35 | — |

No dendrograma construído com distância- p para a região D -loop (Figura 2), é possível a constatação da separação de dois grupos de haplótipos de jaú, com suporte de *bootstrap* de 100%. Um haplogrupo está associado à bacia do Paraná-Paraguai e um haplótipo está associado com a bacia do rio Tocantins. Além disso, as espécies dos gêneros *Hypostomus* e *Pseudobagrus*, de Siluriformes, foram incluídas para referenciar as comparações. No dendrograma *neighbor joining*, construídos com distância- p , os comprimentos dos braços entre sequências são proporcionais à frequência de substituições nucleotídicas. Fica evidente, portanto, que o nível de diferenciação entre os haplótipos de *Zungaro* do Paraná-Paraguai e o haplótipo de *Zungaro* do rio Tocantins é de magnitude semelhante ao que entre muitas espécies congêneras de *Hypostomus* e *Pseudobagrus*.

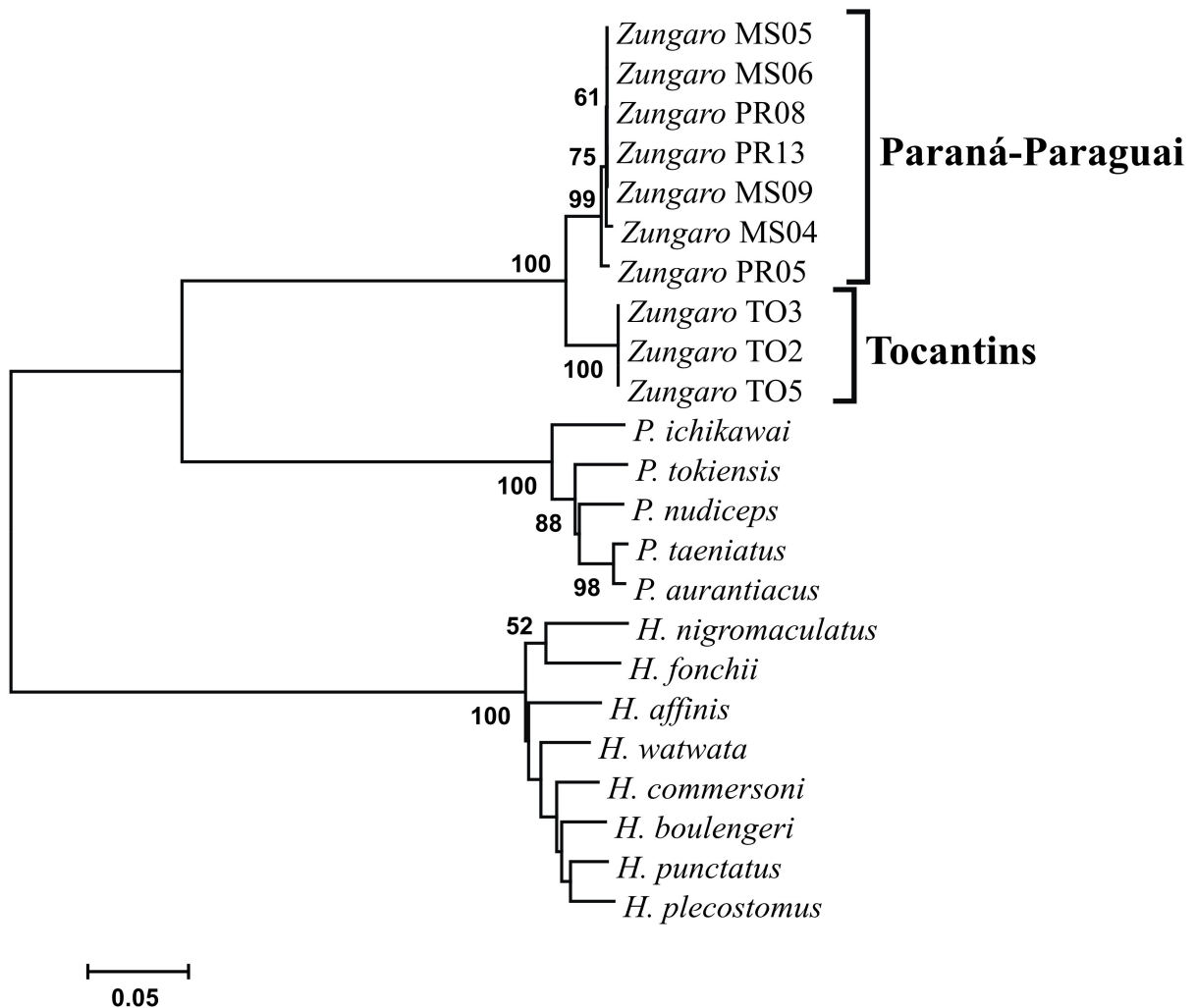


Figura 2 - Dendrograma das distâncias- p da região D -loop de oito espécies do gênero *Hypostomus*, cinco espécies do gênero *Pseudobagrus* e de *Zungaro* das bacias dos rios Paraná, Paraguai (Manso) e Tocantins. As sequências das espécies de *Hypostomus* e *Pseudobagrus* foram obtidas no *GenBank*.

DISCUSSÃO

Em contraposição a Lundberg e Littmann (2003), que identificam a espécie da bacia do rio Paraná como *Zungaro jahu*, Silfvergrip (1992) e Graça e Pavanelli (2007) utilizam *Z. zungaro* para a mesma população, pelo menos em caráter provisório. Portanto, a condição taxonômica da população nativa da bacia do Paraná-Paraguai, em relação à espécie amazônica, está sujeita a interpretações discrepantes. A análise das seqüências mitocondriais *D-loop* de *Zungaro* produziu evidências que apontam para a solução desse conflito. Os valores de distância-*p* obtidas com *D-loop* são consistentes em indicar diferenciação genética entre as populações de *Zungaro* das bacias do Paraná/Paraguai e do rio Tocantins. Além disso, a magnitude da divergência encontrada está em patamar que permite conclusão sobre a identificação taxonômica dos dois grupos.

Como demonstrado, existe divergência genética entre as populações de *Zungaro* das bacias Paraná-Paraguai e Amazônica, mesmo que em patamar não muito acentuado. Esse seria um nível de diferenciação que se poderia esperar entre espécies próximas, que oferecem dificuldades para a identificação em bases morfológicas. O alto grau de semelhança morfológica e genética, e a associação de haplótipos com bacias hidrográficas, podem ser explicados pela origem das populações. As hipóteses de vicariância e dispersão são plausíveis para explicar a diferenciação genética e o padrão biogeográfico.

Hubert e Renno (2006) mostram que a separação das bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai ocorreu no final do Mioceno, nos últimos 10 Ma. Entretanto, as diferenças genéticas acumuladas estão, aparentemente, em níveis muito baixos para o que poderia ser esperado no período de 10 Ma. Independentemente do processo inicial, vicariância ou dispersão, o isolamento geográfico deve ter se estabelecido em momento posterior à separação das duas bacias. De acordo com Räsänen *et al.* (1995), as ocorrências de captura de cabeceiras continuaram mesmo após o estabelecimento da bacia Amazônica e do Paraná-Paraguai. Portanto, o efetivo isolamento geográfico pode ter sido estabelecido depois da separação das duas bacias. Esta interpretação parece acomodar melhor a divergência genética em níveis baixos, como a encontrada.

O acentuado padrão geográfico na distribuição dos haplótipos *D-loop*, juntamente com o padrão de diferenças entre espécies congênicas, demonstram claramente diferenças entre as duas populações de *Zungaro* em níveis que discriminam espécies de peixes. Portanto, parece inevitável concluir que a população de *Zungaro* da bacia do Paraná-Paraguai não pertence à espécie de *Zungaro zungaro* da bacia Amazônica.

Segundos os resultados do presente trabalho, as populações de jaú da bacia do Paraná-Paraguai devem ser identificadas como *Zungaro jahu*. Essa conclusão é relevante, pois a espécie de jaú encontrada na bacia do alto Paraná está sob o risco de extinção local (Alves, 2006). Assim, as informações sobre a diversidade genética de *Zungaro* obtidas neste trabalho representam uma contribuição para nortear propostas de ações que possibilitem a recuperação da diversidade genética de *Z. jahu*. Principalmente, fica demonstrado que possíveis transferências de *Zungaro* da região amazônica para as áreas do alto rio Paraná onde o jaú está extinto não representaria repovoamento, mas sim introdução da espécie *Z. zungaro*.

REFERÊNCIAS

- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Suzuki, H.I.; Júlio, Jr H.F. 2003. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. In: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (Eds.), *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust – The World Bank, pp. 19-98.
- Alves, C.B.M. 2006. Jaú (*Zungaro jahu*): Um peixe mais ameaçado que os outros? Boletim sociedade Brasileira de Ictiologia. 83, 4-5.
- Awise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, second ed. Sinauer Associates Inc. Publisher, Sunderland, Ma.
- Graça, W.J.; Pavanelli, C.S. 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. EDUEM - Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Hubert, N.; Renno, J.-F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *J. Biogeogr.* 33, 1414–1436.
- Lundberg, J.G.; Littmann, M.W. 2003. Família Pimelodidae, in: Reis, R.E., Kullander S.O., Ferraris, S.J. (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 432-446.
- Ministério do Meio Ambiente 2007. Biodiversidade e Florestas: Espécies ameaçadas. Disponível em <http://www.mma.gov.br>.
- Monesi, N.; Jacobs-Lorena, M.; Paçó-Larson, M.L. 1998. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hígida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. 10, 559-569.
- Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol. Ecol.* 12, 1855-1867.

Okada, E.K.; Agostinho, A.A.; Gomes, L.C. 2005. Spatial and temporal gradients in artisanal fisheries of a large Neotropical reservoir, the Itaipu Reservoir, Brazil. *Can. J. Fish Aquatic Sci.* 62, 714-724.

Oliveira, A.V.; Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.P.; Bignotto, T.S.; Júlio Jr, H.F.; Carrer, H.; Agostinho, C.S.; Prioli, L.M. 2006. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *J. Fish Biol.* 69, 260–277.

Panarari-Antunes, R.S.; Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.P.; Júlio-Jr, H.F.; Agostinho, C.S.; Prioli, L.M. 2008. Molecular variability in *Brycon cf. Pesu* Müller and Troschel, 1845 (Characiformes: Characidae) from the Araguaia-Tocantins basin. *Genetics and Molecular Research*, vol. 7, no. 1, p. 95-106.

Perdices, A.; Doadrio, I. 2001. The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Mol. Phyl. and Evol.* 19, 468–478.

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. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Gen. Mol. Biol.* 25, 421-430.

Räsänen, M.E.; Linna, A.M.; Santos, J.C.R.; Negri, F.R. 1995. Late Miocene tidal deposits in the Amazonian foreland basin. *Science.* 269, 386–390.

Samonte, I.E.; Satta, Y.; Sato, A.; Tichy, H.; Takahata, N.; Klein, J. 2007. Gene Flow between Species of Lake Victoria Haplochromine Fishes. *Mol. Biol. and Evol.* 24, 2069–2080.

Silvano, R.; Oyakawa, O.; Amaral, B.; Begossi, A. 2001. Peixes do Alto Rio Juruá (Amazônia, Brasil). Universidade de São Paulo, São Paulo.

Silfvergrip, A.M.C. 1992. *Zungaro*, a senior synonym of *Paulicea* (Teleostei: Pimelodidae). *Ichthyol. Explor Freshwaters.* 3, 305-310.

Sullivan, J.P.; Lundberg, J.G.; Hardman, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear genome sequence. *Mol. Phyl. and Evol.* 41, 636 – 662.

Watanabe, K.; Nishida, M. 2003. Genetic population structure of Japanese bagrid catfishes. *Ichthyol. Res.* 50, 140-148.