
IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM POPULAÇÕES NATIVAS DE LAMBARIS *Astyanax* sp. B DO RIO IGUAÇU (ESTADO DO PARANÁ, BRASIL) POR ANÁLISES DE AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA

IDENTIFICATION OF GENETIC POLYMORPHISMS IN NATIVE POPULATIONS OF TETRA FISHES *Astyanax* sp. B OF IGUAÇU RIVER (STATE OF PARANA, BRAZIL) BY RANDOM AMPLIFICATION ANALYSES

Kárita Cláudia Freitas LIDANI¹; Rodrigo Augusto TORRES²; Humberto Maciel França MADEIRA³; Paulo César Falanghe CARNEIRO⁴; Jane Eyre GABRIEL^{5,*}

1- Professora da Faculdades Integradas do Brasil UNIBRASIL, Curitiba, PR

2- Professor da Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Recife, PE

3- Professor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR, São José dos Pinhais, PR

4- Pesquisador EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

5- Professora da Universidade Federal do Vale do São Francisco UNIVASF, Petrolina, PE

Autor para correspondência:

RESUMO:

O objetivo deste estudo foi estimar o polimorfismo genético de populações nativas de lambaris *Astyanax* sp. B oriundos de quatro localidades do Rio Iguaçu (Estado do Paraná, Brasil): areal Água Azul (AA: 25°47'34''S/50°11'34''W), Rio Piraquara (PIR: 25°30'10''S/49°01'25''W), Rio Passaúna (PAS: 25°15'20''S/49°25'15''W) e Zoológico Municipal de Curitiba (ZOO: 25°33'12''S/49°13'58''N). Polimorfismos genéticos foram estimados a partir do DNA genômico extraído de espécimes de cada localidade na presença de *primers* universais em reações de amplificação aleatória PCR-RAPD. Com o auxílio do programa NTSYS versão 2.02 foram construídas matrizes de similaridade a partir do coeficiente de Jaccard (J), além da construção de um fenograma empregando o algoritmo de agrupamento UPGMA. A caracterização molecular das populações de lambaris de diferentes localizações do Rio Iguaçu demonstrou um padrão eletroforético altamente polimórfico nas análises de PCR-RAPD, totalizando 165 caracteres, sendo 157 polimórficos (95,2%) e 8 monomórficos (4,8%). O fenograma de similaridade genética gerou a separação dos indivíduos em quatro grupos distintos com indivíduos do ZOO, PAS e AA agrupados em uma similaridade variando de 27 a 90%; e os do PIR apresentando o maior distanciamento genético (25%) em relação ao demais. O uso desses marcadores permitiu caracterizar polimorfismos suficientes para discriminar populações de lambaris com intensa diferenciação genética, sem estarem fortemente conectadas por fluxo gênico nem mesmo apresentarem tendência de homogeneização genética entre as mesmas. Os resultados apresentados no presente estudo reforçam a importância do uso da técnica de PCR-RAPD como uma ferramenta eficaz para estimar a diferenciação molecular entre populações nativas de lambaris.

Palavras-chave: caracterização molecular, PCR-RAPD, peixes nativos, polimorfismo de DNA.

ABSTRACT:

The objective of this study was to estimate the genetic polymorphism of native lambari *Astyanax* sp. B collected from four localities of the Iguaçu River (State of Paraná, Brazil):

areal Água Azul (AA: 25°47'34"S/50°11'34"W), Piraquara River (PIR: 25°30'10"S/49°01'25"W), Passauna River (PAS: 25°15'20"S/49°25'15"W) and Municipal Zoo of Curitiba (ZOO: 25°33'12"S/49°13'58"W). Genetic polymorphisms were estimated from samples of genomic DNA extracted of native tetra fishes of each locality and amplified in the presence of universal primers by RAPD-PCR analyses. Similarity matrices were constructed from program NTSYS version 2.02 and Jaccard coefficient, and the construction of a phylogenetic tree was plotted using algorithm UPGMA. The molecular characterization of different species of tetra fishes from different localities of Iguaçu River demonstrated a highly polymorphic electrophoretic pattern in the RAPD-PCR analyses, totaling 165 characters, being 157 polymorphic (95.2%) and 8 monomorphic (4.8%). The phylogenetic tree of genetic similarity generated a clustering of the specimens in four distinct groups with animals of ZOO, PAS and AA grouped in a similarity ranging of 27 to 90%, whereas animals of PIR presented the greatest genetic distance (25%) compared to the others. The use of these molecular markers allowed the discriminating genetic polymorphisms in native tetra fishes of different localities of the Iguaçu River, indicating absence of gene flow and homogenization among such specimens. The findings described herein reinforce the importance of the PCR-RAPD technique as an effective tool for the molecular characterization among native populations of fishes.

Key words: molecular characterization, PCR-RAPD, native tetra fishes, DNA polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Astyanax* sp. (Teleostei, Characidae) estão entre os componentes mais importantes da cadeia alimentar dos rios da América do Sul, com participação significativa na dieta de peixes de níveis mais elevados da cadeia alimentar, bem como um dos mais importantes pescados em território nacional como fonte de proteína na alimentação humana (ABILHOA, 2004). Existem cerca de 100 espécies e subespécies descritas para esse gênero, porém muitos aspectos taxonômicos ainda não estão completamente elucidados, especialmente por algumas possuírem elementos genômicos adicionais dispensáveis denominados cromossomos B que provavelmente surgiram dos cromossomos A (padrão) e estão presentes nesse gênero caracterizado como *Astyanax* sp. B (CAMACHO *et al.*, 2000). Nessa hidrografia, *Astyanax* é representado principalmente por sete ou oito espécies endêmicas; entre elas *Astyanax* sp. B, também conhecido por lambari do rabo vermelho (Abilhoa, 2004). Apesar da Bacia do Iguaçu apresentar uma fauna de peixes com considerável taxa de especiação e constituir um importante centro de endemismo, decorrência do isolamento geográfico causado pela formação das Cataratas do Iguaçu, a composição de sua ictiofauna ainda permanece pouco estudada. Nesse contexto, o conhecimento da variabilidade genética dos estoques naturais e cativos é de fundamental importância para o manejo correto desses estoques.

A técnica denominada Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso RAPD

("Random Amplified Polymorphic DNA") vem sendo empregada com sucesso para fornecer subsídios fundamentais à detecção de variações no DNA genômico entre subespécies ou populações cativas e nativas de várias espécies de peixes (PRIOLI *et al.*, 2002; LEUZZI *et al.*, 2004; POVH *et al.*, 2005; LIDANI *et al.*, 2006). Esta técnica destaca-se das demais pela facilidade de execução, por produzir resultados com baixo erro estatístico e por ser bastante viável pela simplicidade e rapidez em relação às demais técnicas moleculares (BÁRTFAI *et al.*, 2003). Especialmente, tais marcadores vêm sendo empregados para inferir um possível isolamento geográfico e endemismo a partir de variação e diferenciação genética entre populações de diferentes peixes, tais como: lambaris *Astyanax* sp. (MATOSO *et al.*, 2004), piracanjuba *Brycon lundii* (WASKO & GALETTI, 2002) e curimatã-pacu *Prochilodus marggravii* (HATANAKA & GALETTI, 2003).

Tendo em vista sua participação como importante componente da base da cadeia alimentar aquática, além de integrar a composição ictiofaunística ainda pouco estudada do Rio Iguaçu, o objetivo deste estudo foi identificar polimorfismos gênicos e estimar os níveis de variação e diferenciação genética de populações nativas de lambaris *Astyanax* sp. B oriundas de distintas localidades do Alto e Médio Iguaçu por análises de PCR-RAPD.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Captura dos espécimes e colheita de tecido biológico

Trinta espécimes de *Astyanax* sp. B foram colhidos do Alto Iguaçu com tarrafas de 1,5 cm, sendo 10 espécimes do Zoológico Municipal de Curitiba/Parque Municipal do Iguaçu (ZOO: 25°33'12''S/49°13'58''N); 10 espécimes do Rio Piraquara (PIR: 25°30'10''S/49°01'25''W) e 10 espécimes do Rio Passaúna (PAS: 25°15'20''S/49°25'15''W), além de 7 espécimes provenientes do areal Água Azul (AA: 25°47'34''S/50°11'34''W), situado no Médio Iguaçu. Aproximadamente 50 mg de tecido muscular foram colhidos com auxílio de material cirúrgico estéril, armazenados em etanol 95% e estocados a -20°C para posteriores análises moleculares.

2.2 Extração de DNA genômico e reações de amplificação na presença de primers universais

Amostras de DNA genômico foram isoladas a partir de tecido muscular como

descrito em detalhes por WASKO *et al.* (2003). A concentração e o grau de pureza dessas amostras foram estimados por leitura ao espectrofotômetro (BECKMAN, BU530), sendo sua integridade verificada em géis de agarose 1,0%. As reações de PCR-RAPD foram realizadas na presença dos seguintes *primers* OPW5, OPX4, OPX18, AM13, OPA05 e ERIC II (Tabela 1) a partir de 10 ng de DNA genômico nas condições experimentais descritas por LIDANI *et al.* (2006). Controle negativo foi incluído em cada experimento, contendo a mistura de reação de PCR na ausência de DNA genômico. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo e fotografados para identificação e comparação das bandas amplificadas com sistema digital KODAK EDAS 290. Foram utilizados dois padrões de peso molecular aparente, variando de 100 a 2.300 pb (100pb DNA *Ladder* e γ DNA *Hind* III, Invitrogen).

2.3 Análise dos resultados

Análises da variabilidade genética foram inferidas pela proporção de loci polimórficos na população, onde para cada genótipo a ausência ou presença de fragmentos amplificados são interpretados como 0 ou 1, respectivamente. Com o auxílio do programa NTSYS, versão 2.02 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 1989) foram construídas as matrizes de similaridade, com base no cálculo do coeficiente de Jaccard (J). Um fenograma representando o padrão de divergência genética entre os espécimes foi construído empregando o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*). A distância genética não tendenciosa de Nei (NEI, 1978), o índice de fixação G_{ST} (diversidade genética) e o número de migrantes (Nm) entre as populações foram estimados através do programa PopGene (Population Genetic Analysis) 1.32 (YEH *et al.*, 1999).

3. RESULTADOS

A caracterização molecular dos espécimes de lambaris provenientes de diferentes localizações do Rio Iguaçu demonstrou um padrão eletroforético altamente polimórfico por análises de PCR-RAPD, totalizando 165 caracteres, sendo 157 polimórficos (95.2%) e 8 monomórficos (4.8%). O número de fragmentos amplificados a partir de cada *primer* variou de 19 (*primer* AM13) a 36 (*primer* ERICII), com tamanhos entre 300 pb (*primer* ERIC II) e 2.300 pb (*primers* AM13, ERIC II e W5) (Tabela 1). Particularmente o *primer* ERICII

apresentou um *locus* com 2.072 pb exclusivamente na população oriunda de PIR e outro locus de 300 pb unicamente nos indivíduos provenientes do ZOO.

Tabela 1- SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS*, TAMANHOS DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS E NÚMERO DE CARACTERES MONOMÓRFICOS E POLIMÓRFICOS GERADOS

<i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos dos primers (5'-3')	Nº de <i>loci</i>	Nº de <i>loci</i> polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)
AM13	CACGGCACAA	19	16	500 - 2300
OPA05	AGGGGTCTTG	30	30	350 - 2100
ERICII	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	36	30	300 - 2300
OPX4	CCGCTACCGA	26	27	500 - 2200
OPX18	GACTAGGTGG	24	24	600- 2100
W5	GGCGGATAAG	30	30	600 - 2300
Total	---	165	157	---

A porcentagem de loci polimórficos nos lambaris nativos foi de 19,39% para PAS, 36,97% para AA, 56,36% para ZOO e 70,3% para PIR. Menores valores de índice de Shannon (0,094) e de variabilidade genética e diversidade gênica ($h=0,062$) foram observados nos espécimes provenientes de PAS. Em contrapartida, a população proveniente de PIR apresentou os maiores valores de diversidade gênica ($h=0,179$) e de índice de Shannon de 0,286.

O fenograma de similaridade genética resultou na separação dos indivíduos em quatro grupos distintos, que compartilham poucos alelos dominantes nos loci detectados, onde os indivíduos do ZOO, PAS e AA agruparam-se com uma similaridade variando de 27 a 90%; enquanto os indivíduos do PIR apresentaram o maior distanciamento genético em relação ao demais (25%) (Figura 1).

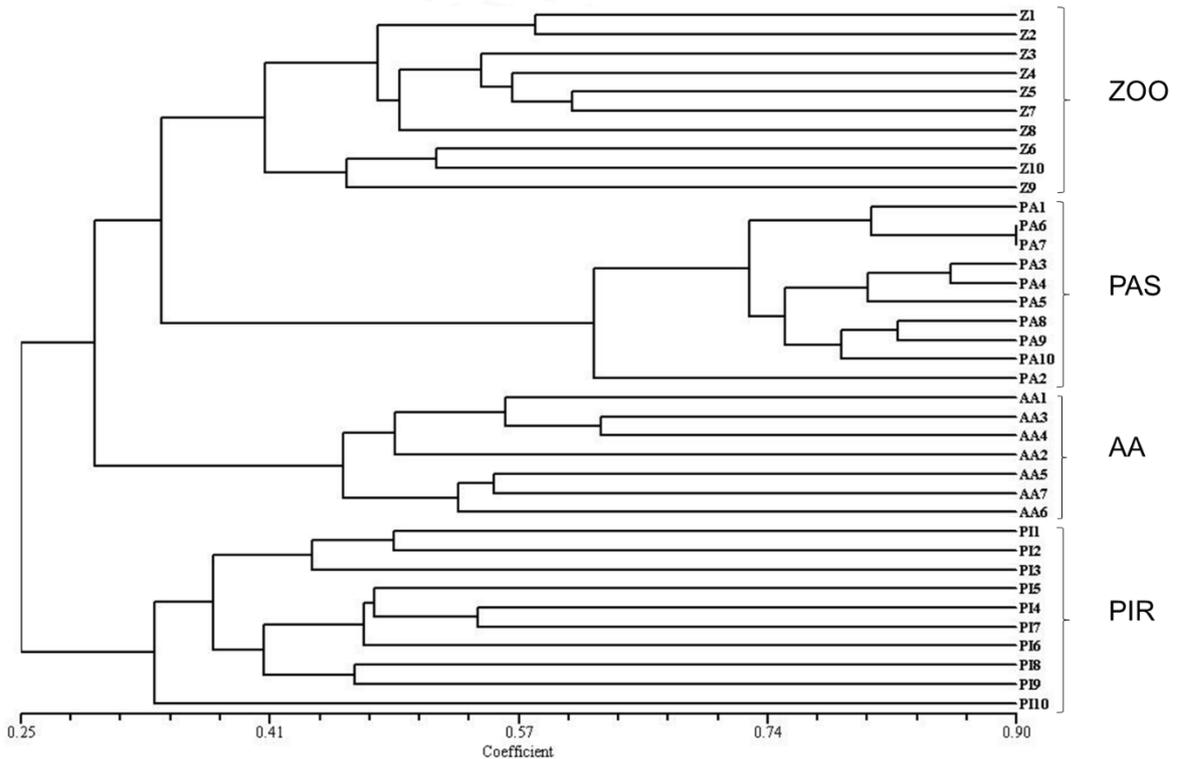


FIGURA 1- FENOGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE DIFERENTES POPULAÇÕES DE LAMBARIS *Astyanax* sp. B DO RIO IGUAÇU: ZOO (ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA); PAS (RIO PASSAÚNA); AA (AREAL ÁGUA AZUL) E PIR (RIO PIRAQUARA).

Valores de maior distância genética de Nei (0,139) e menor identidade genética (0,870) foram detectados entre os indivíduos do PIR e do PAS. Em contrapartida, menor distância genética (0,078) e maior identidade genética (0,924) foram observada entre indivíduos do ZOO e de AA. Ainda, com o uso desses marcadores foi possível acumular polimorfismos suficientes para caracterizar e discriminar essas populações de lambaris com valores de índice de fixação G_{ST} e número de migrantes N_m de 0,3640 e 0,8735, respectivamente, indicando intensa diferenciação genética entre os indivíduos analisados.

4. DISCUSSÃO

A caracterização molecular de lambaris provenientes de diferentes localizações do Rio Iguaçu demonstrou que a maioria dos *primers* empregados nas PCR-RAPD resultou em um padrão eletroforético altamente polimórfico com sinais de amplificação bem definidos para as populações estudadas. O número de loci observado nessas condições

experimentais foi superior ao encontrado por PRIOLI *et al.* (2002) para o gênero *Astyanax* (10 *primers*: 87 loci com 90% de polimorfismo) e por POVH *et al.* (2005) para o gênero *Oreochromis* (9 *primers*: 90 loci com 50% de polimorfismo). Tendo em vista que a identificação do número de loci gerados é mais relevante do que o número de *primers* empregados nessas análises moleculares (TELLES *et al.*, 2001), as descobertas descritas acima são totalmente aceitáveis quanto ao número de loci descrito para estimar a diversidade genética por análises de PCR-RAPD. Além disso, a identificação de bandas exclusivas a partir das amplificações com o *primer* ERICII nas populações oriundas de PIR e ZOO apresenta implicações significativas para o desenvolvimento de *primers* específicos via SCAR (*Sequence Characterised Amplified Region*) para análises de avaliação e monitoramento de longo prazo da integridade genética de populações selvagens e cativas de outras espécies (LI *et al.*, 2010).

Maior distanciamento genético foi observado entre as populações de animais oriundas de PAS e PIR nos agrupamentos de similaridade genética (Figura 1). De fato, a separação dos acessos no fenograma pode ser resultado da origem geográfica de cada local selecionado para a captura dos animais nesse estudo, sendo tais valores proporcionais ao tempo de divergência e a taxa de substituição gênica por locus e por geração. Segundo THORPE & SOLE-CAVA (1994), a distância genética de Nei entre espécies do mesmo gênero tem sido estimada com valores que variam entre 0,162 e 0,3 para a maioria das espécies de peixes em estudos enzimáticos. Além disso, os valores preditos para a distância genética de Nei refletem o longo processo evolutivo com divergências populacionais devido à deriva genética e a eventos mutacionais (DE AGUIAR *et al.*, 2009).

Surpreendentemente, a baixa distância genética e a maior identidade genética observadas entre as populações do ZOO e de AA podem indicar que as mesmas mantêm uma identidade genética de um único ancestral comum recente, mesmo com a presença de uma barreira geográfica o Salto Caiacanga (município de Porto Amazonas), situado na localidade AA. Além disso, tal barreira parece não estar isolando geograficamente os indivíduos da população AA das demais devido a seus agrupamentos com similaridade genética de 30% com a população de lambaris do PAS. Populações nativas de peixes isoladas em função da existência de acidentes geográficos tendem a acumular polimorfismos e divergências genéticas proporcionais à intensidade e ao tempo de isolamento, onde o grau em que uma população pode ser delimitada de outras depende do nível de fluxo gênico entre elas (DE AGUIAR *et al.*, 2009).

Com o uso desses marcadores moleculares foi possível identificar polimorfismos genéticos suficientes para caracterizar e discriminar populações de lambaris, indicando intensa diferenciação genética, sem estarem fortemente conectadas por fluxo gênico nem mesmo tendência de homogeneização genética entre as mesmas. As descobertas descritas no presente estudo sugerem que essas populações de lambaris apresentam divergência genética suficiente para caracterizá-las como espécies ou morfotipos distintos, visto que o padrão de bandas amplificadas a partir dos indivíduos dessas respectivas populações é altamente diferenciado com alterações no número de tamanho de fragmentos produzidos. Pode-se estimar ainda que o tempo de introdução dessas espécies e o número de gerações foram suficientes para acumular mutações detectadas por análises de PCR-RAPD.

Em conclusão, os dados gerados nesse estudo demonstram uma forte estruturação genética entre populações de lambaris do Alto e Médio Iguaçu, sem sobreposição de genótipos de diferentes localidades. Tais resultados indicam que os indivíduos analisados podem estar em curso de diferenciação genética pela existência de um arranjo bem estruturado dessas populações, com baixo valor de fluxo gênico. Ainda, a metodologia empregada nessas condições experimentais representa uma importante ferramenta para o entendimento de como essas populações nativas de lambaris estão organizadas geneticamente, auxiliando no manejo de coleções de germoplasma e no direcionamento de programas de repovoamento e melhoramento genético.

5. REFERÊNCIAS

- ABILHOA V. Composição, aspectos biológicos e conservação da ictiofauna do alto curso do rio Iguaçu, região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. Tese de doutorado, 2004.
- BÁRTFAI R, EGEDI S, YUE GH, *et al.* 2003. Genetics analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, 219: 157-167.
- CAMACHO JP, SHARBEL TF, BEUKEBOOM LW. 2000. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 355: 163–178.
- DE AGUIAR MAM, BARANGER M, BAPTESTINI EM, *et al.* 2009. Global patterns of speciation and diversity. *Nature*, 460, 384–387.

HATANAKA T, GALETTI JR PM. 2003. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 19- 25.

LEUZZI MSP, ALMEIDA FS, ORSI ML, *et al.* 2004. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 27: 355-362.

LI SF, TANG SJ, CAI WQ. 2010. RAPD-SCAR markers for genetically improved Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus* L.) and their application in strain identification. *Zoological Research*, 31: 147-154.

LIDANI KCF, LIMA JR, TORRES RA, *et al.* 2006. Variabilidade genética de um estoque cativo de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Revista Acadêmica*, 4: 47-53.

MATOSO DA, ARTONI RF, GALETTI JR PM. 2004. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia*, 527: 223- 225.

NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.

POVH JA, **MOREIRA HLM, RIBEIRO RP, et al. 2005.** Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum: Animal Sciences*, 27: 1-10.

PRIOLI S, PRIOLI MAP, Alberto AJ, *et al.* 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 25: 421-430.

ROHLF FJ. NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Exeter, 1989.

TELLES MPC, MONTEIRO MSR, RODRIGUES FM, *et al.* 2001. Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de *locos* necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciência Animal Brasileira*, 2: 87-95.

THORPE JP, SOLÉ-CAVA AM. 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta*, 23: 3-18.

WASKO AP, GALETTI JR PM. 2002. RAPD analysis in Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, 474, 131-137.

WASKO AP, MARTINS C, OLIVEIRA C, *et al.* 2003. Non-destructive genetic in fish. An improved method for DNA extraction from fish and scales. *Hereditas*, 138: 161-165.

YEH FC, YANG R, BOYLE T. POPGENE version 3.1: Microsoft Windows-bases freeware for population genetic analysis. University of Albert and Center for International Forestry Research, 1999.