

VARIABILIDADE GENÉTICA DA PIRAMUTABA – *Brachyplatystoma Vaillantii* (Siluriformes: Pimelodidae) NO RIO MADEIRA.

Keroleny Eduardo DANTAS¹, Kyara Martins FORMIGA², Jacqueline da Silva BATISTA³.
1Bolsista PIBIC/CNPq/INPA, 2Orientadora CBIO/INPA, 3Coorientadora CBIO/INPA

1.Introdução

A piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) (Figura 01) é um grande bagre da bacia amazônica, migrando cerca de 5000 km em rios de águas brancas. Seu ciclo de vida começa desde o estuário amazônico até as cabeceiras dos tributários do rio Solimões-Amazonas (Fabrè e Barthem, 2005; Barthem e Golding, 2007).



Figura 01 – Exemplar de piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii*

De acordo com Barthem e Goulding (1997) o ciclo de vida da Piramutaba ocorre em três regiões diferentes: cabeceiras dos afluentes do rio Solimões, principal área de desova dos bagres, estuário, área de criação, e a calha do sistema Estuário- Amazonas-Solimões(EAS) serve de alimentação para adultos e pré-adultos. É fonte de alimentação e contribui para renda familiar das populações ribeirinhas, através da comercialização do pescado nos mercados locais, ou da exportação para outras regiões do Brasil ou mesmo para o exterior (Marques, 2002). Sua captura ocorre ao longo do sistema EAS, tanto pela pesca comercial artesanal, quanto pela industrial, sendo esta última presente somente que no estuário, (Barthem, 1990; Barthem & Golding 1997).

O rio Madeira tem uma extensão aproximadamente de 3.315 km, sendo o 17º maior do mundo, possuindo 19 cachoeiras bem distintas onde podem ser bem observadas migrações dos bagres. Um dos fragmentos de DNA mais utilizados em estudos populacionais é a região controle. Esse marcador vem sendo amplamente utilizado com o propósito de estimar a variabilidade e estrutura genética em populações naturais de diferentes espécies de peixes, principalmente de importância comercial. Para peixes da Amazônia vários estudos populacionais foram realizados a partir da região controle do DNA no intuito de caracterizar geneticamente as populações de peixes da região como a curimatã (Sivasundar *et al* 2001), o pirarucu (Herbet *et al* 2008), o tambaqui (Santos *et al* 2007), duas espécies de piraíba (Huergo *et al*, 2011), o surubim (Torrico *et al*, 2009), a dourada (Batista e Alves-Gomes *et al*, 2006) e a piramutaba (Aquino, 2004). O grupo de pesquisa em biologia evolutiva de peixes atualmente possui uma grande base de dados de vários anos sobre a piramutaba do rio Madeira. Neste contexto é possível verificar os níveis de variação genética desta espécie no rio Madeira desde o ano de 2003, o qual poderá servir de subsídios para conservação e manejo da piramutaba na Amazônia.

2.Material e Métodos

Foram coletadas espécimes de *Brachyplatystoma vaillantii*, de 2003 a 2009, nos portos de desembarque pesqueiro ao longo do Rio Madeira.

Foram utilizadas sequências da região controle do DNA mitocondrial de indivíduos dos anos de 2003 (Marão-Siqueira, 2003) e 2004, obtidas anteriormente pelo grupo de pesquisa. As sequências dos indivíduos coletados em 2009 foram obtidas neste trabalho a partir da metodologia descrita a seguir:

Extração de DNA: Parte do DNA das amostras de tecido foi extraído com Kits de extração de DNA Kiagen® e outra parte segundo o protocolo fenol Clorofórmio (Sambrook 1989). O DNA total extraído foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed (*Biotium*), no qual, a partir de visualização em foto documentador (UVP).

Amplificação da Região Controle: Por meio da técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), foi realizada a amplificação do fragmento do DNA mitocondrial, região controle. Foram utilizados os *primers* CitybP-L (Batista, 2010), e o DL R1 (Huergo *et al*, 2011), sendo utilizado o seguinte perfil de temperatura: 94°C por 3 min; 94°C por 1 min; 57°C por 1 min; 72°C por 1 min e 30 seg. com 72°C por 10 min. com ciclagem de 35 ciclos. A purificação do produto de PCR foi realizada com o kit de purificação GFX (GE-HealthCare) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Sequenciamento do produto da PCR: Foi sequenciado o produto de PCR purificado com o kit de sequenciamento *ABI* e o primer FTTP-L (Huerdo *et al.*, 2011). Após a reação de sequenciamento seguida de sua precipitação, o produto foi eletroinjetado no analisador automático de DNA *ABI* 3130XL do LTBM/INPA.

Análises das seqüências nucleotídicas da Região Controle: As sequencias foram editadas, alinhadas e conferidas a partir, dos programas BIOEDIT 6.0.7 (Hall, 1999) e CHROMAS 2.24 (www.technelysium.com.au/chromas.html). As análises das seqüências nucleotídicas, foram feitas com o auxílio dos programas como Mega 4.0 (Tamura-nei *et al.*, 2007), e Arlequin v3.11.(Excoffier *et al.*,2005)

3.Resultados e Discussão

Dos 76 indivíduos sequenciados foram obtidos 550 pares de bases de cada indivíduo, que correspondem a região controle parcial do DNA mitocondrial. Na tabela 01 verificam-se os resultados das análises de polimorfismo de DNA dos indivíduos dos anos de 2003, 2004 e 2009. Verifica-se alta variabilidade genética pois os valores encontrados para os índices como K e S são altos em relação ao N de cada ano. Além disso, as mutações restritas (MR) são poucas, o que sugere fluxo gênico entre estes anos. O baixo número de mutações restritas (MR) entre os anos sugere fluxo gênico, ou seja, os haplotipos permanecem no decorrer deste período. Com os dados obtidos para o polimorfismo de DNA sugere-se que até o momento, a variabilidade genética da piramutaba não foi afetada pela construção da hidroelétrica no rio Madeira, que foram coletadas antes e após a construção das barragens.

Tabela 01 – Valores das análises de polimorfismo de DNA das seqüências da região controle de *Brachyplatystoma vaillantii*. H-número de haplótipos; Hu-número de haplótipos únicos; S-número de sítios polimórficos; I-número de indels; ETA-número total de mutações; MR-mutações restritas; HD-diversidade haplotípica; K-média das diferenças nucleotídicas par a par e Pi-diversidade nucleotídica

Ano	N	H	Hu	S	I	ETA	MR	HD	K	Pi
2003	35	25	21	29	2	29	7	0,956 ± 0,024	6,063 ± 2,957	0,011 ± 0,005
2004	14	9	7	20	1	20	1	0,901 ± 0,062	5,164 ± 2,661	0,009 ± 0,005
2009	27	21	18	29	2	29	5	0,971 ± 0,021	6,028 ± 2,963	0,011 ± 0,006
Todos	76	46	37	40	2	40	-	0,957 ± 0,013	6,149 ± 2,956	0,011 ± 0,005

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) mostraram que 6% da variância total encontra-se nos anos enquanto que 93% desta variação está dentro dos anos, indicando a presença de fluxo gênico, confirmado pelo valor de Fst que não é significativo (Tabela 02).

Tabela 02 - Análise de variância molecular (AMOVA), inter e intrapopulacional. Va = variância de cada população, Vb= variância entre as populações.

Fonte de variação	d.f.	Soma dos quadrados	Os componentes de variância	Porcentagem de variação
Inter-anual	2	15,565	0,20275 Va	6,44
Intra-anual	73	215,028	2,94558 Vb	93,56
Total	75	230,592	314,833	
Índice de fixação FST :	0,06440			

A tabela 03 apresenta os valores de Fst para as comparações interanuais, no qual a variabilidade genética foi significativamente diferente entre os anos de 2003 e 2004 (Fst=0,009 e P<0,05). Esta diferença pode ser em função do ciclo reprodutivo da piramutaba que se reproduz a cada dois anos. Desta forma os indivíduos sequenciados de 2003 e 2004 seriam de coortes diferentes. Além disso, para se confirmar esta diferença genética seria necessário aumentar o N amostral de 2004.

Tabela 03 – Valores de Fst entre os anos. O valor em vermelho indica os dois anos significativamente diferentes (P< 0,05).

	2003	2004	2009
2003	-		
2004	0,009	-	
2009	0,081	0,288	-

4.Conclusão

Após análise das sequencias da região controle de 76 indivíduos de piramutaba do rio Madeira foram obtidas as seguintes conclusões:

- A proporção de bases, apresentou prevalência de adenina e Timina, que é o perfil comum para a região controle em peixes.
- Foi verificada alta variabilidade entre os anos analisados.

- O baixo número de mutações restritas (MR) entre os anos sugere fluxo gênico entre os mesmos.
- A variância total entre os indivíduos analisados é maior intra anualmente, indicando que 93% desta variação está dentro dos anos, indicando a presença de fluxo gênico, confirmado pelo valor de F_{st} que não é significativo.
- Foi verificada uma variabilidade significativamente diferente entre 2003 e 2004. Esta diferença pode ser em função do ciclo reprodutivo da piramutaba que se reproduz a cada dois anos.
- Com os dados obtidos sugere-se que até o momento, a variabilidade genética da piramutaba não foi afetada pela construção da hidroelétrica no rio Madeira. Estes dados poderão servir de subsídios para conservação e manejo da piramutaba na Amazônia.

5.Referências Bibliográficas

- Barthem, R.; Goulding, M. 1997. *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá, MCT - CNPq, IPAAM. Brasília, Brazil. 140 pp.
- Barthem, R. B. 1990. *Ecologia e Pesca da Piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii)*. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 268 p.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Fabré, N. N.; Barthem, R. B. 2005. *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas*. Coleção Documentos Técnicos: Estudos Estratégicos. Manaus: IBAMA, Pro Várzea. 114pp.
- Aquino, K. 2004. *Variabilidade genética da piramutaba - Brachyplatystoma vaillantii (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões*. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus, 73 pp.
- Huergo, Filgueiras-Souza, Batista, Aquino & Alves-Gomes* Molecular genetics as a tool for fisheries management in the Brazilian Amazon: Piraiba (*Brachyplatystoma filamentosum* and *Brachyplatystoma capapretum*) (Siluriformes: Pimelodidae) in white-water rivers *National Institute for Amazonian Research (INPA), Molecular Biology Thematic Laboratory (LTBM), Av. André Araújo 2936, Aleixo, CEP 69060-000, Manaus, Amazonas, Brazil. *E-mail: puraque@inpa.gov.br*
- Hall, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Res.*, 27: 586-588.
- Herbet, T. & Farias, I. P. (2008). The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). *Genetics and Molecular Biology*
- Batista & Alves-Gomes, 2006 (Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of "homing" for an Amazonian migratory catfish
- Marques, D. K. S. 2002. *Aplicação da Biologia Molecular em programas de Conservação de recursos pesqueiros*. Embrapa Pantanal-Documentos, 36. 22p.;
- SANTOS, High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River *Journal of Fish Biology* (2007) 71 (Supplement A), 33–44 doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01514.x, available online at <http://www.blackwell-synergy.com>
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor, NY.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S.; 2007. Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599