

VARIABILIDADE GENÉTICA DA PIRAMUTABA (*Brachyplatystoma vaillantii*) DO RIO MADEIRA

Amanda de Araújo ROCHA¹
Jacqueline da Silva BATISTA²
Kyara Martins FORMIGA³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientadora INPA/CBIO; ³Colaboradora INPA/CBIO

INTRODUÇÃO

A bacia do rio Madeira é a única que ocupa uma extensão duas vezes superior a qualquer outra bacia na região amazônica, cobrindo uma área de 1.380.000 km², distribuída em territórios do Brasil, da Bolívia e do Peru (Goulding *et al.* 2003). Para o rio Madeira, no trecho que inclui a foz do rio Mamoré até a foz do rio Madeira, são conhecidas 49 espécies de Pimelodidae. Isso representa mais de 80% das espécies de pimelodídeos conhecidas para a Amazônia, o que evidencia a importância do rio Madeira como representação da ictiofauna regional (Albert *et al.* 2011). Os grandes bagres migradores pertencem a Ordem: Siluriformes e família Pimelodidae. Essa família compõe aproximadamente 300 espécies que se distribuem ao longo dos rios das Américas do Sul e Central, Ilhas do Caribe e Sul do México (Nelson 2006).

A piramutaba, *Brachyplatystoma vaillantii*, é um bagre de água doce pertencente à família Pimelodidae; possui o corpo de coloração cinza - escura na região dorsal e cinza - clara na região ventral. No Norte do Brasil a espécie ocorre principalmente ao longo dos rios Solimões-Amazonas e em seus tributários de água barrenta. Raramente ultrapassa as primeiras corredeiras exceto no rio Madeira (Barthem e Goulding 1997). A piramutaba está entre as duas espécies de bagres de maior importância para a pesca regional e industrial, e consiste na espécie de peixe de água doce mais importante para a exportação de pescados do Brasil, sendo confirmada esta situação nos dados de desembarque (Barthem 1990; Barthem e Goulding 1997; IBAMA 1999).

Assim como os demais peixes de alto valor comercial, a piramutaba precisa ser estudada para conhecer seu atual estado genético populacional. A delimitação das populações é de fundamental importância para poder desenvolver um plano de manejo e conservação, pois dados pesqueiros informam que o recurso já está em risco de sobrepesca (IBAMA 1999; Sanyo 1998, Batista *et al.* 2005). A biologia molecular representa um importante campo de pesquisa contribuindo para a elucidação de questões sobre filogenia, genética populacional e filogeografia dos organismos. O uso de marcadores moleculares com base no polimorfismo do DNA vem sendo amplamente utilizado para inferir a variabilidade genética dos organismos. Entre os marcadores de estudo, a utilização do DNAm é intensamente utilizado em análises de relações filogenéticas e no acesso a variabilidade genética dos organismos (Schlotterer 2004).

O objetivo deste trabalho é estimar a variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) ao longo do rio Madeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi selecionado o DNA genômico de indivíduos de *Brachyplatystoma vaillantii* do banco de DNA do grupo de pesquisas de peixes eletrosensitivos na coleção de Recursos Genéticos do INPA, esses indivíduos foram coletados ao longo do rio Madeira desde 2003 e estão sendo conservados em álcool 70%. As localidades selecionadas foram: Itacoatiara (3° 8' 31" S e 58° 26' 33" O), Humaitá (7°30'59.36"S e 63°01'48.27"O), Porto Velho (8°45'33.83"S e 63°54'02.50"O), Teotônio (08° 51' 27,36'S e 64°3'50,16"O) Jirau (09° 19' 46,25" S e 64°43'54,33"O), Santo Antônio (8°48'08.58" S e 63°57'01.65"O) e Cachoeira do Macaco (08° 50' 34,73" S e 08° 50' 34,73"O).

Foi amplificada a região controle do DNA mitocondrial de cada indivíduo, essa região é composta em média por 1000 pb em peixes. A reação foi realizada em microtubos de 0.2 ml, com os seguintes reagentes e suas concentrações finais: Tampão 1X; Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (2mM); dNTPs (0,2mM); *Primer* FTTP-F (0,2 μ M); *Primer* F12 R (0,2 μ M); Taq (0,03U). Os *primers* iniciadores utilizados na reação localizam-se adjacentes à região controle do DNA mitocondrial, e tem as seguintes sequências: FTTP-L 5' - CCA AGC GCC GGT CTT GTA A - 3', (Huergo *et al.* 2011), F-12R 5' - GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG - 3' (Sivasundar *et al.* 2001).

Depois de amplificado, o produto da PCR foi verificado e quantificado, por comparação com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Life technologies), em eletroforese padrão, 90 V por 1h em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium). O processo de purificação tem por objetivo retirar produtos que não foram incorporados no processo de PCR, tais como dNTPs, *primers*, sais entre outros, pois esses resíduos podem interferir o sequenciamento automático. A purificação do produto de PCR foi realizada com polietilenoglicol (PEG 8000).

Para sequenciamento do DNA de piramutaba, foram realizadas duas reações de sequenciamento, uma utilizando o *primer* M13 F (5uM), água ultrapura, Tampão 5X, *BigDye 3.11*, e outra utilizando o *primer* M13 R (5uM), com os mesmos reagentes. Após a reação de sequenciamento é dado início ao processo de precipitação das amostras, com a finalidade de eliminar materiais não incorporados na reação. As amostras foram ressuspensas em 10ul de formamida Hi-Di, e vortexada levemente e em seguida eletroinjetadas no sequenciador automático ABI 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems), do Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA, a fim de se obter as sequências nucleotídicas do fragmento em questão.

Ao término do sequenciamento automático, no qual foram geradas as sequências nucleotídicas dos espécimes de *B. vaillantii*, as mesmas foram conferidas, com o auxílio do programa Chromas 2.23 (<http://www.technelysium.com.au>), alinhadas e editadas com o auxílio do programa BioEdit 6.0.7 (Hall 1999), com o auxílio da ferramenta Clustal W incorporado no referido programa, gerando uma matriz de dados contendo sequências de todos os indivíduos estudados. Após este processo foram feitas as análises estatísticas.

Com as sequências editadas formou-se uma matriz de dados contendo a sequência nucleotídica com 942 pb para cada um dos 126 indivíduos de *B. vaillantii*. Para o total alinhamento das sequências foram inseridos *gaps* (eventos de inserção ou deleção de bases). Para estimar as relações filogenéticas, foi utilizado o programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2007), as análises estatísticas de genética populacional foram feitas através do programa ARLEQUIN v3.11 (Excoffier *et al.* 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com as sequências dos 42 indivíduos de *B. vaillantii* editadas formou-se uma matriz de dados contendo a sequência nucleotídica com 942 pb. Este número deve-se ao fato de ter sido necessário a inclusão de “*gaps*”, que representam eventos mutacionais de inserção ou de deleção de uma base na sequência analisada.

A partir de todas as sequências analisadas verificou-se 310 sítios polimórficos, 260 corresponderam a mutações do tipo transição e 16 do tipo transversão. Os resultados das análises de polimorfismo de DNA das localidades encontram-se na Tabela 1, que apresentam as seguintes informações: **N**, número de sequências; **HU**, número de haplótipos únicos; **S**, número de sítios polimórficos; **ETA**, número total de mutações; **Pi**, diversidade nucleotídica; **K**, média das diferenças nucleotídicas par a par; e **Tajima's D**, teste de neutralidade de Tajima, **Fs de Fu**, teste de neutralidade seletiva. Pode-se notar grande número de haplótipos únicos por localidade, elevado número total de mutações e sítios polimórficos por localidade. O teste de neutralidade de *Tajima's D* indica que há evidências de expansão populacional, o que é reforçado pelo teste de neutralidade de **Fs de Fu**.

Tabela 1. Valores das análises de polimorfismo de DNA das sequências da região controle de *Brachyplatystoma vaillantii*. Os valores abaixo dos números correspondem ao desvio padrão.

Localidades	N	HU	S	ETA	Pi	K	Tajima's D	Fs de Fu
Itacoatiara	8	8	50	96	0,0197± 0,0111	18,607±9,249	-0,094	-1,030
Humaitá	8	8	33	63	0,0153± 0,0087	14,392±7,229	0,687	-1,467
Porto Velho	37	35	60	112	0,0147± 0,0075	13,852±6,361	-0,165	-21,368
Santo Antônio	11	11	38	72	0,0139± 0,0076	13,090±6,390	-0,017	-3,351
Teotônio	31	29	58	109	0,0143± 0,0073	13,513±6,241	-0,236	-15,064
Cachoeira do Macaco	24	22	54	102	0,0142± 0,0073	13,373±6,231	-0,388	-8,485
Jirau	7	7	17	32	0,0089± 0,0053	8,380±4,421	1,265	-1,840

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA), apresentados na Tabela 2, discriminam os componentes variantes, que são as variâncias resultantes das diferenças entre as populações (Va) e dentro das populações (Vb), onde se constatou que os indivíduos de *B. vaillantii* estudados do rio Madeira não possuem variância molecular significativa, ou seja, compõem uma mesma população panmítica.

Tabela 2. Valores da análise de variância molecular (AMOVA).

Tipos de variantes	Componentes variantes	%	Fst	P
Interpopulacional	0,15886 Va	2,28	0,02275	0,06099
Intrapopulacional	6,82311 Vb	97,72		
Total	6,98197			

O alto nível de variabilidade genética da piramutaba do rio Madeira encontrado corroboram os resultados obtidos por Formiga-Aquino (2004), ao estimar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de espécimes *B. vaillantii*, coletados em cinco pontos do sistema Estuário-Amazonas-Solimões (EAS), utilizando 942 pb da região controle do DNA mitocondrial. Esta alta variabilidade genética pode ser constatada com os elevado número de sítios polimórficos, grande quantidade de haplótipos únicos e poucos haplótipos compartilhados.

Esses resultados corroboram com Marão-Siqueira (2003) que trabalhou com 32 espécimes de *B. vaillantii* coletados ao longo do rio Madeira no estado de Rondônia na cidade de Porto Velho, utilizando 942 pb correspondentes ao fragmento da região controle do DNA mt, e obteve por meio de análises, relações genéticas ou evolutivas, polimorfismo de DNA e por cladogramas de haplótipos, uma grande variabilidade genética entre os espécimes de *B. vaillantii* desta localidade, sugerindo que a população possui fluxo gênico.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pelas análises deste trabalho, verificou-se que os espécimes de *Brachyplatystoma vaillantii* coletados ao longo do rio Madeira possuem fluxo gênico, além de a espécie apresentar alto nível de variabilidade genética, compondo uma única população panmítica, podendo ser considerada como um único estoque para fins de manejo e conservação.

Em função de esta espécie ser de grande importância comercial compartilhado entre o Brasil e outros países latino-americano, como a Bolívia, Colômbia e Peru, estudos futuros serão necessários, para que se tenha um monitoramento ao longo do tempo e verificar se a construção de hidroelétricas pode influenciar de alguma maneira o fluxo gênico existente.

REFERÊNCIAS

- Albert, J.A.; Petry, P.; Reis, R.E. 2011. Major biogeographic and phylogenetic patterns. In: Albert, J.A.; Reis, R.E. (Eds.). *Historical Biogeography of Neotropical fishes*. University of California press, Berkeley. p. 21–57.
- Barthem, R.B.; Goulding, M. 1997. *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá, MCT - CNPq, IPAAM. Brasília, Brasil. 140p.
- Barthem, R.B. 1990. *Ecologia e Pesca da Piramutaba (*Brachyplatystoma vailantii*)*. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 268 p.
- Batista, J.S.; Formiga, K.; Farias, I.P.; Alves-Gomes, J.A. 2005. Variabilidade genética da dourada e da piramutaba na bacia amazônica. In: Fabr , N.N.; Barthem, R.B. *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo. Solimões-Amazonas*. IBAMA, Pr V rzea, Cole o de Documentos Técnicos, Manaus, p. 15-19.
- CHROMAS VERSÃO 2.4.1 (www.technelysium.com.au/chromas.html).
- 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.
- Formiga-Aquino, K. 2004. *Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estu rio-Amazonas-Solimões*. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus, Amazonas, 75p.
- Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E. 2003. *The Smithsonian atlas of the Amazon*. Smithsonian Books, Washington D.C. 253 pp
- Hall, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acid. Res.*, 27: 95-98.
- Huergo, G.P.C.M.; Filgueiras-Souza, R.J.; Batista, J.S.; Formiga-Aquino, K.F.; Alves-Gomes, J.A. 2011. Molecular genetics as a tool for fisheries management in the Brazilian Amazon: Pira ba (*Brachyplatystoma filamentosum* and *Brachyplatystoma capapretum*) (Siluriformes: Pimelodidae) in white-water rivers. *Panamjas*, 6(4): 280-289.
- IBAMA, 1999. V Reunião do grupo permanente de estudos sobre a piramutaba: realizada em Belém de 26 a 29 de agosto de 1997/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais renováveis, Centro de pesquisa e Extensão Pesqueira do Norte do Brasil. Ed. IBAMA, Brasília, 92p.
- Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the world*. 4rd edition edn. John Wiley & Sons, Inc., New York, 24p.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor, NY.
- Sanyo. 1998. *The fishery resources study of the Amazon and Tocantins River Mouth Areas in the Federative Republic of Brazil*. Sanyo Techno Marine. Inc. 332 p.
- Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Ort , G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407–417.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*.