

## EXISTE FLUXO GÊNICO DE *Brachyplatystoma rousseauxii* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE) ENTRE A BACIA AMAZÔNICA E A DO ORINOCO?

Ricardo Cordeiro LYRA JÚNIOR<sup>1</sup>  
Jacqueline da Silva BATISTA<sup>2</sup>  
Kyara Martins FORMIGA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Orientador CBIO/INPA; <sup>3</sup>Co-Orientador

### INTRODUÇÃO

A dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) é um grande bagre migrador cuja área de distribuição envolve sete países amazônicos, sendo eles: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela. Possui como suas principais características morfológicas: grande porte (maior tamanho conhecido: 192 cm) cabeça prateada e achatada, corpo dourado e presença de barbilhões maxilares curtos (Barthem e Goulding 1997). Segundo Ferreira *et al.* (1998), essa espécie se diferencia das outras do gênero *Brachyplatystoma* pelo tamanho dos barbilhões e pela maxila e mandíbula que são de dimensões iguais. Na Colômbia, a dourada é um dos bagres migradores de maior comercialização nos mercados locais durante o ano todo, sendo capturadas as maiores classes de tamanho da espécie (Barthem e Goulding 1997; 2007).

Possuindo ampla distribuição na bacia Amazônica, a dourada é encontrada desde as águas de alta salinidade na região estuarina até as cabeceiras dos tributários do rio Ucayali/Amazonas/Solimões, especialmente os de águas brancas como os rios Madeira, Purus e Juruá, ambos da margem direita, e os rios Napo, Japurá/Caquetá, Içá/Putumayo e Branco da margem esquerda (Barthem e Goulding 1997; Barthem e Goulding 2007). É encontrada também em tributários do rio Negro, rio Tocantins e na Bacia do Orinoco (Garcia 1995) e nos rios da Guiana Francesa.

*B. rousseauxii* realiza grandes migrações a fim de completar o seu ciclo de vida. Essa migração é conhecida como a maior para peixes de água doce (Barthem e Goulding 1997; Barthem e Goulding 2007; Batista 2010). Os autores sugerem que essa espécie compõe um único estoque pesqueiro com áreas distintas de criação, alimentação e reprodução (Batista 2010).

Uma das razões em se usar o DNA mitocondrial (DNAMt) em estudos populacionais deve-se a sua alta taxa de mutação, estimada entre 5 a 10 vezes maior ( $5,7 \times 10^{-8}$  substituição/sítio/ano) do que a de genes codificadores de proteínas do DNA nuclear (Brown *et al.* 1982). Um dos fragmentos de DNA mais utilizados desse genoma em estudos populacionais é a região controle. Este fragmento é a região não codificadora do genoma mitocondrial (Aquadro e Greenberg 1983). A dourada possui essa região nucleotídica com 911 pares de bases (pb) (Batista 2010).

Visto que a dourada é uma espécie de grande importância econômica e ecológica, este bagre pode estar ameaçado pelos projetos hidrelétricos e a exploração pesqueira. Deste modo é preciso encontrar formas de manejo e conservação desta espécie. Considerando o aspecto migratório da dourada, este trabalho procura verificar se há fluxo gênico entre a bacia Amazônica e a bacia do Orinoco, bem como esclarecer se as cachoeiras do canal do Cassiquiare, que liga a bacia do Orinoco com a bacia Amazônica, atuam como barreiras ao seu fluxo gênico.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas amostras de DNA genômico de 34 indivíduos de *B. rousseauxii* disponíveis na Coleção de Tecidos de Genética Animal da UFAM de três localidades da Bacia do Orinoco. As amostras foram coletadas em desembarques pesqueiros da referida bacia em regiões na Colômbia (Puerto Carreño, Puerto López, Guaviare). Foi amplificada a região controle do DNA mitocondrial desses indivíduos, fragmento com média de 911 pb. Foram utilizados os seguintes reagentes: *primers* descritos no protocolo de Batista (2010) FTTP 5µM (Batista, 2010) (0,5µL) e F12R 5µM (Sivasundar *et al.*, 2001) (0,5µL), dNTPs 1mM (2,5µL), Tampão 10X (1,5µL), Taq 5U/µL (0,2µL), Água Milli-Q (6,6µL) e Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 25 mM (1,2µL).

O produto de PCR após ser corado com GelRed, foi verificado em gel de agarose 1% e comparado com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen), submetido a eletroforese horizontal, 90 V por 45 min. A purificação do produto de PCR foi realizada de acordo com o protocolo de Polietilenoglicol 8000 e etanol (Paithankar e Prasad 1991) o material não incorporado na PCR, como *primers*, dNTPs, entre outros são descartados.

A reação de precipitação e sequenciamento seguiram as recomendações sugeridas pelo fabricante. Em seguida, a reação foi eletroinjetada 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.

As sequências nucleotídicas dos 34 indivíduos de *B. rousseauxii* da bacia do Orinoco foram conferidas, editadas e compiladas com os programas Chromas 2.4.3 (*Technelysium Pty Ltd*) e BIOEDIT 7.2.5 (Hall 1999). Foram adicionadas à

matriz de dados a sequência nucleotídica de 34 indivíduos de dourada coletadas em quatro localidades da bacia Amazônica de Batista (2010), que foram agrupados para designar a bacia brasileira. Após edição e alinhamento no programa Clustal W 1.4 (Thompson *et al.* 1994) implementado no programa BioEdit 7.2.5 (Hall 1999). Foram obtidas a matriz final com 912 pb (pares de bases) para cada um dos indivíduos de *B. rousseauxii*, sendo que foi necessário a inserção de um “gap”, representando um evento mutacional de inserção ou deleção na base de dados. O programa PGDSPIDER 1.0.1.5 (Lischer e Excoffier 2012) foi usado para converter as matrizes para os diferentes tipos de arquivos de entrada e assim serem usadas nos programas posteriormente. Com o auxílio dos programas MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) e ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) foram computados os seguintes índices de diversidade molecular das populações **H**, número de haplótipos; **S**, número de sítios polimórficos; **ETA**, número total de mutações; **HD**, diversidade haplotípica; **Pi**, diversidade nucleotídica; **K**, média das diferenças nucleotídicas par a par, **Tajima's D**, teste de neutralidade seletiva D de Tajima (Tajima 1989) e **Fs de Fu**, teste de neutralidade seletiva Fs de Fu (Fu 1997). Diferenciação genética populacional foi testada por meio da AMOVA (Análise de variância molecular) e o fluxo gênico, baseado nos números de migrantes por geração (Nm), também foram estimados com o auxílio do programa ARLEQUIN.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontram-se os resultados obtidos para os índices de diversidade molecular calculados para a dourada amostrada nas duas bacias. O número estimado de migrantes fêmeas por geração (**Nm**) foi de menos de um indivíduo ( $Nm=0,4171\pm$ ).

Tabela 1. Valores das análises de polimorfismo de DNA das sequências da região controle de *B. rousseauxii*. O desvio padrão se encontra abaixo dos números. N: número de sequências; H: número de haplótipos; S: número de sítios polimórficos; ETA: número total de mutações; HD: diversidade haplotípica; Pi: diversidade nucleotídica; K: média das diferenças nucleotídicas par a par; *Tajima's D*: teste de neutralidade seletiva D de Tajima e Fs de Fu: teste de neutralidade seletiva Fs de Fu.

Localidade	N	H	S	ETA	HD	Pi	K	Tajima's D	Fs de Fu
Bacia do Orinoco	34	28	41	42	0,82	0,0087 3,776	7,923 3,776	-0,835	-24,933
Bacia amazônica	34	26	44	44	0,76	0,8821 3,826	8,035 3,826	-0,919	-24,917

Os dados usados na rede de haplótipos (Figura 1) foram obtidos pelo modelo de Tamura-Nei, a distância par a par para a matriz dos 54 haplótipos de *B. rousseauxii*, a distância genética média entre as bacias foi de 2%, sendo que a média calculada para cada bacia foi de 1%, podemos verificar que há um fluxo gênico restrito entre as bacias, pois há alguns haplótipos da bacia do Orinoco mais próximos geneticamente dos haplótipos da bacia Amazônica brasileira do que os da sua própria bacia.

Os resultados do teste de neutralidade D de Tajima para as duas populações amostradas apontam para um equilíbrio em relação ao DNA mitocondrial das localidades estudadas, fato reforçado pelos valores obtidos para o teste de neutralidade Fs de Fu, que também indicam que há evidência de expansão populacional.

Com a AMOVA, foi verificado como a diversidade genética está distribuída dentro e entre as localidades. Os dados foram compilados na Tabela 2, que demonstram que há diferenciação genética significativa entre as bacias Amazônica brasileira e do Orinoco, ou seja, trata-se de duas populações geneticamente distintas.

Tabela 2. Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) interpopulacional e intrapopulacional. Va= variância de cada população; Vb= variância entre as populações; Vt= variância total; %= porcentagem de variância; Fst= índice de fixação.

Tipos de variantes	Tipos de componentes	%	Fst
Interpopulacional	4,78274 Va	54,519	0,5452
Intrapopulacional	3,9875 Vb	45,48	
Total	8,77249 Vt		

Os padrões encontrados foram comparados com os resultados de Batista (2010), no qual foram utilizados marcadores microssatélites e região controle do DNA mitocondrial, pois as condições do desenvolvimento do atual trabalho foram equivalentes à mesma. Porém, os resultados foram diferentes, uma vez que no estudo de Batista (2010) não houve diferenciação genética relevante entre os indivíduos de *B. rousseauxii* das localidades da bacia amazônica peruana e brasileira e que eles compunham um único estoque pesqueiro.

No trabalho de Farias *et al.* (2010), no qual também foi usada a região controle do DNA mitocondrial, foi verificado que as cachoeiras do rio Madeira não são uma forte barreira ao fluxo gênico para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e que o mesmo constitui um único estoque pesqueiro entre o rio Madeira e a sub-bacia boliviana.

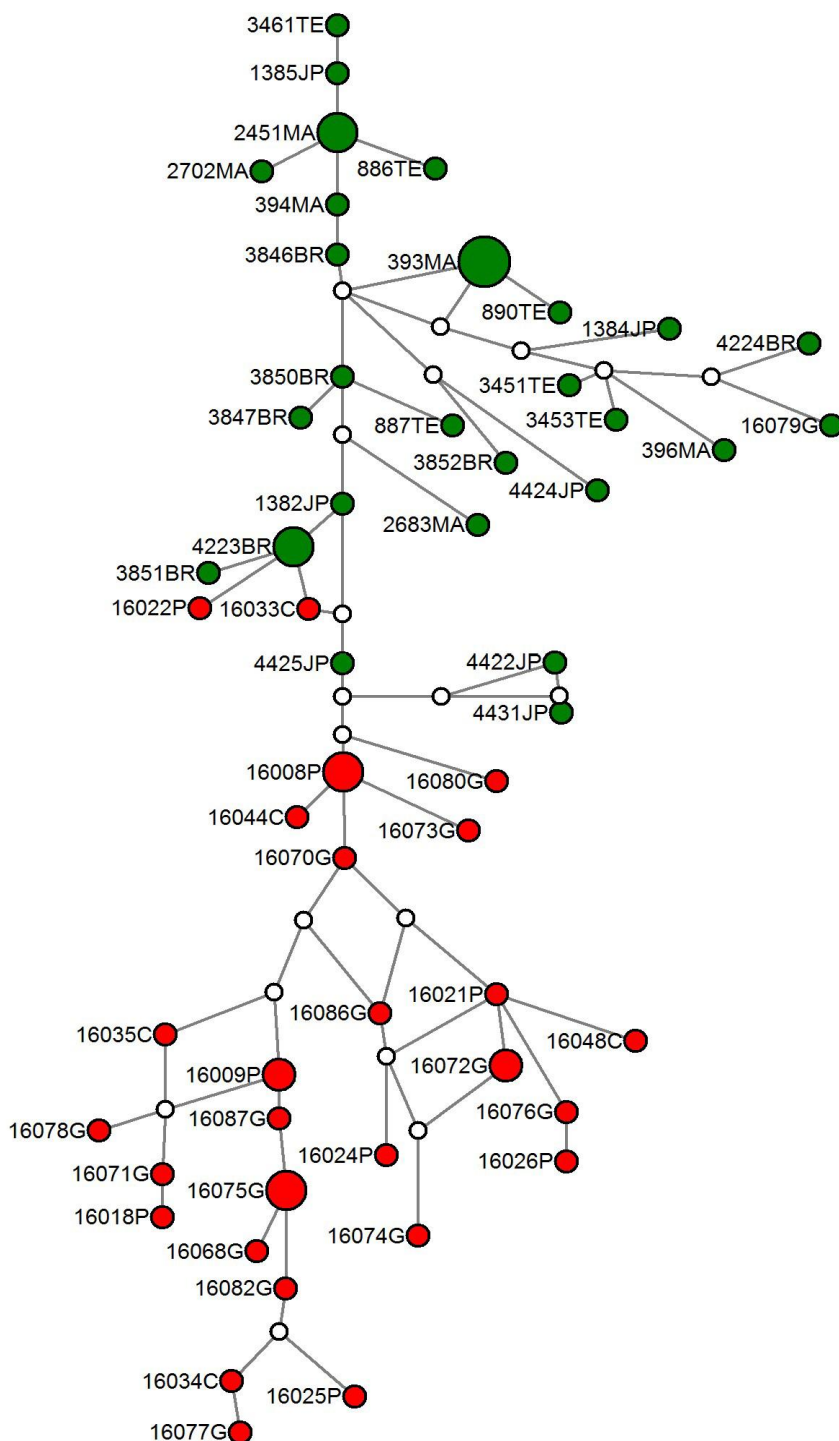


Figura 1: Rede de haplótipos de *Brachyplatystoma rousseauxii*. Bacia Amazônica brasileira, BR: rio Branco, TE: Tefé, JP: rio Japurá, MA: Manaus. Bacia do Orinoco, C: Puerto Carreño, G: San José del Guaviare, P: Puerto López, sendo a bacia Amazônica brasileira representada pela cor verde e a bacia do Orinoco em vermelho.

## CONCLUSÃO

Com as análises feitas a partir das sequências nucleotídicas geradas no atual trabalho descobriu-se, que as populações de dourada das bacias brasileiras (amazônica) e colombianas (orinoqueana) são diferenciadas geneticamente com baixos níveis de fluxo gênico. Dessa forma o canal do Cassiquiare pode ser uma barreira ao fluxo gênico da espécie entre as duas bacias. Sugere-se que a dourada seja manejada de forma diferenciada em cada bacia por se tratar de dois estoques genéticos distintos.

## REFERÊNCIAS

- Awise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*, 312: 325-342.
- Aquadro, C.F.; Greenberg, B.D. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103: 287-312.
- 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.; Goulding, M. 2007. *An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries*. Gráfica Biblos, Lima. Botanical Garden Press. Missouri. 241 pp.
- Batista, J.S. 2010. *Caracterização genética da dourada - Brachyplatystoma rousseauxii, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microsatélites: subsídios para conservação e manejo*. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus-AM, 148 pp.
- Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A.; Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 15.
- 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.; Donato, J.C.; Alonso, J.C. 2000. *Bagres de la Amazonia Colombiana: Um Recurso sin Fronteiras*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Bogotá.
- Farias, Izeni Pires ; Torrico, Juan Pablo ; García-Dávila, Carmen ; Santos, Maria da Conceição Freitas ; HRBEK, Tomas ; Renno, J-F. 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 1129-1135.
- Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J.A.S.; Santos, G.M. 1998. *Peixes comerciais do médio Amazonas Região de Santarém - PA*. Brasília.
- Garcia, M. 1995. *Aspectos ecológicos dos peixes das águas abertas de um lago no Arquipélago das anavilhanas, Rio Negro, AM*. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus.
- Hall, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Res.*, 41: 95-98.
- Lischer, H.E.L. Excoffier, L. 2012. PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28: 298-299.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes*, 2: 1-38.
- Paithankar, K. R. Prasad, K. S. N. 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research*, 19(6): 1346.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Ortí, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407-417.
- Tajima, F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*.