



## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *CICHLA* (PERCIFORMES: CICHLIDAE) DAS BACIAS AMAZÔNICA E DO RIO PARANÁ, ATRAVÉS DO MARCADOR MOLECULAR DNAr 5S

Viviane Fátima de Oliveira<sup>1</sup>; Alessandra Valéria de Oliveira<sup>2</sup>; Paula Garcia Martin<sup>3</sup>; Alberto José Prioli<sup>4</sup>; Sônia Maria A. P. Prioli<sup>4</sup>

**RESUMO:** O gene DNAr 5S é informativo e possui altas taxas de conservação ao longo do genoma dos eucariotos, possuindo características únicas que são hereditárias. Estudos moleculares do gene DNAr 5S vêm sendo realizados com diversos grupos, inclusive em algumas espécies de peixes, com o intuito de solucionar problemas de relações filogenéticas, extensão de isolamento sexual, padrão de ancestralidade e diversidade genética entre grupos de populações naturais. Espécies do gênero *Cichla*, introduzidas na bacia do alto rio Paraná, apresentam polimorfismos genéticos comprovados por análise de RAPD e SPAR. Essas espécies estão se inter cruzando e formando híbridos viáveis, com maior variabilidade genética. O objetivo desse trabalho foi padronizar a metodologia de amplificação de regiões não-transcritas da família multigênica rDNA 5S de *Cichla* e obter marcadores específicos para as espécies parentais e que pudessem também ser identificados nos híbridos. Foram analisados 65 espécimes de *Cichla*. Os resultados demonstram que foi padronizada a metodologia de amplificação das regiões não transcritas da família multigênica DNAr 5S. Apesar de não terem sido obtidos marcadores moleculares que pudessem ser úteis na identificação de híbridos, foram obtidos marcadores moleculares genéticos DNAr 5S espécie-específicos para *Cichla temensis*, que podem ser utilizados para identificação de exemplares dessa espécie e também marcadores populacionais, que podem ser úteis para estudos de variabilidade genética populacional.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cichla*, DNAr 5S, Introdução de espécies.

### 1 INTRODUÇÃO

A introdução de espécies em ecossistemas aquáticos tem sido documentada em todo o mundo, mas o impacto da presença destas, nos novos ambientes, ainda não é totalmente conhecido. A introdução de espécies e a perda dos habitats naturais são os maiores responsáveis pela extinção de espécies animais no último século. Espécies exóticas podem afetar espécies indígenas pela competição por recursos, predação sobre a fauna nativa, introdução de novos patógenos, hibridação com espécies nativas ou alterando significativamente o habitat, podendo atuar simultaneamente com a degradação ambiental (ELVIRA e ALMODÓVAR, 2001). Como proposto por Agostinho et al. (2005),

<sup>1</sup> Graduada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá-PR. [vikinha\\_bio@yahoo.com.br](mailto:vikinha_bio@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Docente do CESUMAR. Departamento de Ciências Biológicas. Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá-PR. [alessoli@cesumar.br](mailto:alessoli@cesumar.br)

<sup>3</sup> Acadêmica do curso de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas. Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá-PR. [paulagarcia\\_22@hotmail.com](mailto:paulagarcia_22@hotmail.com)

<sup>4</sup> Docentes da Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia Celular e Genética. Maringá-PR. [ajprioli@nupelia.uem.br](mailto:ajprioli@nupelia.uem.br); [priolis@nupelia.uem.br](mailto:priolis@nupelia.uem.br)

Fonte financiadora da pesquisa: Programa de Bolsas de Iniciação Científica do CESUMAR – PROBIC.

em águas brasileiras, a introdução de espécies de peixes tem sido reconhecida com uma das principais causas diretas da perda da biodiversidade.

O sistema do alto rio Paraná pertence à região ictiofaunística do Paraná e têm recebido, nos últimos anos, um grande número de espécies introduzidas, dentre elas os piscívoros amazônicos que têm obtido grande sucesso de estabelecimento na região (AGOSTINHO et al., 2004, 2005). *Cichla kelberi* (KULLANDER e FERREIRA, 2006) foi uma das espécies introduzidas e está entre as mais abundantes na região (AGOSTINHO et al., 2004). Anteriormente ela era identificada na bacia do alto rio Paraná como *Cichla cf. monoculus* Spix and Agassiz, 1831. Outra espécie do mesmo gênero introduzida da bacia Araguaia-Tocantins foi *Cichla piquiti* (KULLANDER e FERREIRA, 2006), previamente identificada como *Cichla* sp. Atualmente estas populações de *Cichla* estão se estabelecendo em várias áreas da bacia, incluindo o rio Paraná, reservatórios e tributários. Oliveira et al. (2006), estudando populações de *Cichla*, através de marcadores nucleares e mitocondriais, observou que populações introduzidas de *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* da região estavam cruzando e formando híbridos viáveis, resultando em um processo avançado de homogeneização genética.

Além de representar um sério mecanismo de extinção de espécies e de ameaça a integridade de *pools* gênicos únicos (PERRY et al., 2002), a hibridização pode levar à origem de linhagens bem mais adaptadas, mais vigorosas e também mais agressivas.

Dessa forma, os estudos genéticos de populações de *Cichla* (tucunaré) introduzidas na bacia do rio Paraná são de grande valia do ponto de vista ecológico por fornecerem dados que poderão auxiliar para uma melhor caracterização taxonômica e vir a orientar práticas de manejo e estudos de ecologia mais adequados das espécies do gênero e das populações híbridas.

Os recentes avanços das técnicas de biologia molecular têm permitido estudos sobre estruturação genética de populações, análise de polimorfismos e identificação de híbridos naturais. Dentre essas técnicas, há o DNAr 5S, que consiste de seqüências que codificam o RNAr 5S e são separados umas das outras por espaçadores não transcritos – NTS (MARTINS e WASKO, 2004). As unidades do DNAr 5S, apresentam-se repetidas e formam arranjos em tandem no genoma.

O uso das repetições do DNAr 5S apresenta algumas vantagens sobre os demais marcadores disponíveis, pois a presença de seqüências codificantes, conservadas, flanqueando regiões variáveis dos NTSs, favorece a aplicação da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), e conseqüentemente, o isolamento dos NTSs das mais diferentes espécies sem um conhecimento prévio do genoma da espécie em questão (MARTINS e WASKO, 2004).

O objetivo deste trabalho foi obter, através da técnica DNAr 5S, marcadores moleculares espécie-específicos para populações de *Cichla* e identificar a presença desses marcadores nos híbridos naturais da região da planície de inundação do alto rio Paraná.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares de espécies do gênero *Cichla* foram coletados de diversos pontos da bacia do alto rio Paraná, incluindo a planície de inundação do alto rio Paraná, o reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu, reservatório da usina hidrelétrica de Capivara – rio Paranapanema e rio Tietê. Além desses locais, foram coletados exemplares da região norte do país (bacia amazônica), resultando um total de 65 indivíduos de sete populações. Quatro espécies foram previamente identificadas como *Cichla kelberi*, *Cichla piquiti*, *Cichla cf. monoculus* e *Cichla temensis*, sendo que os demais espécimes foram considerados híbridos de acordo com os trabalhos realizados com RAPD por Oliveira et al. (2006).

Foram retiradas de cada espécime coletado, amostras de tecido muscular, posteriormente fixadas em álcool etílico comercial e estocadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio. Para a quantificação da concentração do DNA presente em cada amostra, foi utilizada técnica de eletroforese em gel de agarose 1%, por meio de comparação com DNA de fago  $\lambda$  de concentração conhecida.

Depois de quantificadas as amostras de DNA foram diluídas para 5 ng cada uma, para a aplicação da técnica de biologia molecular conhecida como DNA ribossômico 5S. O espaçador do DNAr 5S foi amplificado com os *primers* 5S1 5S2 descritos por Pendás et al. (1994).

Após realizadas as amplificações, todas as amostras foram fracionadas em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídio, visualizadas em um transluminador sob luz UV e fotografadas. O tamanho de cada fragmento obtido foi determinado através da comparação com as bandas de um marcador padrão (*Ladder* 100 pb - Invitrogen).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região não transcrita do gene DNAr 5S foi amplificada via PCR, a partir de exemplares de *Cichla kelberi*, *Cichla piquiti*, *Cichla monoculus*, *Cichla temensis* e prováveis híbridos da bacia do alto rio Paraná e da bacia Amazônica, resultando num total de 65 indivíduos.

O número de bandas nítidas e reproduzíveis obtidas por este marcador molecular, em cada espécime, variou de um a quatro, e o tamanho dos fragmentos amplificados ficou entre 410 a 810 pares de bases. Todos os indivíduos analisados apresentaram uma banda com tamanho de 650 pb, sendo este fragmento um marcador do gênero *Cichla*.

Neste estudo foram verificados polimorfismos em relação ao tamanho dos produtos amplificados em diferentes populações e espécies de *Cichla*. Com esta técnica, foi possível obter bandas espécie-específicas que diferiram pelo tamanho em pares de bases. Todos os espécimes de *Cichla cf. monoculus* e *C. kelberi* da bacia Amazônica e da bacia do rio Paraná apresentaram os fragmentos de 650 pb e 410 pb, contudo, dois espécimes provenientes de Tocantins, apresentaram quatro bandas; além dos fragmentos de 650 pb e 410 pb, eles apresentaram fragmentos de 450 e 810 pb (Figura 1).

Os três espécimes de Mato Grosso da espécie *C. temensis* apresentaram três bandas com tamanhos de 650 pb, 430 pb e 410 pb (Figura 1). A banda de 430 pb constitui um marcador molecular da espécie.

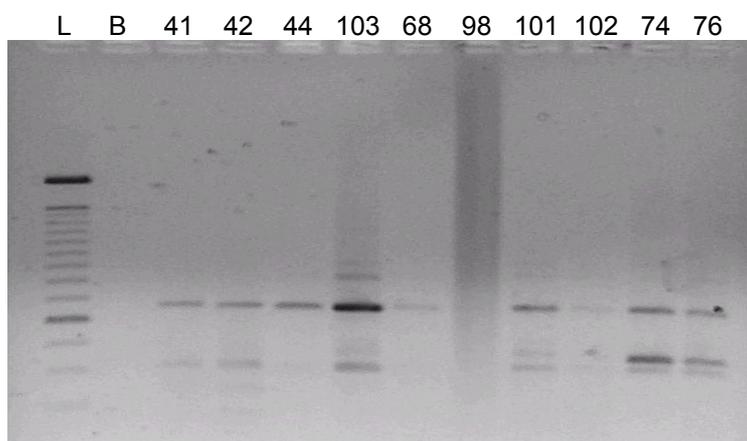


Figura 1. Fragmentos de DNA amplificados com o *primer* 5S1 e 5S2, gel de agarose 1,4%. L = *ladder* 100 pb; B = controle negativo da reação. Espécimes 41, 42 e 44 - *Cichla monoculus* (reservatório de Capivara - rio Paranapanema); espécime 103 - *Cichla kelberi* (bacia amazônica - Tocantins); espécime 68 - *Cichla piquiti* (Planície de Inundação do alto rio Paraná); espécimes 98,

101 e 102 - *Cichla piquiti* (bacia Amazônica – Tocantins); espécimes 74 e 76 - *Cichla temensis* (Mato Grosso).

Três espécimes de *Cichla piquiti* da planície de inundação do alto rio Paraná e sete espécimes de Tocantins apresentaram duas bandas de 650 pb e 410 pb. Seis indivíduos desta mesma espécie do reservatório de Itaipu e sete indivíduos de Promissão do rio Tietê apresentaram somente a banda de 650 pb. Apenas um espécime da região de Tocantins apresentou um fragmento de 450 pb, compartilhado por dois espécimes do reservatório de Itaipu. Estes espécimes de Itaipu também apresentaram um fragmento exclusivo de 500 pb.

Alguns prováveis híbridos da planície de inundação do alto rio Paraná e reservatório de Itaipu apresentaram duas bandas de tamanhos de 650 pb e 410 pb, outros espécimes apresentaram quatro bandas com tamanhos de 650 pb, 500 pb, 450pb e 410 pb.

Diversos estudos em genética e citogenética de peixes revelam que o gene DNAr 5S apresenta uma maior diversidade de cópias e arranjos no genoma, permitindo a distinção de espécies (ALVES, 2005). Pendas et al. (1995) estudando Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e Truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) encontraram diferentes tamanhos de fragmentos de DNAr 5S amplificados para as diferentes espécies analisadas. Este estudo permitiu a obtenção de fragmentos úteis para a identificação das espécies em questão. Em estudos realizados com tilápias *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus*, *Tilapia rendalli* e o híbrido *O. urolepis*, Alves (2005) obteve fragmentos espécie-específicos que puderam ser utilizados para a discriminação de espécies e identificação de híbridos.

No presente estudo foi obtido um marcador molecular espécie-específico de 430 pb para as populações de *Cichla temensis*. Esse fragmento pode ser utilizado para a identificação de indivíduos dessa espécie e de híbridos naturais, uma vez que há registros de hibridização envolvendo a espécie em regiões nativas (TEIXEIRA e OLIVEIRA, 2005).

Apesar da presença de bandas exclusivas em algumas populações como a população de Tocantins (*Cichla kelberi*, fragmento de 810pb), Mato Grosso (*Cichla temensis*, fragmento de 430 pb) e Itaipu/Planície de Inundação (*Cichla piquiti* e híbridos, fragmento de 500 pb), não foram obtidas neste estudo, bandas espécie-específicas para *C. kelberi* e *Cichla piquiti*.

#### 4 CONCLUSÃO

O marcador molecular DNAr 5S não se mostrou útil na identificação de híbridos naturais entre essas duas espécies na planície de inundação do alto rio Paraná. A possibilidade de identificação de eventos de hibridização na região deve ser investigada com outras metodologias.

Contudo, esse marcador molecular pode ser utilizado para identificação de espécimes de *Cichla temensis*, ou em análise de variabilidade genética populacional.

#### REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A.A.; BINI, L.M.; GOMES, L.C.; JULIO JR., H.F.; PAVANELLI, C.S.; AGOSTINHO, C.A. Fish Assemblage. In: THOMAZ, S.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N. S. (Ed.). **The Upper Parana River and its Floodplain: Physical Aspects, Ecology and Conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 223-246.

AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology**, v. 19, p. 646-652, 2005.

ALVES, F. **Análise da Potencialidade das Sequências de DNA ribossômico 5S como marcadores moleculares para espécies de tilápias (Perciformes, Cichlidade).**2005. Dissertação (Mestrado em Genética)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu , 2005.

ELVIRA, B.; ALMODÓVAR, A. Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning at the 21<sup>st</sup> century. **Journal of Fish Biology**, v.59, p.323-331, 2001.

KULLANDER, S.O.; FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyologic Exploration of Freshwaters**, v. 17, n. 4, p. 289-398, 2006.

MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. **Focus on Genome Research**, p.335-363, 2004.

OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; BIGNOTTO, T.S. JULIO JR, H.F.; CARRER, H.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, L.M. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 260-277, 2006.

PENDÁS, A.M.; MÓRAN, P.; MARTÍNEZ, J.L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. **Mol. Ecol.**, v. 4, p. 275-276, 1995.

PERRY, W.L.; LODGE, D.M.; FEDER, J.L. Importance of hybridization between indigenous and non-indigenous freshwater species: an overlooked threat to North American biodiversity. **Syst. Biol.**, v. 51, n. 2, p. 255-275, 2002.

TEIXEIRA, A.S.; OLIVEIRA, S.S. Evidence for a natural hybrid of peacock bass (*Cichla cf. monoculus* vs. *Cichla temensis*) based on esterase electrophoretic patterns. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 74-83, 2005.