



RELAÇÕES GENÉTICAS E FILOGENÉTICAS DE PIRANHAS BASEADAS EM MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIAIS

1 - Thais Souto Bignotto

2 - Renata de Souza Panarari Antunes; 1 - Vivian Nunes Gomes; Thiago Cintra Maniglia; Talge Aiex Boni; Sônia Maria Alves Pinto Prioli; Alberto José Prioli

¹Departamento de Biologia Celular e Genética, Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia), Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Jd Universitário, Maringá/PR.

²Departamento de Biologia, Instituto Federal do Paraná campus Palmas - PR 280, Trevo da Codapar s/n, Palmas/PR. thabignotto@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A família Serrasalminidae (ordem Characiformes) inclui peixes de água doce neotropicais conhecidos como piranhas, pacus e tambaquis. As piranhas constituem o grupo mais especioso e englobam, tradicionalmente, quatro gêneros: *Serrasalmus* (28 espécies), *Pygocentrus* (quatro), *Pristobrycon* (cinco) e *Pygopristis* (uma). Apesar de sua relativa importância econômica e ecológica, a taxonomia e sistemática de piranhas são complicadas e relativamente pouco conhecidas. Estudos morfológicos e moleculares concordam com a hipótese de que as piranhas *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus*, juntamente com *Catoprion*, constituem uma unidade monofilética da família Serrasalminidae. Porém, as relações internas do grupo ainda não estão bem estabelecidas. Sugere-se que pelo menos *Serrasalmus* e *Pristobrycon*, sejam não monofiléticos (Freeman *et al.*, 2007).

A caracterização genética de comunidades aquáticas é útil para revelar diferenças genéticas intra e interespecíficas, produzindo informações relevantes sobre biodiversidade e história evolutiva das populações. Marcadores moleculares mitocondriais, como os genes citocromo b (*cytb*) e citocromo c oxidase subunidade I (*COI*), representam importante ferramenta para estudos de diversidade genética, de análises filogenéticas e do processo evolutivo em diversos grupos taxonômicos. Deste modo, este trabalho pretendeu contribuir na caracterização e esclarecimento das relações evolutivas de

espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*.

OBJETIVOS

Este trabalho objetivou esclarecer as relações genéticas e filogenéticas de oito espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, além de investigar a origem monofilética de *Serrasalmus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de piranhas foram coletados nas bacias do alto rio Paraná (*Serrasalmus maculatus* e *S. marginatus*), alto rio Paraguai (*S. maculatus*, *S. marginatus* e *Pygocentrus nattereri*), rio Tocantins (*S. maculatus*, *S. eigenmanni*, *S. rhombeus*, *Serrasalmus* sp. e *P. nattereri*) e rio São Francisco (*S. brandtii* e *P. piraya*). Amostras de tecido muscular foram fixadas em álcool etílico para extração do DNA total, conforme metodologia baseada em fenol/clorofórmio.

Os fragmentos do genoma mitocondrial foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se, para isso, os pares de *primers* H16498 e L14841 para amplificação do gene *cytb* e H7152 e L6448 - F1 para o gene *COI*. Após as amplificações, os fragmentos foram seqüenciados em plataforma *MegaBace* (Amersham), de acordo com instruções do fabricante.

As seqüências nucleotídicas, sob o formato de cromatograma, foram alinhadas e editadas com auxílio dos programas *Clustal W* e *BioEdit 7.0.1*. Os programas *Modeltest 3.7* e *PAUP 4.0b10* foram utilizados para seleção do melhor modelo evolutivo (o modelo escolhido como o melhor para o ajuste dos dados das regiões *cytb* e *COI* foi o HKY+G). Foram realizadas análises filogenéticas de *neighbor-joining*, máxima - verossimilhança e de inferência bayesiana a partir dos programas *PAUP 4.0b10*, *PhyML 3.0* e *MrBayes 3.0*, respectivamente. As árvores foram enraizadas pelo critério de grupos externos (*outgroups*). A matriz de distância p foi obtida no *Mega 4.0*.

RESULTADOS

As seqüências nucleotídicas dos genes mitocondriais *cytb* e *COI* foram eficientes em discriminar a maioria das espécies de piranhas analisadas. A única exceção foi para *Serrasalmus* sp., que apresentou haplótipos mitocondriais amplamente compartilhados com a população de *S. maculatus* do rio Tocantins, resultando no agrupamento dessas duas espécies em um único clado. A construção dos dendrogramas revelou ainda que indivíduos pertencentes a uma mesma espécie agruparam - se em um mesmo clado e que as espécies foram subdivididas em clados menores, de acordo com os locais de coleta. Os clados mais basais foram formados por *Pygocentrus nattereri* e *P. piraya*, que se revelaram como grupos irmãos das outras espécies de piranhas. Na parte superior dos dendrogramas, houve a formação de dois grandes grupos: o primeiro, constituído por *Serrasalmus maculatus*, *Serrasalmus* sp. e *S. brandtii* e o segundo, que incluiu os espécimes de *S. rhombeus* e *S. marginatus*. O posicionamento de *S. eigenmanni* nos dendrogramas, no entanto, foi controverso. Dependendo do gene analisado e das metodologias empregadas, a espécie foi alocada como irmã do clado formado por *S. rhombeus* e *S. marginatus*, ou como mais próxima do grupo constituído por *S. maculatus* e *S. brandtii*.

Pygocentrus nattereri, *Serrasalmus maculatus* e *S. rhombeus* foram as espécies que apresentaram maior variabilidade genética intra - específica.. Os valores de distância genética p detectados entre as populações de *P. nattereri* do rio Tocantins e do alto rio Paraguai foram de 3,1% (*cytb*) e 1,3% (*COI*). Esses valores correspondem a variações intra - específicas encontradas em populações isoladas geograficamente (Fink, 1993).

Já no caso de *S. maculatus*, a diferenciação entre as populações da bacia Paraná - Paraguai e do rio Tocantins foi bem maior, com valores de distância p que variaram de 3,7% a 3,9% (*cytb*) e 3,6% a 4,4% (*COI*). Essa diferenciação parece estar em patamares equivalentes a divergências interespecíficas, fortalecendo a hipótese de que *S. maculatus* compreende, na verdade, um complexo de espécies (Nakayama *et al.*, 2000). A construção dos dendrogramas revelou ainda que os exemplares de *S. rhombeus* do rio Tocantins foram divididos em dois clados menores. Os valores de distância genética que separaram esses dois grupos (1,9 e 1,7% para *cytb* e *COI*, respectivamente) foram equivalentes ao registrado entre *S. rhombeus* e *S. marginatus* (1,8 e 1,6% para *cytb* e *COI*, respectivamente). Assim, é possível que *S. rhombeus* também compreenda um complexo de espécies (Nakayama *et al.*, 2001).

CONCLUSÃO

Os resultados revelaram grande proximidade genética entre espécies dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. A maioria das análises corroborou a condição monofilética do gênero *Serrasalmus*, com exceção do dendrograma de máxima - verossimilhança obtido a partir das seqüências do gene *cytb*. Foram obtidas evidências de que três espécies de piranhas têm, cada uma, pelo menos duas ou três linhagens mitocondriais divergentes que, atualmente, ocorrem em simpatria (*S. rhombeus*) ou em alopatría (*S. maculatus* e *P. nattereri*).

REFERÊNCIAS

- Fink, W.L. Revision of the piranha genus *Pygocentrus* (Teleostei, Characiformes). *Copeia*, 665 - 687, 1993.
- toski, M.; Jelks, H.L.; Collins, T.M. Molecular systematic of Serrasalmidae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. *Zootaxa*, 1484:1 - 38, 2007.
- Nakayama, C.M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. Ocorrência de dois citótipos em *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characiformes, Serrasalmidae) da região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. *Acta Amaz.*, 30(1): 149 - 154, 2000.
- Nakayama, C.M.; Jegú, M.; Porto, J.I.R.; Feldberg, E. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. *Copeia*, 3:866 - 869, 2001.
- Freeman, B.; Nico, L.G.; Osen