

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**CRISTIANE YURI HONNA**

**DIVERSIDADE GÊNICA NO GÊNERO  
*Astyanax* (TELEOSTEI : CHARACIDAE)  
ATRAVÉS DA ANÁLISE DE PCR-RFLP DE  
DNA MITOCONDRIAL**



Rio Claro  
2010

**CRISTIANE YURI HONNA**

**DIVERSIDADE GÊNICA NO GÊNERO *Astyanax* (TELEOSTEI :  
CHARACIDAE) ATRAVÉS DA ANÁLISE DE PCR-RFLP DE DNA  
MITOCONDRIAL**

Orientador: Dr.ANDERSON LUIS ALVES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção dos graus de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2010

574.5263 Honna, Cristiane Yuri  
H773d           Diversidade gênica no gênero Astyanax (Teleostei :  
Characidae) através da análise de PCR-RFLP de DNA  
mitocondrial / Cristiane Yuri Honna. - Rio Claro : [s.n.], 2010  
39 f. : il., figs., fots., mapas

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e  
bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual  
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Anderson Luis Alves

1. Ecologia aquática. 2. Peixes neotropicais. 3. Bacia do  
Alto rio Paraná. 4. Enzimas de restrição. I. Título.

*Dedico esse trabalho a minha família,  
e, a tudo e a todos que, direta ou  
indiretamente me ajudaram alcançar esse  
sonho e objetivo.*

## *Agradecimentos*

---

*Agradeço ao laboratório de genética de peixes (LGP) da Unesp de Rio Claro, pela oportunidade e por ter me dado condições de realizar este presente trabalho.*

*Agradeço também a todas as pessoas do laboratório (LGP) e todos os que o frequentam pelo apoio e companheirismo, pelos favores e também por me ensinarem quase tudo que precisei para poder concluir essa etapa da minha vida.*

*Agradeço ao meu orientador, Dr. Anderson L. Alves, por me aceitar como orientada, por toda a atenção e pela oportunidade em poder aumentar um pouco mais meus conhecimentos.*

*Agradeço aos meus amigos, novos e de velhos tempos, por todo o apoio, pelas travessuras, venturas e as lições de vida que sempre me ensinam.*

*Agradeço principalmente à minha família, Rosa, Masakatu, Cinthia, Priscila, pois sem ela eu nada seria na vida.*

*Agradeço a Deus ou o nome que preferir atribuir à essa grande força que nos protege, inspira e move, para que possamos nos aproximar cada vez mais dos nossos sonhos e objetivos.*

*E, enfim, agradeço a oportunidade que me foi dada, pelos conhecimentos obtidos e por toda a experiência que ganhei ao longo dessa graduação.*

# SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO .....	5
2. INTRODUÇÃO .....	6
2.1. Bacia do Alto Rio Paraná .....	7
2.2. O Gênero <i>Astyanax</i> .....	9
2.2.1. Ecologia do gênero <i>Astyanax</i> .....	10
2.2.2. Diversidade genética do gênero <i>Astyanax</i> .....	12
2.3. Técnicas moleculares de RFLP .....	12
2.4. DNA mitocondrial e o gene <i>citocromo b</i> .....	14
3. OBJETIVOS .....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
4.1. Materiais .....	18
4.2. Métodos .....	19
4.2.1. Extração de DNA .....	19
4.2.2. Amplificação de DNA .....	21
4.2.3. Análise de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (PCR-RFLP) .....	22
5. RESULTADOS .....	25
5.1. Extração de DNA e amplificação por PCR .....	25
5.2. Digestão com enzimas de restrição .....	26
6. DISCUSSÃO .....	30
7. CONCLUSÃO .....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35

## 1. RESUMO

O gênero *Astyanax* é um dos mais abundantes e diversificados da família Characidae (subfamília Tetragonopterinae), com mais de 100 espécies nominais, estando amplamente distribuído na bacia do Alto rio Paraná. Esse gênero é caracterizado pela similaridade quanto à forma do corpo, além da alta variabilidade citogenética intra e interpopulações, sendo comum a ocorrência de espécies crípticas ou complexos de espécies. Devido à escassez de dados sobre genética molecular referentes a esse gênero, e a dificuldade na identificação taxonômica, faz-se necessário um estudo utilizando marcadores moleculares que visem desenvolver métodos rápidos e eficientes para caracterização de espécies de *Astyanax* com base em análises de DNA. Em vista dessa necessidade, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da técnica de PCR-RFLP do gene mitocondrial *Citocromo b* na identificação e caracterização da variabilidade genética de cinco espécies do gênero *Astyanax* que ocorrem na bacia do Alto rio Paraná. O mtDNA das espécies alvo foi totalmente amplificado, num total de cerca de 1140 pares de bases (pb). As análises foram obtidas através dos haplótipos gerados com a digestão por três enzimas de restrição que clivam estes genes, sendo estas *ALUI*, *BAMHI*, e *HPAII*. Foram analisadas 2 populações de *Astyanax paranae*, *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. bockmanni*, e uma população de *A. biotae*, com amostragens variando entre 5 e 10 indivíduos de cada população. Como grupo externo foram analisadas duas populações de *Astyanax ribeirae* da bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape. Ao final do trabalho foi possível a identificação de 4 das 6 espécies analisadas, sendo que as espécies mais divergentes são *A. altiparanae* e *A. ribeirae*, as espécies *A. paranae* + *A. bockmanni* e *A. fasciatus* + *A. ribeirae* são as mais fortemente relacionadas entre si. Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam que a técnica de PCR-RFLP em análises do gene mitocondrial *cyt b* é uma técnica rápida e confiável para análises inter e intraespecíficas de indivíduos do gênero *Astyanax*.

## 2. Introdução

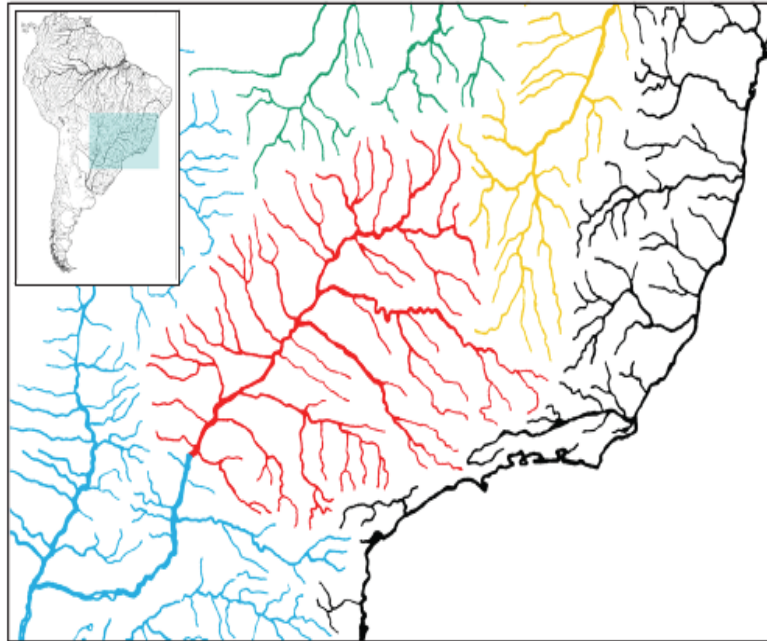
Apesar dos esforços da comunidade científica mundial, muito pouco se sabe sobre os organismos vivos que compõem a biodiversidade mundial. Para se ter uma idéia, da estimativa de 12 a 30 milhões de organismos vivos existentes, há registro de apenas 1.8 milhões de espécies descritas, sendo que muitas destas foram descritas mais de uma vez (COX; MOORE, 2005, p. 46-49). Outro fato que colabora com o baixo nível de conhecimento sobre a biota mundial é a escassez de estudos em áreas com alto grau de biodiversidade, como é o caso das regiões tropicais (COX; MOORE, 2005, p. 46-49).

Do número total de organismos descritos, cerca de 45.000 (COX; MOORE, 2005, p. 46-49) a 54.711 (NELSON, 2006, p. 3) são vertebrados, dos quais, pouco mais de 27.734 (NELSON, 2006, p. 3) são peixes. Nos peixes, segundo Nelson (2006) são observados 515 famílias, cerca de 4.500 gêneros e cerca de 28.000 espécies, sendo que aproximadamente 12.000 (NELSON, 2006, p. 3) a 13.000 (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003) espécies são de água doce. Esse número pode aumentar ainda mais caso seja considerado o número de espécies anádromas ou que necessitem desse ambiente para seu desenvolvimento (cerca de 12.500 espécies segundo Nelson (2006, p. 3-5)).

As águas doces neotropicais apresentam um alto grau de diversidade, sendo que, segundo Reis, Kullander e Ferraris (2003) há cerca de 4.500 espécies de peixes nessas águas, número que pode chegar a mais 6.000 considerando as espécies conhecidas mas ainda sem descrição.

Na região neotropical, a América do Sul ocupa posição de destaque quanto a sua diversidade, como enfatizado por Langeani et al (2007) com especial atenção às regiões das bacias Amazônicas e do Paraná.

## 2.1. Bacia do Alto Rio Paraná



**Figura 1.** Mapa localizando o Sistema do Alto Rio Paraná (em azul) e bacias vizinhas (verde, amarelo, preto e azul). Modificado de Langeani et al (2007).

O sistema do Alto rio Paraná corresponde à porção da bacia do Rio Paraná situada a montante de Sete Quedas, região atualmente inundada pelo Reservatório de Itaipu, englobando diversas drenagens litorâneas e grandes tributários como os Rios Grande, Paranaíba, Tietê e Paranapanema, cujas cabeceiras se situam na porção sudeste do Escudo Cristalino Brasileiro (CASTRO et al, 2003; LANGEANI et al, 2007; TAVARES, 2007).

A drenagem do Alto Rio Paraná inclui o norte do Estado do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul, grande parte do Estado de São Paulo (a oeste da Serra do Mar), sul de Minas Gerais, sul de Goiás e uma pequena área do Paraguai em sua parte oriental, adjacente ao Mato Grosso do Sul, totalizando aproximadamente 900.000 km<sup>2</sup> (CASTRO et al, 2003). Nessa área são observados diversos fenômenos de captura de cabeceiras devido, principalmente, às intensas atividades tectônicas ocorridas desde o início do Terciário associadas ao complexo sistema de falhas presentes nesta área (CASTRO e al, 2003; TAVARES, 2007).

Castro et al (2003) em seu trabalho sobre a estrutura e composição da ictiofauna de riachos, enfatizaram a hipótese levantada por outros autores, os quais consideraram a região do Alto Rio Paraná com fortes evidências de corresponder a uma área de endemismo, pelo menos para alguns grupos de peixes, isso por causa do isolamento da ictiofauna dessa região, até pouco tempo, pelas Sete Quedas.

Em um estudo da ictiofauna na Região do Alto Rio Paraná, Langeani (2007) estimou que essa região detêm cerca de 38 famílias, 11 ordens e 310 espécies de peixes. Em relação à origem da fauna, cerca de 76% das espécies foram classificadas como autóctones, 21,6% como alóctones, e 2,3% como exóticas.

O tamanho médio das espécies encontradas na região do Alto Rio Paraná é cerca de 21,5 cm, sendo que a grande maioria (65%) é de pequeno porte, com até 20,8 cm (LANGEANI et al, 2007). Essas espécies de pequeno porte possuem pouco ou nenhum valor comercial e são grandes dependentes da vegetação ripária para alimentação, reprodução e abrigo; habitam cabeceiras hidrográficas associadas aos cursos de água da região e tem distribuição restrita (CASTRO; MENEZES, 1996). Aproximadamente 50% do total de espécies de água doce descritas da América do Sul correspondem a peixes de pequeno porte, com alto grau de endemismo (CASTRO et al, 2003).

Segundo Langeani et al (2007) o Alto Rio Paraná possui uma das ictiofaunas melhor conhecidas da América do Sul, porém a existência de cerca de 50 novas espécies a serem descritas para essa região demonstra o quanto ainda estamos longe do número real dessa diversidade. Cerca de 70% das sub-bacias de drenagem do Alto Rio Paraná ainda não foram explorados de forma satisfatória em termos científicos (CASTRO et al, 2003). Esse é um dado preocupante pois a área em questão é alvo de inúmeras ações antropomórficas como criações de pastagens e barragens, as quais modificam o ambiente natural e colocam em risco a diversidade da região (CASTRO et al, 2003; GALVES; SHIBATTA; JEREP, 2009).

Os ambientes de riachos tem um grande potencial no descobrimento de novas espécies, como enfatizado por Langeani et al (2007), uma vez que que 36 das 52 potenciais espécies novas referidas em seu estudo são desse tipo de ambiente.

Das espécies do Alto Rio Paraná, cerca de 80% são das ordens Siluriformes e Characiformes, sendo que a maior família (em número de espécies) foi a família Characidae, com 23% do total das espécies identificadas para essa região (LANGEANI et al, 2007).

## 2.2. O Gênero *Astyanax*

A ordem Characiformes se constitui por um agregado de espécies pouco conhecidas e com divergências morfológicas (NELSON, 2006, p. 149). É composta de 18 famílias, 270 gêneros e 1.674 espécies, todas exclusivamente de água doce (NELSON, 2006, p. 149). As relações filogenéticas entre os diversos organismos que compõe essa ordem ainda não estão completamente elucidadas, havendo a necessidade de mais estudos. Possui cerca de 209 espécies encontradas na África, sendo o restante presente no sudoeste dos Estados Unidos, México e Américas Central e do Sul (NELSON, 2006, p. 149).

A família Characidae se encontra dentro da ordem citada anteriormente, com representantes dessa família sendo encontrados desde o sudoeste do Texas, México, até as Américas Central e do Sul (NELSON, 2006, p. 156-157). É composta de 952 espécies válidas de peixes e cerca de 400 outras não descritas (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). Essa família é grande e diversificada, correspondendo a quarta maior família do gênero (NELSON, 2006, p. 156-157). Sofre intensas mudanças em sua estrutura devido à dinâmica de classificação de seus componentes, sendo que grande número de seus táxons são classificados como *incertae sedis* (LIMA et al, 2003) em vista da dificuldade de classificação e escasso conhecimento disponível na literatura.

Dentro dos táxons classificados por Lima et al (2003) como *incertae sedis*, está o gênero *Astyanax*. Este gênero tem cerca de 86 espécies válidas (LIMA et al, 2003), com muitas destas agrupadas em grandes complexos, como é o caso de *A. bimaculatus*, *A. fasciatus*, *A. mexicanus*, entre outros (LIMA et al, 2003; TAVARES, 2007; PAZZA; KAVALCO, 2007). É caracterizado por peixes comprimidos, um pouco alongados, de tamanho pequeno, raramente atingindo comprimento de 150 mm, corpo geralmente delgado, cauda nua e linha lateral completa (EIGENMANN, 1921, p. 227-229).

O gênero *Astyanax* é o mais rico da ordem, o mais comum e diversificado da família Characidae na área da região neotropical e um dos gêneros dominantes na América do Sul; são conhecidos popularmente como lambaris e possuem ampla diversidade estruturais, o que dificulta sua classificação e identificação (LIMA et al, 2003; NELSON, 2006, p. 156-157; EIGENMANN, 1921, p. 227-229; DOMINGUES, 2005).

Para se ter uma idéia da alta diversificação apresentada pelo gênero, podemos pegar como exemplo o “complexo *Astyanax fasciatus*, o qual foi um dos únicos peixes neotropicais a chegarem à América do Norte, ocorrendo em todos os habitats de água doce, desde altitudes abaixo de 100 m, até o norte do sistema do Rio Grande/Rio Bravo (Novo México, EUA) (STRECKER; FAÚNDEZ; WILKENS, 2004).

A classificação do gênero *Astyanax* como *incertae sedis* (LIMA et al, 2003), demonstra a grande dificuldade de classificação e taxonomia dos indivíduos desse gênero. Em relação a esse tema pode-se observar em trabalhos de Mello (2009), Domingues (2005), Tavares (2007), Moysés e Almeida-Toledo (2002), Torres-Mariano e Morelli (2006), entre outros, a grande dificuldade enfrentada pelos pesquisadores na identificação das espécies de *Astyanax*, e também os esforços feitos, principalmente na área da genética, na tentativa de amenizar esse problema.

### **2.2.1. Ecologia do gênero *Astyanax***

Dada a ampla distribuição e diversificação do gênero *Astyanax*, é esperado que este apresente hábitos alimentares diversos, e grande capacidade de adaptação aos diferentes ambientes.

Esse raciocínio é sustentado por diversos estudos, como o realizado por Arcifa, Northcote e Froehlich (1991) que observaram, em duas espécies do gênero *Astyanax* analisadas, a alimentação preferencialmente diurna, ovívora, constituída principalmente por insetos aquáticos e terrestres, algas, plantas superiores, e, em menor número, até mesmo peixes, o que vem de encontro com os dados de outros pesquisadores da área. Os autores relatam também que, ao contrário do esperado, as duas espécies analisadas apresentavam dieta similar. Vilella, Becker e Hartz (2002) chegaram a mesma conclusão ao estudar a dieta de seis espécies do gênero *Astyanax*, presentes no rio Maquiné (RS) relatando que, somente uma dentre as seis espécies analisadas diferiu quanto à alimentação, indicando que diferenças de habitat e biota não influenciam na dieta padrão desses peixes.

Em outro trabalho, Novakowski, Hahn e Fugli (2007), ao estudar a alimentação de peixes piscívoros antes e após a construção do reservatório de Caxias (Paraná), observaram que a dieta de *Rhamdia branneri* passou de principalmente moluscos e

invertebrados, para quase que exclusivamente peixes, sendo que dentre as presas mais consumidas estava *Astyanax sp b*. Esse aumento na predação dessa espécie indica um incremento no número de indivíduos, não só dessa última, mas também para outras duas espécies de *Astyanax*, sendo as três as mais abundantes nas coletas realizadas, com um aumento significativo no período pós construção da represa. Esse aumento pode ser um indício de que as espécie do gênero *Astyanax* possuam boa adaptação às mudanças ambientais, além de outros aspectos, citados pelas autoras, que levaram ao sucesso do gênero na Bacia do Rio Paraná, entre eles a estratégia reprodutiva com a produção de pequenos ovos, elevada fecundidade, embriogênese curta e curto tempo de eclosão das larvas, aliada a uma elevada flexibilidade alimentar.

Além da importância na cadeia alimentar e no equilíbrio ecológico, estudos de Vilella, Becker e Hartz (2002) e Gomiero e Braga (2003) levantam a hipótese de espécies do gênero *Astyanax* serem potenciais dispersores de sementes, isso devido à presença de sementes vegetais aparentemente intactas nos conteúdos estomacais de indivíduos analisados nos estudos. A importância dessa potencial dispersão é grande, uma vez que os indivíduos do gênero são conhecidos pela capacidade considerável de locomoção ao longo do rio, pela ampla dispersão e variedade de habitats que ocupam (VILELLA; BECKER; HARTZ, 2002). Ambos os autores citados acima enfatizam a necessidade de mais estudos na área para que a atuação de espécies do gênero *Astyanax* como dispersoras de sementes possa ser confirmada.

Segundo Meurer et al (2005) o gênero *Astyanax* também detêm certo valor econômico no ramo da piscicultura, principalmente *Astyanax bimaculatus* pelo fato de aceitar, com grande facilidade, a alimentação artificial, além de ser bastante apreciado como petisco ou como isca para pesca esportiva. Outra vantagem da piscicultura dessa espécie, segundo o autor, é alto potencial brasileiro no ramo devido principalmente ao clima adequado e a grande disponibilidade de água no país; porém o setor ainda carece de informações com relação ao manejo e nutrição das espécies, dados essenciais para produção e geração de renda.

### 2.2.2. Diversidade genética no gênero *Astyanax*

Em um estudo sobre a evolução cromossomal de characídeos neotropicais, Pazza e Kavalco (2007) realizaram um levantamento sobre o tema no gênero *Astyanax*, constatando que o número cromossômico no grupo oscila entre  $2n=36$  e  $2n=50$  cromossomos, sendo o menor número observado em *Astyanax shubarti*. Ainda no estudo em questão é possível observar grupos de espécies com oscilação no número cromossômico, como é o caso de *A. fasciatus*, *A. scabripinnis* e *A. sp. aff fasciatus*, os quais apresentam indivíduos com números  $2n$  distintos. Outras espécies do gênero demonstram o número cromossomal conservado, porém, em *A. altiparanae*, apesar do número  $2n$  da espécie se manter constante, apresenta variação intra-populacional significativa em relação à macroestrutura cariotípicas (PAZZA; KAVALCO, 2007). Essa variação também foi relatada em alguns outros estudos, como os de Neto et al (2009), Domingues et al (2007), Pie et al (2009) e Fernandes e Martins-Santos (2004).

Ainda em relação à variação no número cromossômico no gênero, Vicari et al (2008), em estudo com o complexo *A. scabripinnis*, relatou que a variação cromossômica das populações estudadas provavelmente está relacionadas ao seu local de coleta, o que poderia ser uma importante informação sobre a história evolutiva do gênero. Nesse raciocínio, Domingues (2005) considerou o gênero *Astyanax* com um grupo bastante interessante para estudos de biologia evolutiva, dada a extensa viabilidade em suas fórmulas cariotípicas que acompanham sua diversidade.

Essas variações no número cromossômico das espécies do gênero *Astyanax* podem estar relacionadas à ocorrência de triploidia natural, presença de cromossomos B, além de outras causas de polimorfismo (PAZZA; KAVALCO, 2007).

### 2.3. Técnicas moleculares e RFLP

Nos últimos anos a utilização de técnicas moleculares em estudos sobre o relacionamento entre os diversos grupos de seres vivos aumentou expressivamente, impulsionado pelos grandes e rápidos avanços científicos na área. Nesse quadro, o estudo no campo da identificação de espécies de peixes não ficou atrás, e demonstrou também um alto incremento de estudos com o desenvolvimento de

técnicas utilizando ferramentas moleculares. Em levantamento realizado por Teletchea (2009) dos métodos moleculares utilizados na identificação de peixes, no período de 1997 a 2007, foi relatado a existência de cerca de 153 estudos nessa área.

A identificação de peixes é tradicionalmente realizada com bases em análises morfológicas externas, o que, em muitos casos, dificulta a correta identificação do espécime, principalmente no caso de espécies crípticas ou em diferentes estágios de desenvolvimento (TELETCHEA, 2009; KON et al, 2007). Nesse quadro, a utilização de técnicas moleculares pode ser um grande aliado, uma vez que amplia o campo de investigação, e provêm novas informações potencialmente relevantes.

Ainda segundo o estudo de Teletchea (2009), as principais técnicas moleculares utilizadas na identificação de peixes foram: PRC-RFLP, seqüenciamento-PCR, PCR-primers específicos, PCR-SSCP, PCR-RAPD, PCR-DGGE, PCR-ALF, clonagem e sequenciamento, PCR-real time, e tecnologia microarray. No estudo se pode observar que dos 153 estudos analisados, 71 utilizaram a técnica de PCR-RFLP, sendo esta a técnica visivelmente preferida entre os pesquisadores. Em outro estudo feito por Rasmussen e Morrissey (2009) foi possível observar a grande utilização de técnicas moleculares na identificação de espécies de peixes e frutos do mar de valor comercial em uma ampla variedade de produtos processados ou in natura.

A técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) é um método no qual fragmentos de DNA são amplificados por PCR e cortados com enzimas de restrição, as quais reconhecem sítios específicos no fragmento de DNA, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Os fragmentos, então, são separados por eletroforese em gel e sua visualização é feita por meio de bandas (TELETCHEA, 2009; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 143). Os diferentes padrões de banda gerados para cada indivíduo analisado podem ser usados para separar espécies diferentes ou agrupar indivíduos com o mesmo padrão de banda. As diferenças entre os padrões de bandas são atribuídas à diferenças nas sequências de nucleotídeos no genoma, os quais podem provocar mudanças nos sítios de restrição das enzimas (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 143-152).

Os marcadores do tipo RFLP apresentam vantagens em relação a marcadores citológicos, morfológicos ou de isozimas a citar: a herança como marcadores mendelianos livres de efeitos pleiotrópicos, não sofrem modificação pelo

ambiente, podem ser obtidos em grande número, e estão distribuídos aleatoriamente no genoma (TELETCHEA, 2009; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 143). Essa técnica é simples, de fácil utilização e menos custosa em relação ao PCR-sequenciamento, além de possibilitar, com a utilização de um único par de primers e a escolha cuidadosa de enzimas de restrição, a identificação de múltiplas espécies; todas essas vantagens a tornam uma técnica muito popular (TELETCHEA, 2009).

#### **2.4. DNA mitocondrial e o gene *citocromo b***

A partir da década de 1980, o mtDNA, somado à técnica de RFLP, tem sido muito utilizado em estudos genéticos e evolutivos principalmente em análises intra e interespecífica (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 151). Seu uso tem se demonstrado vantajoso, uma vez que provêm melhores resultados no estudo de variações populacionais em comparação ao uso de isozimas além de sua análise ser muito mais simples do que a de DNA, por não envolver recombinação gênica (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 150). A análise de mtDNA por RFLP tem se mostrado muito sensível, fornecendo informações importantes sobre estrutura populacional de espécies, biogeografia, dispersão, fluxo gênico e colonização (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 151).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é uma molécula de fita dupla circular que codifica aproximadamente 5% de toda maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria, sendo que regiões não codificadoras, íntrons, pseudogenes e sequências repetitivas são raramente observadas (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 150). Estão geralmente presentes em cópia única, e somente codificam as proteínas para a manutenção de suas funções e para expressão gênica (CALCAGNOTO, 2001, p. 56). É composto de 37 genes, os quais 13 codificam RNAs mensageiros, 22 para RNAs transportadores e dois para subunidades cromossômicas (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p.150; AVISE, 1986). O mtDNA tem seu arranjo e seu tamanho altamente conservado, porém evolui rapidamente ao nível de sequência nucleotídica (AVISE, 1986).

A alta taxa de evolução do mtDNA pode ser explicada pela baixa eficiência do sistema de reparo da mitocôndria e sua alta exposição a radicais livres possivelmente gerados durante o processo da respiração (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 150-151; BROWN; GEORGE; WILSON, 1879; RAND, 2001).

Em seu estudo, Rand (2001) realçou a importância da coevolução do mtDNA e o DNA nuclear, enfatizando a influência da interação entre esses dois DNAs nas aptidões do mtDNA. Apesar da alta taxa de mutação, os indivíduos são geralmente homoplásmicos, possuindo apenas um tipo de mtDNA em todas as suas células (AVISE, 1986; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 150; RAND, 2001).

O genoma mitocondrial é tido como uma ferramenta importante no estudo das relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações, principalmente devido às características únicas como a herança uniparental materna, a ausência de recombinação e as taxas evolutivas de 5 a 10 vezes maiores que o genoma nuclear (BROWN; GEORGE; WILSON, 1879; CALCAGNOTO, 2001, p. 56). A grande quantidade de cópias presentes nas células e seu tamanho reduzido também contribuem para a escolha do mtDNA dentre os outros tipos de DNA (TELETCHEA, 2009).

Dentro do mtDNA está inserido o gene *citocromo b* (*cyt b*), o qual tem sido muito utilizado em estudos de filogenia, fato que pode ser observado no estudo de Teletchea (2009) no qual, 77 dos 153 estudos analisados tinham como DNA alvo o *cyt b*. Esse gene apresenta tanto regiões conservadas quanto regiões com alto grau de variabilidade, o que o que permite a discriminação de até mesmo espécies estreitamente relacionadas (TELETCHEA, 2009).

Como exemplos do uso de genes mitocondriais aliados à técnica de RFLP na identificação de espécies, podemos citar o trabalho de Reid e Wilson (2006), no qual foi possível a identificação de sequências específicas para cada uma das seis espécies de *Moxostoma*, sendo que as digestões foram 90% compatíveis com o padrão esperado; o trabalho de Mazumder e Alam (2009) que conseguiram identificar diferentes subdivisões populacionais de *Tenualosa ilisha* e traçar um cenário diferente acerca da evolução e distribuição dessa espécie em Ontário; e o estudo de Moysés e Almeida-Toledo (2002) que, com o uso de duas enzimas de restrição, conseguiram identificar padrões espécie-específicos em cinco espécies de *Astyanax*, além de observar variações intraespecíficas nessas espécies.

Outros exemplos de estudos utilizando a mesma técnica mas com o gene *citocromo b*, podemos citar o trabalho de Chapela, Sotelo e Péez-Mártin (2003) no qual 7 espécies do mesmo gênero de cefalópodos puderam ser identificados em amostras de produtos industrializados e in natura; e o estudo de Strecker, Faúndez, Wilkens (2004) no qual pode se pôde inferir uma possível história evolutiva de

espécies de *Astyanax fasciatus*, tanto de ambientes de superfície quanto de cavernas, para a região da América Central e do Norte.

Com o exposto até aqui pode se ter uma idéia do potencial do uso do mtDNA associada à técnica de PCR-RFLP em análises e identificação de espécies altamente relacionadas, como é o caso deste trabalho.

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho se insere em um amplo estudo evolutivo da ictiofauna de riachos da bacia do Alto rio Paraná, sob o ponto de vista da Sistemática Molecular, Filogeografia e Evolução Cariotípica, do Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Biologia da UNESP, Campus de Rio Claro. O presente trabalho pretendeu verificar a eficiência do método de PCR-RFLP do mtDNA na identificação da diversidade genética e na caracterização de espécies do gênero *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná. Os principais objetivos foram:

- Caracterizar a diversidade genética de populações de cinco espécies de *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná: *A. paranae*, *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. bockmanni* e *A. biotae*, além de uma espécie relacionada de outra bacia hidrográfica: *A. ribeirae*.
- Identificar possíveis padrões espécie-específicos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) do gene Citocromo *b* nas espécies do gênero *Astyanax* analisadas.
- Propor uma hipótese de relacionamento entre as espécies do gênero na bacia do Alto rio Paraná com base no polimorfismo do PCR-RFLP do gene Citocromo *b* do mtDNA.
- Propor, se possível, uma análise rápida e eficiente de identificação molecular de espécies do gênero *Astyanax* na bacia do Alto rio Paraná e em bacias adjacentes.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Materiais

O presente trabalho foi desenvolvido com enfoque na identificação e caracterização molecular de populações de cinco espécies do gênero *Astyanax* na bacia do Alto rio Paraná e de uma espécie de bacia adjacente (Rio Ribeira de Iguape). Para tanto, foram analisadas fragmentos de restrição do mtDNA do gene Citocromo b das espécies de *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná, sendo duas populações de *Astyanax paranae*, *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. bockmanni* (nas bacias dos rios Tietê e Paranapanema) e uma população de *A. biotae* (na bacia dos rios Tietê). Como grupo externo foram utilizadas duas populações de *A. ribeirae* proveniente da bacia do rio Ribeira de Iguape. Foram amostrados de cinco a dez indivíduos por espécie, com cerca de cinco por ponto de coleta. O total de indivíduos analisados foi de 54 indivíduos. Um resumo das informações pode ser visualizado na tabela abaixo:

**Tabela 1.** Número de indivíduos amostrados por espécie, por ponto de coleta.

<b>Espécie</b>	<b>Número de indivíduos</b>	<b>Ponto de coleta (rio – bacia – cidade – estado)</b>
<i>Astyanax paranae</i>	5	R. Canta Galo – Tiete – Rio Claro SP
	5	R. Cascatinha – Tietê – Botucatu SP
<i>A. altiparanae</i>	5	R. Pardo – Paranapanema – Botucatu SP
	5	Córrego Invernada – Tietê – Penapolis SP
<i>A. fasciatus</i>	4	R. Itapetininga – Paranapanema – Itapetininga SP
	5	R. Mogi-Guaçú – Grande - Porto Ferreira SP
<i>A. bockmanni</i>	5	R. Pardo – Paranapanema – Botucatu SP
	5	R. Campo Novo – Tietê – Bauru SP
<i>A. biotae</i>	5	R. Paranapanema – Diamante do Norte PR
<i>A. ribeirae</i> *	5	R. Jacupiranga – Ribeira – Cajati SP
	5	R. Jacupiranga – Ribeira – Cajati SP
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>54</b>

\*As populações de *Astyanax ribeirae* foram utilizadas como grupo externo.

Todo o material utilizado foi obtido da coleção do Laboratório de Genética de Peixes (LGP) de Rio Claro/SP. Todos os espécimes se encontravam conservados em álcool 98% e depositados na coleção ictiológica do Laboratório onde recebeu um número de tombo.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Extração de DNA

O DNA total foi obtido a partir de amostras de fígado e/ou músculo, utilizando a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico (SAMBROOK, 2001), de acordo com os seguintes procedimentos:

1. Preparar uma solução de lise contendo:

**Tabela 2.** Componentes da solução de lise.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (uL)</b>
TNE 1X	300
Tris-HCl 1M (pH 8,0)	30
SDS 10%	20
Proteinase K (20 mg/mL)*	25
<b>Volume total</b>	<b>375 uL</b>

(\*)Caso se utilize Proteinase K a 10mg/mL, mudar o volume utilizado para 50 uL.

Nota: A solução de lise deve ser preparada na hora do uso.

2. Colocar as amostras de tecidos em um tubo eppendorf e adicionar a solução de lise.

3. Submeter cada tubo a um vórtex de 15 segundos e deixá-los em estufa a 37°C *overnight*;

4. Adicionar 8µL de RNase 10mg/mL e deixar em estufa a 37°C por 1 hora, agitando o tubo a cada 30 minutos;

5. Levantar os tubos com os tecidos completamente digeridos para a capela e adicionar em cada tubo 400µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1).

6. Dar um vórtex de 30 segundos e, em seguida, centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos;

7. Retirar os tubos da centrífuga cuidadosamente para não misturar as fases e transferir o sobrenadante (fase aquosa contendo DNA) para um novo tubo correspondente;

8. Adicionar a cada tubo 60µL acetato de sódio 3M (pH 5,3). Inverter o tubo lentamente e repetidas vezes para a completa homogeneização do sal com a solução;

9. Adicionar a cada tubo 600µL de etanol absoluto gelado e inverter o tubo como no passo anterior (se houver formação de nuvens, transferir para um novo tubo contendo 1000µL de etanol absoluto);

10. Deixar os tubos no freezer por 30 minutos;

11. Centrifugar os tubos a 14.000 rpm por 30 minutos e descartar o sobrenadante para a completa retirada da mistura etanol + acetato de sódio;

12. Adicionar 150µL de etanol 70% à temperatura ambiente ao pellet e centrifugar novamente à 14.000 rpm por 30 minutos;

13. Descartar o sobrenadante, certificando-se que o precipitado de DNA continua aderido à parede do tubo;
14. Repetir os passos 12 e 13 (exceto nos tubos onde ocorreu a formação de nuvens);
15. Secar o DNA em estufa a 37°C por 30 minutos, colocando os tubos abertos sobre folhas de papel absorventes;
16. Ressuspender o DNA com 100µL (sem nuvens) ou com 250µL (com nuvens) de água Milli Q autoclavada, agitando o tubo delicadamente para solubilizar o DNA que está aderido à parede;
17. Levar o material para a estufa a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, transferir os tubos para a geladeira (4°C) e manter *overnight* para a completa ressuspensão;
18. Armazenar em freezer (-20°C) para conservar por longo prazo.

#### 4.2.2. Amplificação de DNA

O gene mitocondrial *Citocromo b* (*cyt b*) foi completamente amplificado, no total de cerca de 1140 pares de bases (pb), utilizando os seguintes primers:

L-GluDG-CitF: 5' - TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG - 3'

H-16460-CitR: 5'- CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G – 3'

A reação de amplificação por PCR do gene foi preparada em um tubo eppendorf de 0.5 mL, com os reagentes nas seguintes proporções:

**Tabela 3.** Componentes da solução de PCR.

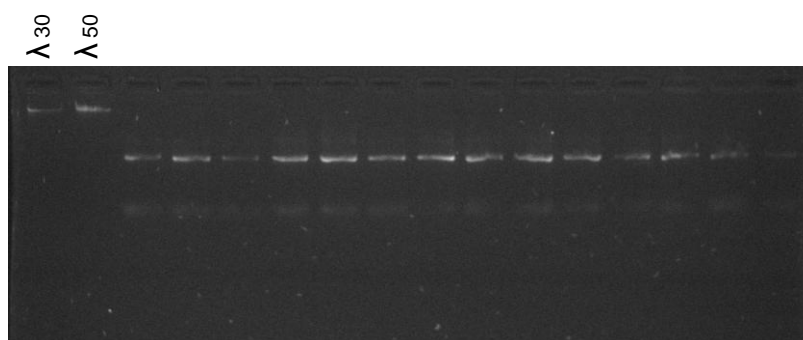
Reagentes	Volume (uL)
Mix PCR * (Qiagen)	6,25
Água Milli Q autoclavada	5,25
Primer F 10uM	0,5
Primer R 10uM	0,5
DNA extraído	1,0
<b>Total</b>	<b>13,5 uL</b>

\* Na solução de MIX PCR estão contidas os reagentes Taq DNA polimerase 5U, Tampão da enzima 10X, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM e dNTP (dideoxynucleotídeo trifosfato) 200µM.

Para o gene mitocondrial *cyt b*, o programa de PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 90 segundos, estendendo a cadeia e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

A reação de PCR foi realizada em termociclador EPPENDORF®, modelo MasterCycler EP Gradient. A visualização dos resultados foi feita em gel de agarose 1% corado com 2µL SYBER Safe (10,000X) (Invitrogen®). As amostras eram misturadas a 1µL de tampão de amostra *blue juice* (10X), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e submetidas a eletroforese com o tampão de corrida TAE 1X.

O tamanho dos fragmentos obtidos foi confirmado através de um marcador de peso molecular (Ladder) de 100pb. A quantificação dos produtos foi determinada visualmente no gel de agarose, através da intensidade da coloração das bandas em comparação à intensidade da coloração das bandas de marcadores de peso molecular Lambda ( $\lambda$ ) DNA 30ng e 50ng, como ilustrado na figura a seguir:



**Figura 2.** Exemplo da quantificação do DNA amplificado por PCR. As duas primeiras bandas correspondem aos marcadores de peso molecular Lambda ( $\lambda$ ) DNA 30ng e 50ng, respectivamente. As outras bandas correspondem a fragmentos de DNA amplificados por PCR.

#### 4.2.3. Análise de Fragmentos de Restrição do DNA mitocondrial (PCR-RFLP)

Em estudo preliminar conduzido no Laboratório de Genética de Peixes (LGP) com 4 das 6 espécies utilizadas no presente estudo foram selecionadas três enzimas de restrição, as quais reconheceram sítios de clivagem nas espécies amostradas, a partir daí procedemos os experimentos nas 6 espécies do presente trabalho utilizando as 3 enzimas selecionadas. As enzimas utilizadas e seus sítios de clivagem são apresentados na tabela abaixo:

**Tabela 4.** Enzimas de restrição utilizadas e seus respectivos sítios de clivagem

<b>Enzima de restrição</b>	<b>Sítio de clivagem</b>
<i>AluI</i>	5' - AG↓CT - 3' 3' - TC↑GA - 5'
<i>BamHI</i>	5' - G↓GATCC - 3' 3' - CCTAG↑G - 3'
<i>HpaII</i>	5' - C↓CGG - 3' 3' GGC↑C - 5'

A reação de PCR-RFLP foi realizada seguindo as recomendações da empresa fabricante das enzimas (BioLabs), de acordo com o volume da enzima e tempo de digestão em um termociclador. Foram utilizados tubos eppendorfs de 0,5 mL, sendo colocado em cada tubo a seguinte mistura:

**Tabela 5.** Componentes da reação de PCR-RFLP.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (uL)</b>
Produto de PCR	5,0
Água Milli Q	9,0
Enzima	1,0
Tampão da enzima	1,0
<b>Total</b>	<b>16,0 uL</b>

Após a colocação de todos os reagentes, os tubos foram deixados em estufa a 37°C *overnight* (período aproximado de 16 horas).

Passado esse período, os tubos foram retirados da estufa e submetidos a temperaturas altas para a inativação das enzimas. O tempo de inativação das enzimas foi de cerca de 20 minutos: a 65°C para as enzimas *AluI* e *HpaII*, e a 80°C para a enzima *BamHI*.

Os fragmentos gerados pela digestão foram analisados em gel de agarose 2%, da mesma forma procedida na visualização da amplificação por PCR, e com a utilização de peso molecular 100pb para a quantificação dos tamanhos dos fragmentos produzidos.

A análise dos resultados foi realizada através do exame visual dos padrões de bandas em gel resultante da digestão das 3 enzimas nas 6 espécies analisadas. As

informações obtidas para cada enzima nas 6 espécies foram confrontadas e discutidas mais adiante, buscando identificar possíveis padrões espécie-específico para cada uma das 6 espécies, visando auxiliar em estudos taxonômicos.

## 5. Resultados

### 5.1. Extração de DNA e Amplificação por PCR

Todos os indivíduos amostrados tiveram seu DNA total extraído de forma satisfatória. O DNA extraído foi então amplificado com os primers, como descrito nos métodos, a fim de se obter fragmentos do gene *citocromo b* do mtDNA.

Com base nas bandas, em gel, geradas pelas amostras amplificadas e pelo marcador de peso molecular Lambda ( $\lambda$ ) DNA 30 ng ( $\lambda$ 30) e 50ng ( $\lambda$ 50), foram selecionadas as amostras de PCR com as maiores quantidades de DNA. As amostras selecionadas foram aquelas que apresentaram intensidades de bandas entre as dos marcadores moleculares  $\lambda$ 30 e  $\lambda$ 50, sendo que a preferência foi dada àquelas com as maiores intensidades de coloração.

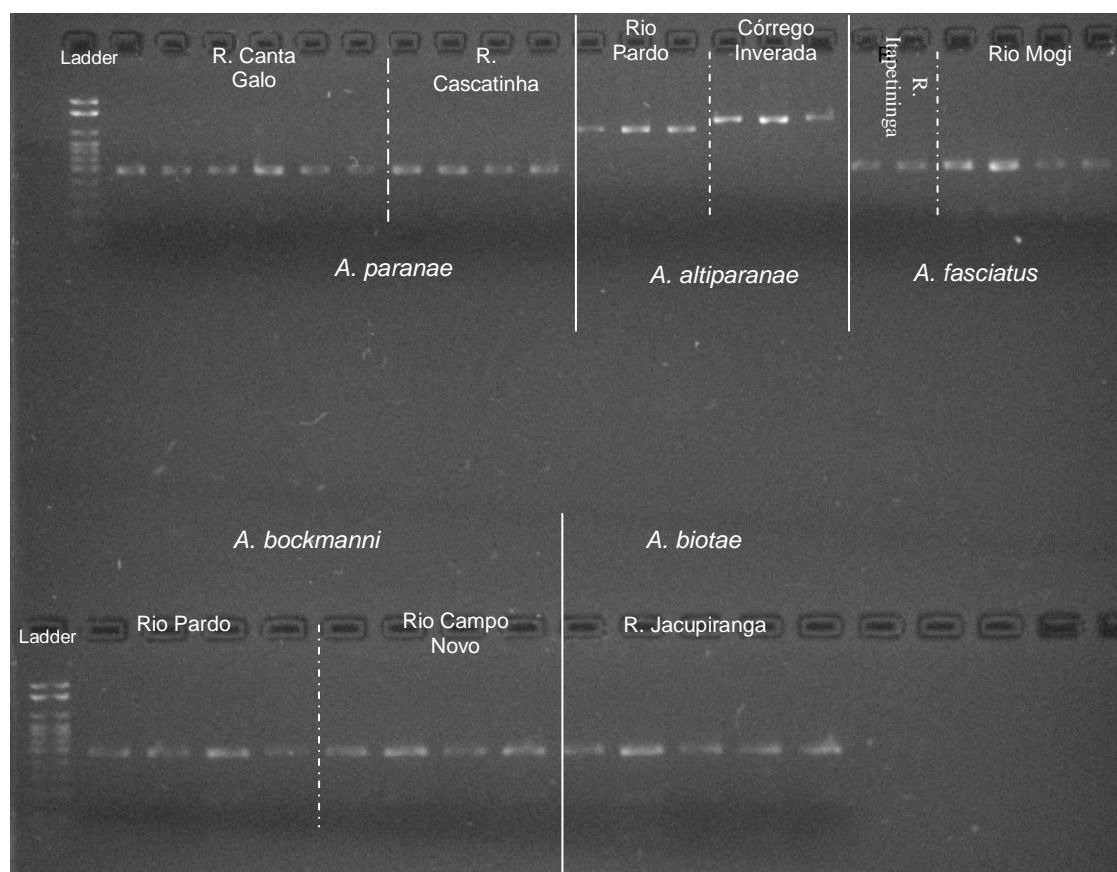
Para todos os indivíduos, tanto da mesma espécie, como de espécies diferentes, foram obtidos fragmentos de DNA amplificados de mesmo tamanho, cerca de 1140 pb, como mostra a figura a seguir:



**Figura 3.** Gel de agarose 1% mostrando o resultado da amplificação por PCR de diversas espécies do gênero *Astyanax*. A primeira banda corresponde ao marcador de corrida, ladder de 100pb; a segunda banda corresponde ao marcador peso molecular Lambda de 50ng; as demais bandas correspondem aos fragmentos amplificados.

## 5.2. Digestão com enzimas de restrição

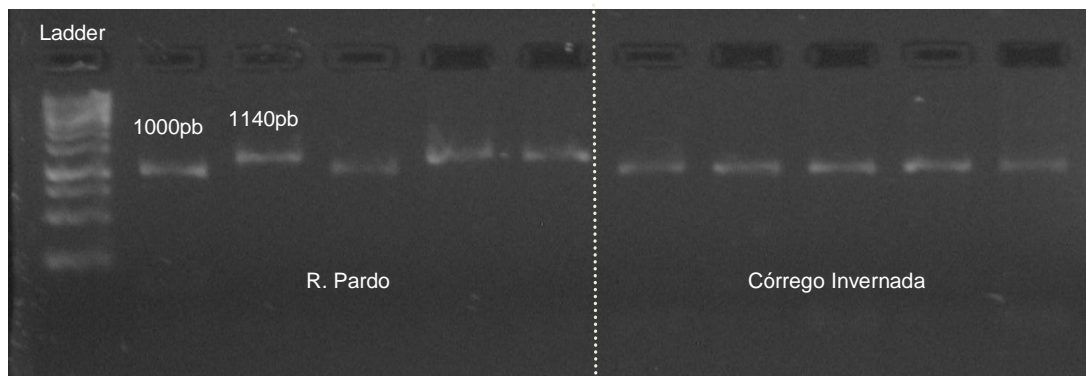
A digestão dos fragmentos de mtDNA (*cyt b*) por enzimas de restrição foi bem sucedida para todos os indivíduos amostrados. Com exceção de *Astyanax altiparanae*, todos os indivíduos da mesma espécie (do mesmo ponto ou de diferentes pontos de coleta) apresentaram o mesmo padrão de banda, quando digeridos pela mesma enzima. A figura abaixo ilustra os resultados obtidos.



**Figura 4.** Gel de agarose 1%, com bandas resultantes da digestão do mtDNA de diversas espécies de *Astyanax* nos diferentes pontos de coleta, com a enzima *HpaII*. As espécies correspondentes a cada banda estão indicadas, na primeira linha abaixo, e na segunda linha acima das bandas. Os locais de coleta estão indicados próximos às suas respectivas bandas. As espécies estão divididas umas das outras por traços cheios, e as populações, por traços quebrados (traços e pontos). O ladder utilizado foi de 100pb.

Os indivíduos de *Astyanax altiparanae* foram os únicos a apresentarem variações no padrão de banda dentro e entre as populações, porém essa variação foi observada somente quando os fragmentos de DNA eram submetidos à digestão com a enzima *HpaII*, para as demais enzimas os padrões de bandas dentro e entre as populações se mostrou estável. Quando houve variações entre os padrões de

banda para essa espécie, pode-se observar dois padrões distintos (figura 5), um padrão com cerca de 1000pb, e outro com cerca de 1140pb.

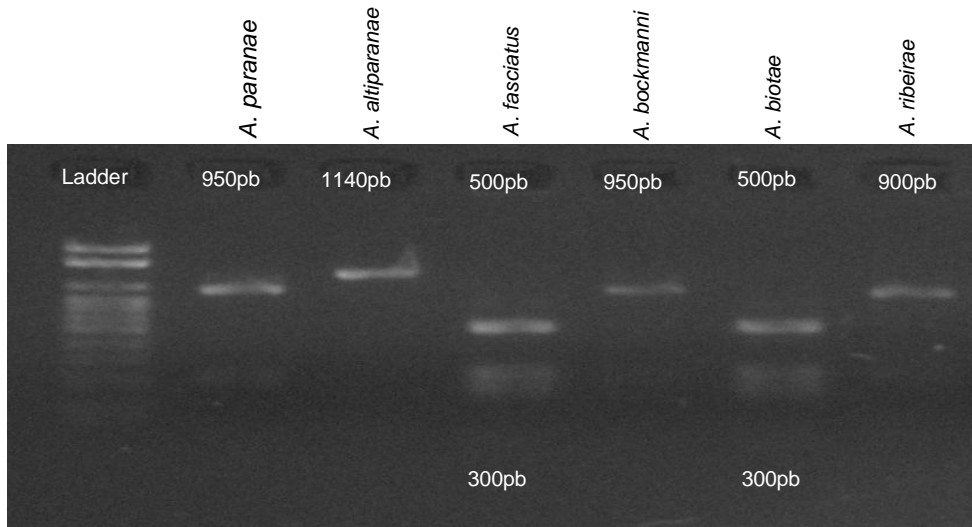


**Figura 5.** Gel de agarose 2% evidenciando os padrões de bandas apresentados por indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae* quando cortados com a enzima *Hpa*II. A linha tracejada divide as diferentes populações; seus pontos de coleta estão indicados abaixo das bandas. O ladder utilizado foi o de 100pb.

No final das digestões, um gel de agarose 2% foi feito com amostras de todas as espécies. Indivíduos da mesma espécie que apresentassem o mesmo padrão de bandas foram agrupados e amostrados apenas uma vez no gel, ou seja, apenas um indivíduo representava o padrão de banda da espécie na(s) população(ões) amostrada(s). Como dito anteriormente, apenas os indivíduos de *Astyanax altiparanae* submetidos à digestão com a enzima *Hpa*II apresentaram padrões diferentes de bandas (figura 5) e portanto foi a única espécie amostrada duas vezes no gel (uma amostra com cada padrão de banda).

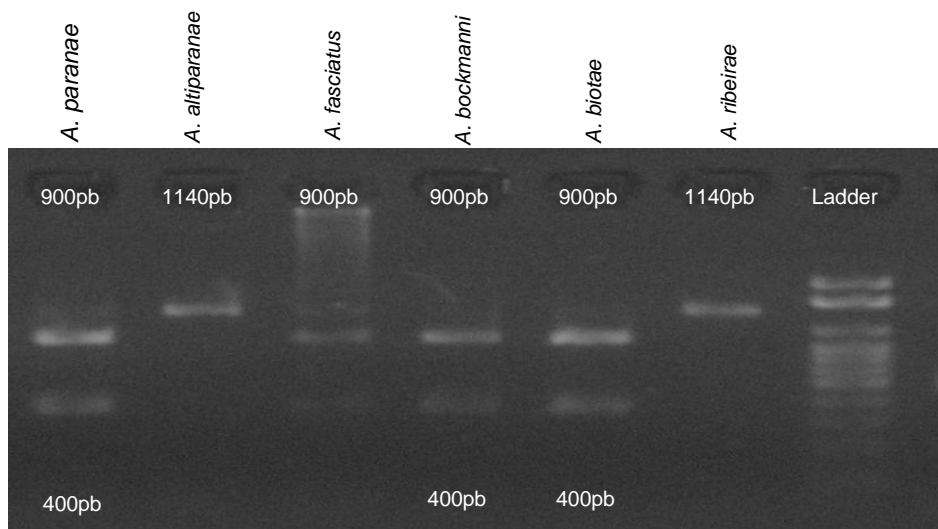
O tamanho das bandas obtidas foi estimado a partir de um marcador de corrida (ladder) com bandas de 100pb a 2000pb. Os resultados estão dispostos abaixo, separados pela enzima utilizada. Como não houve variação significativa entre indivíduos da mesma espécie, utilizamos nas figuras seguintes apenas um indivíduo por espécie para melhor visualização dos resultados.

- *AluI*:



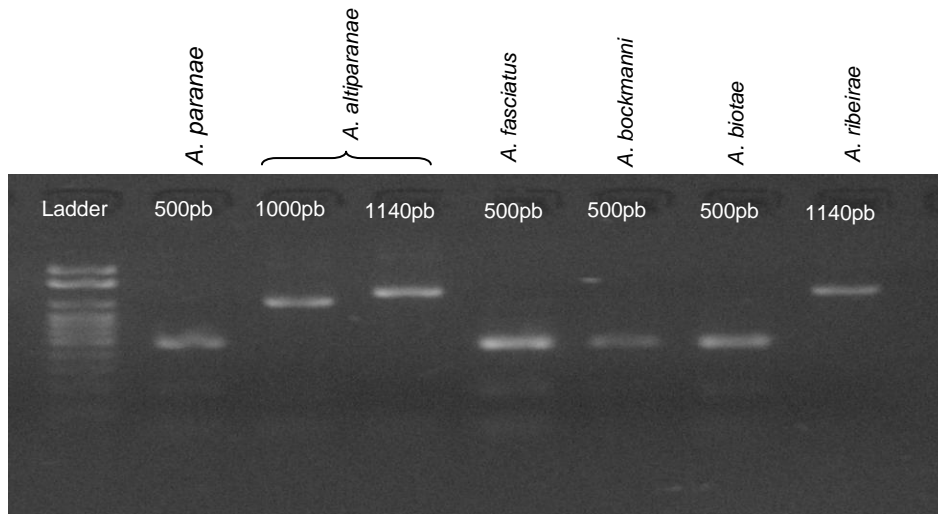
**Figura 6.** Gel de agarose 2% com os padrões de bandas obtidas para cada uma das espécies de *Astyanax* amostradas. Os tamanhos das bases (em pb) estão em números estimados e se encontram acima e abaixo (quando houver mais do que uma banda) das bandas do gel. O ladder utilizado foi de 100pb.

- *BamHI*:



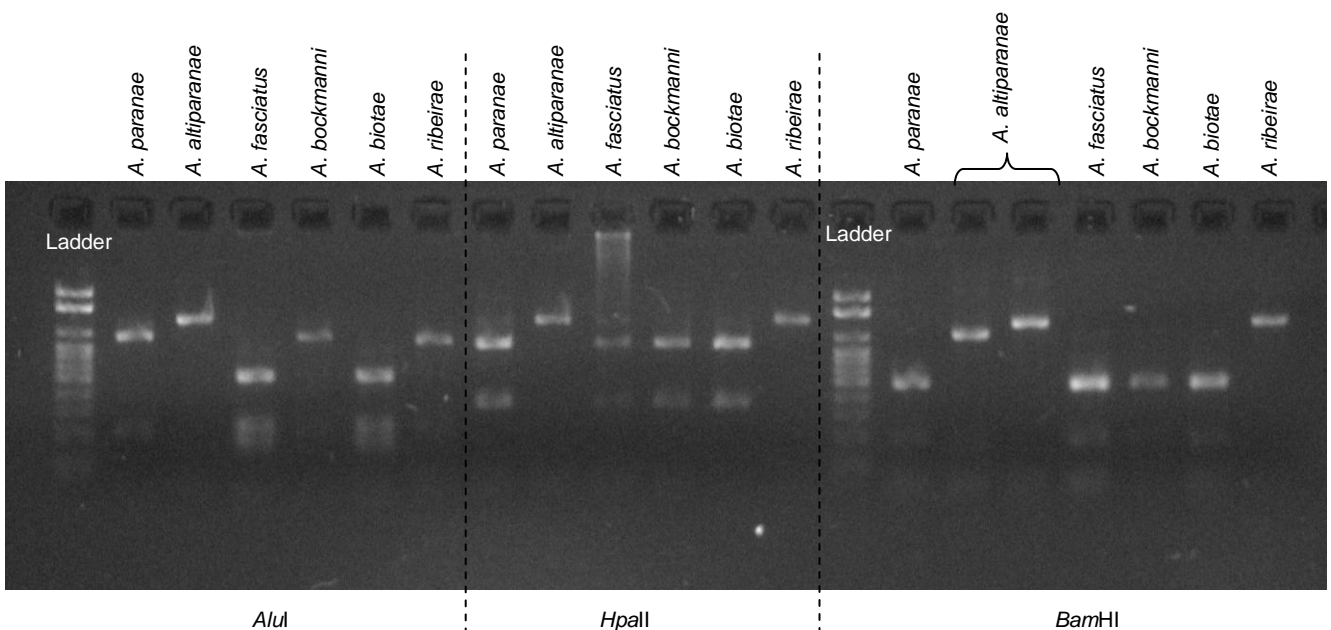
**Figura 7.** Gel de agarose 2% com os padrões de bandas obtidas para cada uma das espécies de *Astyanax* amostradas. Os tamanhos das bases (em pb) estão em números estimados e se encontram acima e abaixo (quando houver mais do que uma banda) das bandas do gel. O ladder utilizado foi de 100pb.

- *Hpa*II:



**Figura 8.** Gel de agarose 2% com os padrões de bandas obtidas para cada uma das espécies de *Astyanax* amostradas. Os tamanhos das bases (em pb) estão em números estimados e se encontram acima das bandas do gel. O ladder utilizado foi de 100pb.

Para uma melhor visualização do resultado, os três últimos géis podem ser condensados e apresentados da seguinte forma:



**Figura 9.** Gel de agarose 2% evidenciando as bandas de todas as espécies analisadas, submetidas à digestão com as 3 enzimas de restrição utilizadas no estudo. Acima da figura está representada a espécie, e abaixo, a enzima utilizada. As linhas tracejadas indicam a separação das bandas de cada enzima. O ladder utilizado foi de 100pb.

## 6. Discussão

No Alto Rio Paraná, a família Characidae corresponde a 23% da composição da ictiofauna (LANGEANI et al, 2007). Provavelmente grande parte dessa porcentagem seja composta de espécies do gênero *Astyanax*, pois este é considerado o mais rico da ordem, sendo também o mais comum e diversificado da família na região neotropical, correspondendo a um dos gêneros dominantes na América do Sul (LIMA et al, 2003; NELSON, 2006, p. 156-157; EIGENMANN, 1921, p. 227-229; DOMINGUES, 2005).

Pela grande quantidade de espécies que possui, e pela ampla diversidade estrutural, o gênero *Astyanax* apresenta dificuldades de classificação e identificação de suas espécies, sendo considerado como *incertae sedis* (LIMA et al, 2003; NELSON, 2006, p. 156-157; EIGENMANN, 1921, p. 227-229; DOMINGUES, 2005). Dados cromossômicos sugerem uma variação do número cromossômico entre  $2n=36$  e  $2n=50$  cromossomos (PAZZA; KAVALCO, 2007) também evidenciam essa diversidade.

Estudos baseados em dados moleculares se constituem em uma ferramenta poderosa no auxílio desse problema. Dentro das técnicas moleculares utilizadas em estudos genéticos e evolutivos em peixes, principalmente em análises intra e interespecífica, podemos destacar a técnica de PCR-RFLP associadas ao mtDNA (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001, p. 151). As características únicas do mtDNA como herança uniparental materna, ausência de recombinação e taxas evolutivas de 5 a 10 vezes maiores que o genoma nuclear (BROWN; GEORGE; WILSON, 1879; CALCAGNOTO, 2001, p. 56) fazem com que este seja uma importante ferramenta no estudo das relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações.

Dentro do mtDNA podemos destacar *cyt b*, o qual tem proporcionado bons resultados na identificação e diferenciação de espécies como nos estudos de Sotelo e Péez-Mártin (2003) e Strecker, Faúndez, Wilkens (2004) (ver introdução).

O mtDNA é conhecido por ter regiões altamente conservadas (TELETCHEA, 2009), como observamos entre os indivíduos da mesma espécie no, presente trabalho, após tratamento com enzimas de restrição no produto amplificado do gene *cyt b*, com exceção de uma espécie (em apenas uma enzima) todos os indivíduos da

mesma espécie apresentaram o mesmo padrão de banda para a mesma enzima, e muitos dos fragmentos de espécies diferentes cortados por RFLP (principalmente pela enzima *Hpa*II) apresentaram o mesmo padrão de bandas, indicando que, provavelmente, suas sequências não sofreram grandes modificações.

Apesar das áreas altamente conservadas, o mtDNA também é conhecido por apresentar alta taxa de evolução, o que permite a distinção entre indivíduos de grupos próximos e até mesmo variações entre e dentro das populações (BROWN; GEORGE; WILSON, 1879; CALCAGNOTO, 2001, p. 56). Esse fato explica a variação encontrada nos padrões de bandas apresentados pelos indivíduos estudados, intra e inter-populacional, principalmente em *Astyanax altiparanae*. Pela análise dos padrões de banda (figura 9) pode-se perceber que *Astyanax altiparanae* pode ser diferenciada dos demais pelo uso da enzima *Alu*I, pois com a digestão com essa enzima, foi possível a obtenção de um padrão único para a espécie. A variação observada entre indivíduos desta espécie são caracterizadas como variações inter e intra-populacional, não sendo suficientes para impedir a distinção de *Astyanax altiparanae* das demais espécies analisadas.

Esse fato pode ser devido à diferenças nas sequências nucleotídicas dos indivíduos analisados. Esse fato vem de encontro com resultados obtidos em estudos de Neto et al (2009), Domingues et al (2007), Pei et al (2009) e Fernandes e Martins-Santos (2004), os quais relataram que populações diferentes de *A. altiparanae*, apesar de apresentarem número cromossômico  $2N=50$  cromossomos, apresentavam diferenças em suas fórmulas cariotípicas, números fundamentais, e estrutura cromossômica. Essas diferenças podem ser indícios de uma divergência evolutiva devido à restrições de fluxo gênico (NETO et al, 2009) e ruptura do conservadorismo evolutivo (DOMINGUES et al, 2007) entre as populações de *A. altiparanae*. Todas as diferenças apresentadas em *A. altiparanae* podem ser a cauda da obtenção dos dois padrões de bandas encontrados neste presente estudo.

Já no caso de *Astyanax ribeirae*, a diferenciação dos demais pode ser feita pelo uso conjunto das enzimas *Alu*I e *Bam*HI, sendo que a primeira o distingue de *A. altiparanae*, *A. fasciatus* e *A. biotae*, e a segunda de *A. paranae* e de *A. bockmanni* (figura 9).

Duas duplas de espécies não puderam ser diferenciadas com precisão entre si com o uso das enzimas utilizadas, sendo estas: a dupla *A. paranae* e *A. bockmanni*, e a dupla *A. fasciatus* e *A. biotae*. Apesar de não ser possível a

diferenciação das duplas com a análise em gel de agarose 2%, a diferenciação entre elas foi possível, ou seja, foi possível a diferenciação de *A. paranae* da dupla *A. fasciatus* e *A. biotae* e assim sucessivamente com a utilização das enzimas *AluI* e *BamHI*. No caso da digestão com a enzima *HpaII*, não foi possível qualquer diferenciação entre as espécies, uma vez que os padrões de bandas gerados foram idênticos para as quatro espécies em questão (figura 9).

O fato das espécies *A. paranae* e *A. bockmanni* e a dupla *A. fasciatus* e *A. biotae*, não terem sido diferenciadas através do uso de PCR-RFLP do gene *cyt b*, se deve ao nível de visualização em gel de agarose 2% não possuir a resolução apropriada para separar fragmentos de restrição inferiores a 30pb. Na figura 9 (resumo dos resultados obtidos) é possível observar que entre as espécies *A. paranae* e *A. bockmanni* há uma pequena variação de tamanho para a enzima *AluI*, onde *A. bockmanni* possui uma banda poucas bases maior do que *A. paranae*, variando entre 10 e 30pb, assim como entre *A. fasciatus* e *A. biotae* para a mesma enzima, onde *A. fasciatus* possui uma banda poucas bases maior do que *A. biotae*, variando entre 10 e 30pb. Para poder confirmar estes dados seria necessário a utilização de gel de acrilamida para visualização das bandas com maior precisão entre o tamanho dos fragmentos de RFLP.

Os resultados obtidos indicam que o gene mitocondrial *cyt b* é adequado para a identificação de espécies de *Astyanax* utilizadas, uma vez que quatro espécies do gênero puderam se separadas das demais, e entre as duas restantes, pôde-se separar as espécies entre duplas diferentes em um nível de resolução maior como em gel de acrilamida (como exposto acima). Os resultados também sugerem uma grande proximidade filogenética entre as espécies *A. paranae* + *A. bockmanni*, e *A. fasciatus* + *A. biotae* uma vez que quando digeridas pela enzima *HpaII* apresentam o mesmo padrão de restrição, estes resultados são similares aos obtidos pelo sequenciamento do gene *cyt b* (Corrêa, 2010) para as mesmas populações e espécies analisadas neste trabalho. As espécies que apresentaram um perfil espécie-específico de mais fácil identificação foram *A. altiparanae* e *A. ribeira*, sugerindo que estas duas espécies são as mais diferenciadas entre os *Astyanax* analisados por PCR-RFLP (figura 5), estes dados também são confirmados pela análise de sequências do gene *cyt b* (Corrêa, 2010), onde *A. ribeira* representa o grupo irmão primitivo de todos os *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná, enquanto *A. altiparanae* representa a primeira linhagem do gênero a se diversificar nesta bacia.

Finalmente, a utilização da técnica de PCR-RFLP para diferenciar espécies do gênero *Astyanax* obteve sucesso na maioria das espécies do gênero na bacia do Alto rio Paraná, embora a identificação de dois grupos de espécies tenha sido dificultado por problemas técnicos, no entanto, de modo geral esta ferramenta poderá ser empregada de modo efetivo em estudos de taxonomia de peixes, sobretudo na ictiofauna de riachos onde a diversidade é ainda subestimada.

## 7. Conclusão

O gene mitocondrial *cyt b* embora conservado, apresentou variação genética suficiente no gênero *Astyanax*, podendo ser identificado como um bom marcador molecular, uma vez que foi possível separar totalmente duas espécies das demais (*A. altiparanae* e *A. ribeira*) e separar os indivíduos entre a dupla *A. paranae* e *A. bockmanni*; e a dupla *A. fasciatus* e *A. biotae*.

Para a espécie *A. altiparanae* foram obtidos dois padrões de bandas distintos, sendo observadas variações entre as populações e entre os indivíduos da mesma população. Essa variação confirma a hipótese de que esta espécie representa um complexo de espécies, no entanto a variação observada mostra que *A. altiparanae* pode ser caracterizada como uma espécie polimórfica para a ferramenta PCR-RFLP.

Os resultados do PCR-RFLP do gene *cyt b* indicam que as espécies *A. altiparanae* e *A. ribeirae* são as mais divergentes do gênero, entre as espécies analisadas, e que *A. paranae* + *A. bockmanni* são fortemente relacionada entre si, assim como *A. fasciatus* + *A. ribeirae*. Estes dados mostram a robustez da técnica para identificação de grupos filogeneticamente relacionados, além do emprego principal em taxonomia molecular.

Finalmente, pudemos comprovar que a técnica de PCR-RFLP em análises do gene mitocondrial *cyt b* é uma técnica rápida e confiável para análises inter e intraespecíficas de indivíduos do gênero *Astyanax*. Essa técnica poderia ser aprimorada, com a utilização de gel de acrilimida para tornar o experimento mais robusto na identificação do tamanho dos fragmentos de restrição inferiores a 50pb, além do aumento de estudos sobre outras enzimas de restrição e suas possíveis regiões de clivagem para a identificação das espécies do gênero.

## 8. Referências Bibliográficas

ARCIFA, M. S.; NORTHCOTE, T. G.; FROEHLICH, O. Interactive ecology of two cohabiting characin fishes (*Astyanax fasciatus* and *Astyanax bimaculatus*) in a eutrophic Brazilian reservoir. **J. of Trop. Ecol.**, 7: 257-268, 1991.

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: O emprego de enzima de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. Cap. 14. p. 143-151.

AVISE, J. C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, B 312, 325-342, Great Britain, 1986.

BROWN, W.; GEORGE, M. Jr.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, V. 76, No. 4, pp. 1967-1971, 1979.

CALCAGNOTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. Cap. 5. p. 51-63.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; FERREIRA, K. M.; RIBEIRO, A. C.; BENINE, R. C.; DARDIS, G. Z. P.; MELO, A. L. A.; STOPIGLIA, R.; ABREU, T. X.; BOCKMANNI, F. A.; CARVALHO, M.; GIBRANI, F. Z.; LIMA, F. C. T. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biot. Neot.**, v. 3 (n1) - <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01703012003>, 2003.

CASTRO, R. M. C.; MENEZES, N. A. Estudo da diversidade de peixes do Estado de São Paulo (versão preliminar). In: Workshop: Bases para a Conservação da Biodiversidade do Estado de São Paulo. 1996. São Paulo. **Revisões Taxonômicas Preliminares**. Disponível em: <http://www.biota.org.br/info/historico/workshop/revisoes/peixes.pdf>, 1996.

CHAPELA, M. J.; SOTELO, C. G.; PÉREZ-MARTÍN, R. I. Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment. **Eur. Food Res. Technol.**, 217:524-529, 2003.

CORRÊA, J. W. **Filogeografia e estrutura populacional de *Astyanax paranae* (Iambari-de-cabeceira) (Pisces: Characidae) na bacia do rio Tietê**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010. No Prelo.

COX, C. B.; MOORE, P. D. **An ecological and evolutionary approach**. 7 ed. United Kingdom: Blackwell, 2005.

DOMINGUES, M. S. **Citogenética Comparativa de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 do Alto rio Tibagi e Alto rio Iguaçu**. 78f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DOMINGUES, M. S.; VICARI, M. R.; ABILHOA, V.; WAMSER, J. P.; CESTARI, M. M.; BERTOLO, L. A. C.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neot. Ichthyol.**, 5 (1): 37- 44, 2007.

EIGENMANN, C. H. **The American Characidae**. Men. Mus. Comp. Zool., 43:209-310, 2005.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, 141: 328 - 332, Agosto, 2004.

GALVES, W.; SHIBATTA, O. A.; JEREP, F. C. Estudos sobre diversidade de peixes da bacia do alto rio Paraná: uma revisão histórica. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 141-154, jul./dez, 2009.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 25, no. 2, p. 353-360, 2003.

KON, T.; YOSHINO, T.; MUKAI, T.; NISHIDA, M. DNA sequences identify numerous cryptic species of the vertebrate: a lesson from the gobioid fish *Schindleria*. **Mol. Phylog. and Evol.**, 44, 53–62, 2007.

LANGEANI, F.; CORRÊA E CASTRO, R. M.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATTA, O. A.; PAVANELLI, C.S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biot. Neot.**, v. 7 (n3) - <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/abstract?article+bn03407032007>, Outubro, 2007.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI da SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, A. S.; MALABARBA, M. C. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae sedis in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. (Edi). **Check list of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003, p. 106-113.

MAZUNDER, S. K.; ALAM Md. S. High levels of genetic variability and differentiation in hilsa shad, *Tenualosa ilisha* (Clupeidae, Clupeiformes) populations revealed by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. **Gen. and Mol. Biol.**, 32, 1, 190-196, 2009.

MELLO, R. **Relações filogenéticas e biogeográficas entre espécies do gênero *Astyanax* (Teleostei - Characidae) das bacias do rio Iguaçu, do alto rio Paraná e do rio Paraguai baseadas em sequências de gene mitocondrial**. 43 f. Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Dep. de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOZCOLO, W. R.; KAVATA, L. B.; LACERDA, C. H. F. Nível de Arraçoamento para Alevinos de Lambari-do-Rabo-Amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **R. Bras. Zootec.**, v.34, n.6, p.1835-1840, 2005.

MOYSÉS, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among Five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genet. and Mol. Biol.**, v. 25, 4, 401-407, 2002.

NELSON, J. S. **Fishes of thr world**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 2006. 610p. NETO, M. F.; VICARI, M. R.; CAMARGO, E. F.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, *Incertae sedis*). **Gen. and Mol. Biol.**, versão on line anterior à impressão disponível em [www.sbg.org.br](http://www.sbg.org.br), 2009.

NOVAKOWSKI, G. C.; HAHN, N. S.; FUGI, R. Alimentação de peixes piscívoros antes e após a formação do reservatório de Salto de Caxias, Paraná, Brasil. **Biot. Neot.**, v. 7 (n2), p. 149-157, Julho, 2007.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Chromossomal evolution in the neotropical Characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *The nucleus*, v. 50 (3) : 519-543, 2007.

PIE, M. R.; BAGGIO, R. A.; BOEGER, W. A.; PATELLA, L. A.; OSTRENSKY, A.; VITULE, J. R. S.; ABILHOA, V. Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguaçú River. **J. of Fish Biol.**, 75, 2357–2362, 2009.

RAND, D. M. **THE UNITS OF SELECTION ON MITOCHONDRIAL DNA.** Annu. Rev. Ecol. Syst., v. 32, pp. 415–48, 2001.

RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. Application of DNA-Based Methods to Identify Fish and Seafood Substitution on the Commercial Market. **Comp. Rev. in Food Sci. and Food Safety**, v. 8:118-154, 2009.

REID, S. M.; WILSON, C. C. PCR-RFLP based diagnostic tests for Moxostoma Species in Ontario. **Conserv. Genet.**, 7:997–1000, 2006.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. (Edi). **Check list of South and Central America.** Porto Alegre: Edipucrs, 2003, p. 104-105.

SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 3 Volume Set. Cold Spring Harbor Laboratory Publisher, 2001.

STRECKER, U.; FAÚNDEZ, V. H.; WILKENS, H. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. **Mol. Phylog. and Evol.**, v. 33, p. 469–481, 2004.

TAVARES, D. O. ***Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) do sistema do Alto rio Paraná: taxonomia.** 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

TELETCHEA, F. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. **Rev. Fish Biol. Fisheries**, 19: 265–293, 2009.

TORRES-MARIANO, A. R.; MORELLI, S. Chromosomal analysis of *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) from the Araguaia river, Uberlândia, MG, Brazil. **Braz. J. Biol.**, 66 (1A): 161-165, 2006.

VICARI, M. R. NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Gen. and Mol. Biol.**, 31, 1 (suppl), 173-179, 2008.

VILELLA, F. S.; BECKER, F. G.; HARTZ, S. M. Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in na Atlantic forest river in Southern Brazil. **Braz. Arch. Of Biol. And Tehnol.**, v. 45, N.2: pp. 223-232, Junho, 2002.