VARIABILIDADE GENÉTICA DE *PYGOCENTRUS NATTERERI* DE BACIAS HIDROGRÁFICAS BRASILEIRAS

Jose Wilson Gaida Filho[1]

Eline Silva Lima[2]

Elidy Rayane de Rezende França[3]

Luciana Alves da Luz Soares[4]

Maria Claudene Barros[5]

Elmary da Costa Fraga[6]

INTRODUÇÃO

A ordem Characiformes reúne peixes teleósteos de ampla distribuição na África e nas Américas, com maior diversidade na região neotropical, que concentra famílias como Serrasalmidae, composta por piranhas e pacus Esses peixes apresentam corpo profundo e comprimido, além de comportamentos variados. (Toledo-Piza *et al*., 2024).

Dentre os peixes da família Serrasalmidae, destacam-se as chamadas piranhas verdadeiras também conhecidas como Piranhas carnívoras, características atribuídas devido ao seu comportamento predatório e sua reputação na cultura popular, grupo ao qual fazem parte as piranhas vermelhas da espécie *Pygocentrus nattereri* Kner (1860) as quais se tem poucos estudos realizados sobre sua diversidade genética, suas populações e sua sistemática (*Bignoto et al.* 2019; *Mateussi et al.* 2019*; Luz et al.* 2015).

O uso de marcadores mitocondriais tem se tornado cada vez mais eficaz na resolução de problemas envolvendo a identificação de táxons e a determinação de indicies de variabilidade genética envolvendo os vertebrados, se tornando uma grande fermenta em auxílio a morfologia (Ward *et al*., 2005, 2009; Herbert *et al*., 2003), Visto a carência de estudos que abordem a variabilidade genética da espécie *P. nattereri* nas bacias hidrográficas brasileiras e o surgimento de possíveis novas linhagens para a espécie nas bacias brasileiras (Luz *et al*., 2015; Mateussi *et al*. 2019). Este trabalho busca determinar os índices de variabilidade genética neste táxon, utilizando o marcador mitocondrial COI e diferentes modelos de delimitação de espécie, na tentativa de verificar se as populações da espécie *P. nattereri* se constituem de diferentes linhagens mitocôndrias.

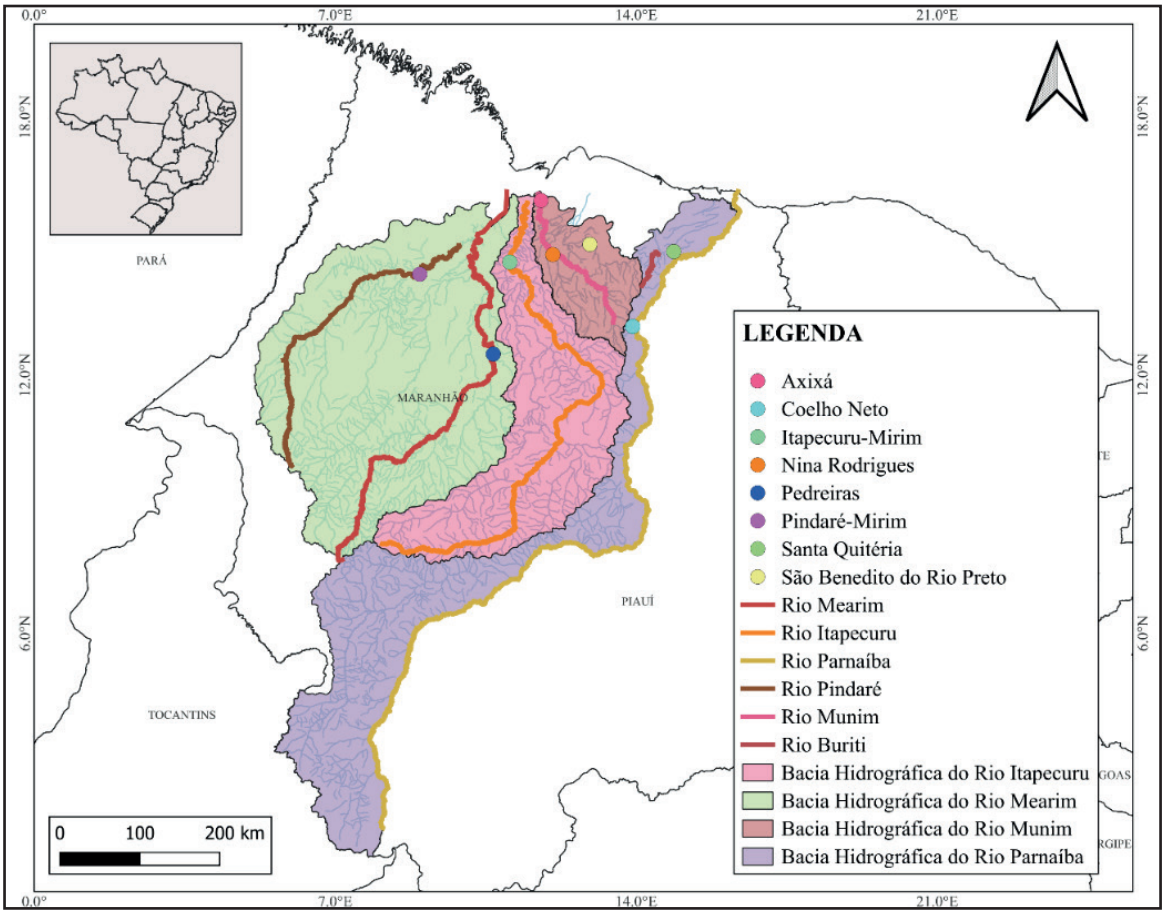
1 Discente em Ciências Naturais, Universidade estadual do Maranhão. E- mail: josewilsonfilho17@gmail.com
2 Doutoranda em Ciência Animal, Universidade estadual do Maranhão. E- mail: elinelima116@gmail.com
3 Doutora em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão. E- mail: elidyany@gmail.com
4 Doutora em Biologia ambiental, Docente do departamento de Química e Biologia, Universidade estadual do Maranhão. E-mail: luluzsoaresbio@gmail.com
5 Doutora em Ciências Biológicas, Docente dos Programas de Pós-graduação , Ciência Animal e Biodiversidade, Ambiente e Saúde, Universidade Estadual do Maranhão. E-mail: mbdene@yahoo.com.br
6 Doutor em Genética e Biologia Molecular, Docente dos Programas de Pós-graduação , Ciência Animal e Biodiversidade, Ambiente e Saúde, Universidade Estadual do Maranhão. E-mail: elmaryfraga@yahoo.com.br

METODOLOGIA

Área de coleta e amostragem

Os espécimes de *P. nattereri* foram obtidos nas bacias dos rios Buriti, Itapecuru, Mearim, Munim, Parnaíba e Pindaré (Figura 1). A amostragem foi obtida em cada uma das bacias com auxílio de apetrechos de pesca como: redes de arrasto, malhadeiras de vários milímetros e tarrafas. As coletas foram devidamente realizadas com a autorização ICMBio nº 84339-1/2022 – Rio Buriti e ICMBio nº 81592-1 – Rio Munim, os rios Itapecuru, Parnaíba, Mearim e Pindaré foram licenciados pelo Ibama, Licença nº. 02012.004159/2006. O estudo foi submetido à Comissão de Controle para Tratamento Ético de Animais da Universidade Estadual do Maranhão sob o Protocolo 47/2022. Foram utilizadas 104 sequências de bacias hidrográficas maranhenses e 71 provenientes do Genbank pertencentes as bacias dos rios São Bento (MA), Tocantins (TO), Araguaia (PA), Rio Branco (RR), Guaporé (RO), Tapajós (PA), Amazonas (AM), Paru (AM), Purus (AM), Madeira (AM), Xingu (PA), Trombetas (PA), Rio Doce (MG), Rio Paraguai (Alto Paraguai), Rio Paraná (baixo Paraná), e sequências de espécimes introduzidas nas Filipinas além de duas sequências utilizadas como grupos externos sendo elas *Serrasalmos elongatus* e *Piaractus brachypomus* .

Figura 1. Mapa do Maranhão evidenciando as bacias hidrográficas dos Rios Buriti, Itapecuru, Mearim, Munim, Parnaíba e Pindaré utilizadas como áreas de coleta das amostras de *P. Nattereri*



Fonte: Autor, 2025

Técnicas moleculares e Análise de dados

O DNA total foi extraído com o kit Wizard genomic DNA purification da Promega e os genes mitocondriais amplificados da PCR. O sequenciamento foi realizado em sequenciador

automático ABI 3500. As sequências foram editadas no BioEdit, enquanto composições nucleotídicas, análises filogenéticas e matriz de divergência genética foram processadas no MEGA X. A diversidade haplotípica e nucleotídica, além de sítios polimórficos e número de haplótipos, foram analisados no DNAsp 6.1 (Rosas *et al*., 2017). A delimitação de Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) foi realizada pelos métodos Poisson Tree Process (PTP), (Zhang *et al*., 2013) e Generalized Model Yule Coalescent (GMYC), (Fujisawa; Barraclough, 2013). A estrutura populacional foi avaliada via AMOVA e índices de fixação no Arlequin 3.5 (Excoffier; Lischer, 2006). Por fim, a rede de haplótipos foi construída no software Network 4.6.1.1. (Bandelt *et al*., 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analise do fragmento e diversidade genética

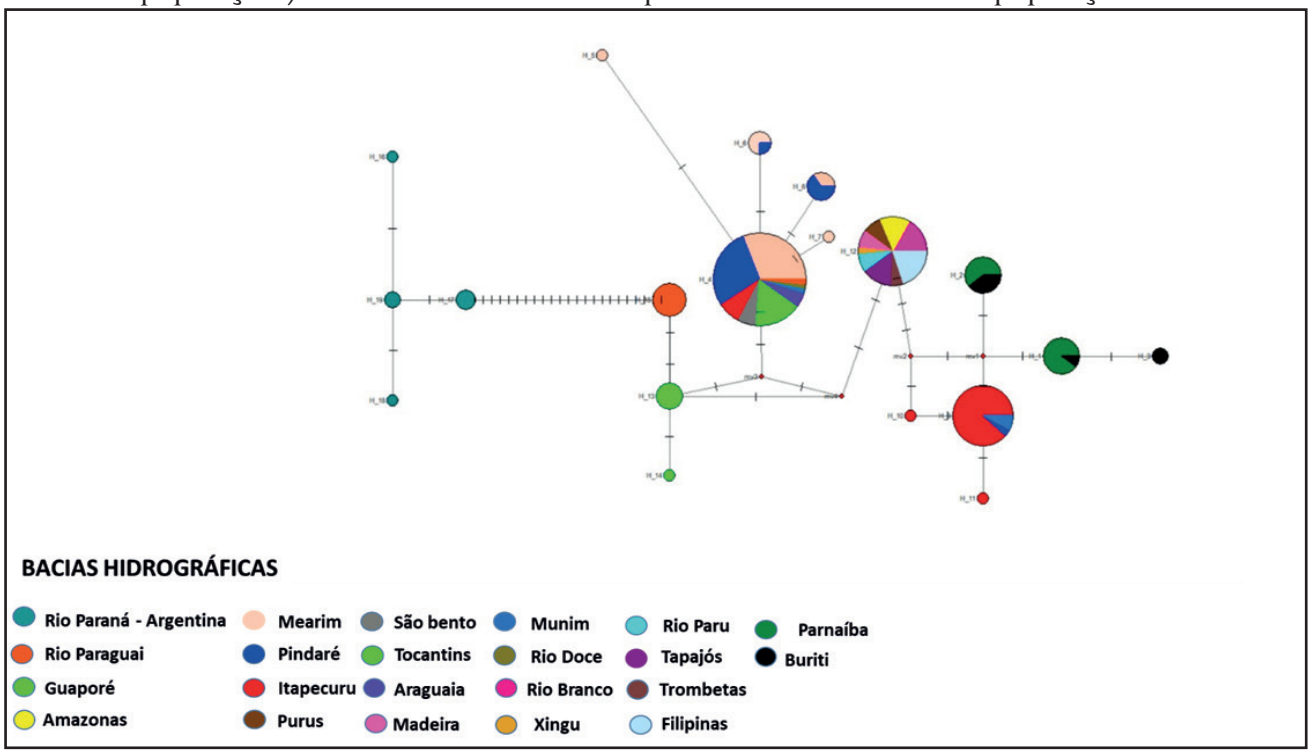
Foi gerado um banco de 179 sequências com 590 pares de base para o gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) para *P. nattereri.* A composição nucleotídica do fragmento consistiu de 23,11 % de Adenina, 31,97% de Citosina, 17, 37% de Guanina e 23,11% de Timina. Dentre as sequências analisadas foram encontrados 19 haplótipos e valores de diversidade haplotípica e nucleotídica de h= 0,818 e $^{\pi}$= 0,01287, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 1 - Níveis de diversidade genética nas populações de P. nattereri com base em sequências do gene COI.

	Índices de diversidade				
Populações	N	NH	S	H	π
Parnaíba	15	2	2	0,514	0,00174
Mearim	26	5	4	0,462	0,00089
Pindaré	23	4	11	0,439	0,00198
Itapecuru	30	4	10	0,395	0,00467
São Bento	4	2	1	0,500	0,00085
Buriti	7	3	3	0,667	0,00274
Rio Branco	6	2	1	0,533	0,00091
Tocantins	10	2	1	0,200	0,00036
Amazonas	5	1	0	0	0,00000
Tapajós	5	2	1	0,400	0,00068
Munim	3	2	9	0,667	0,01038
Araguaia	3	2	2	0,667	0,00226
Guaporé	6	2	1	2	0,00056
Paru	3	1	0	0	0,00000
Purus	3	1	0	0	0,00000
Xingu	1	1	0	0	0,00000
Madeira	3	1	0	0	0,00000
Trombetas	2	1	0	0	0,00000
Rio Doce	1	1	0	0	0,00000
Paraguai	9	2	6	0,222	0,00242
Paraná	7	4	3	0,810	0,00196
Filipinas	7	1	0	0	0,00000
Populações agrupadas	177	19	39	0,818	0,01287

A rede de haplótipos (Figura 1) contendo os 19 haplótipos correspondente as populações de *P. nattereri* estudadas, destaca-se a formação de pelo menos sete grupos sendo o primeiro grupo formado pelos haplótipos H16, H17, H18 e H19, que constituem a bacia do rio Paraná sendo este o grupo mais isolado em relação aos demais. O segundo grupo formado por sequências do rio Paraguai e o Terceiro por sequências do rio Guaporé, O quarto grupo, H4 e o mais frequente; formado por sequências do Itapecuru, Munim, Mearim, Pindaré, São Bento, Araguaia, Tocantins, Rio Doce e Paraguai junto com três pequenos grupos do Pindaré e Mearim sendo H5, H6 e H7. O Quinto grupo foi formado pelo H12 agrupando os espécimes de *Pygocentrus* das bacias do rio Branco, Tapajós, Amazonas, Purus, Paru, Xingú, Madeira, Trombetas e sequências de espécimes introduzidas em rios das Filipinas que possuem Proximidade genética com *P.nattereri* de bacias sul-americanas especificamente da região norte do Brasil como destacado por Mateussi *et al*. 2019.

Figura 1. Rede de haplótipos das populações de *P. nattereri* das bacias Hidrográficas estudadas em que cada haplótipo é representado por um círculo (cujo tamanho é proporcional à sua frequência total nas populações) com as diferentes cores representando cada uma das populações do estudo.



Fonte: Autor, 2025

Divergência genética

A partir das análises de distância genética baseada no modelo Kimura 2 Parâmetros, foram evidenciadas baixos indicies para as populações de *P. nattereri* das bacias hidrográficas estudadas, em que a divergência dentro dos grupos foi de 0 % o que era esperado pois os grupos são definidos como populações geneticamente semelhantes e entre grupos distintos verificou-se variação de 0,3 a 5,7% (Tabela 2).

A divergência entre o grupo 1 (Paraná) e os demais grupos foi elevada com valores acima de 5% de divergência genética, sendo o maior valor entre o grupo 1 e o grupo 7 (Itapecuru, Munim e Pindaré) com 5,7 % de divergência indicando alta distância genética entre esses grupos, muito pelo fato das Populações de *P. nattereri* do rio Paraná estarem distantes geograficamente das demais o que pode contribuir para a redução do fluxo gênico entre elas. Os grupos 6 e 7 apresentaram a menor divergência genética entre os grupos estudados com 0,3% , estes dados

sugerem que essas duas populações podem estar próximas geneticamente, possivelmente devido à proximidade geográfica ou a um fluxo gênico histórico, sugerindo alta similaridade genética, como descrito por Luz *et al*. (2015), em que devido à proximidade hidrográfica de duas bacias abordadas em seus estudos foi observado, uma proximidade genética, implicando em um elevado fluxo gênico entre essas bacias. Isso sugere que estratégias de conservação devam ser adotadas a fim preservar sua diversidade genética e seu fluxo gênico.

Tabela 2 - Divergência genética baseada no modelo Kimura 2 Parâmetros das populações da espécie *P. nattereri* dos Rios Parnaíba, Munim, Mearim, Pindaré, Itapecuru, São Bento, Buriti, Araguaia, Tocantins, Guaporé, Rio Branco, Tapajós e Amazonas gerada a partir do gene mitocondrial COI

	% DIVERGÊNCIA GENÉTICA						
Grupos	Grupo1	Grupo2	Grupo3	Grupo4	Grupo5	Grupo6	Grupo7
Grupo1	0						
Grupo2	5,1	0					
Grupo3	5,6	0,8	0				
Grupo4	5,4	1,3	1,3	0			
Grupo5	5,6	1,1	1,0	1,2	0		
Grupo6	5,5	1,7	1,9	1,6	1,0	0	
Grupo7	5,7	1,7	1,9	1,6	1,0	0,3	0

Grupo 1 (Paraná), Grupo 2 (Paraguai), Grupo 3 (Guaporé), Grupo 4 (Itapecuru +Pindaré +Mearim+ Tocantins +São Bento +Araguaia +Munim + Rio Doce + Filipinas), Grupo 5 (Paru + Purus + Amazonas + Madeira + Filipinas + Trombetas + Tapajós +rio Branco), Grupo 6 (Buriti+ Parnaíba), Grupo 7 (Itapecuru + Pindaré + Munim

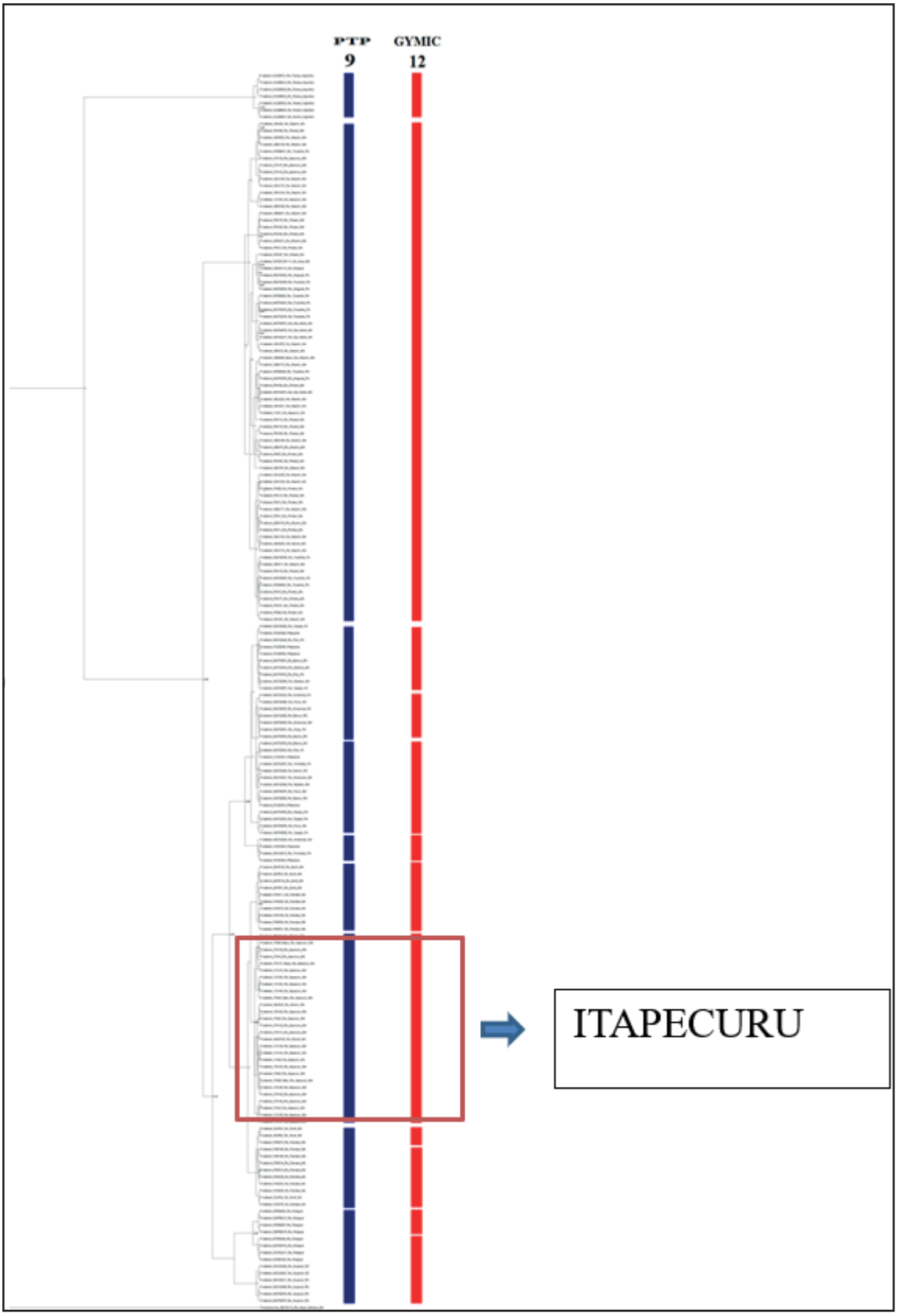
Métodos de delimitação

Os métodos de delimitação de espécies utilizados delimitaram nove MOTUs para o método GMYC e 12 MOTUs para o PTP (Figura 2). Os táxons das bacias dos rios Itapecuru e Munim apresentam formação de pelo menos duas linhagens distintas, sendo que dos sete clados formados dois deles possuem sequências analisadas dessas respectivas bacias agrupadas com espécimes de outras bacias como Pindaré e Mearim. Em seu trabalho Mateussi *et al.* (2019) identificou ocorrência de cinco linhagens bem definidas de *P. nattereri* das quais podemos destacar as sequências do rio Itapecuru que formaram linhagens bem definidas para os métodos de delimitação PTP, ABGD e GYMIC abordados em seu trabalho.

No presente trabalho foi evidenciado a formação de uma linhagem bem definida para os dois métodos de delimitação abordados em que as sequências ITAPE141, ITAPE 143, ITAPE 145 e ITAPE 147 junto com, MUN 30 foram agrupadas em um MOTUs separado das sequências do rio Pindaré PIN184, MUN204, ITAPE148, ITAPE136 e demais sequências do rio Itapecuru utilizadas por Mateussi *et al*. (2019) o que deixa evidente a formação de uma linhagem exclusiva para bacias dos rios Itapecuru, Munim e Pindaré (Figura 2).

Ambos os métodos de delimitação agruparam sequências do rio Guaporé Junto com sequências do rio Paraguai em duas MOTUs (Figura 2), o que pode ser explicado devido à proximidade das duas bacias e a um fluxo gênico intenso entre as populações das duas regiões. O uso dos métodos de delimitação molecular (PTP, GMYC) por Mateussi *et al.* (2019) permitiu a identificação de pelo menos sete linhagens distintas de *P. nattereri*. Nossos dados apontam para uma subdivisão ainda maior, especialmente no Nordeste do Brasil, onde linhagens genéticas distintas das previamente descritas foram identificadas.

Figura 2. Árvore de Inferência Bayesiana para o gene COI, utilizando o modelo HKY+I+G para a espécie *Pygocentrus nattereri* das bacias dos rios, Buriti, Itapecuru, Mearim, Munim, Parnaíba e Pindaré (Maranhão) e do Genbank



Fonte: Autor, 2025

Análise molecular de variância (Amova)

No primeiro cenário (sete grupos), 95.63% da variação genética ocorrem entre as populações. No segundo cenário (um grupo com todas as populações), 84.02% da variação genética ocorre entre as populações (Tabela 4). Isso indica uma forte estruturação genética entre as populações de *P.nattereri* , sugerindo que há diferenciação significativa entre os grupos analisados.

A alta porcentagem de variação entre populações (95.63 % e 84.02%) e os valores elevados de *FST* (0.95695 e 0.84959) (Tabela 4), indicam que as populações de *P. nattereri* estão geneticamente estruturadas. Com altos valores de diferenciação entre os grupos e uma **v**ariabilidade considerável dentro das populações. Esses resultados têm implicações importantes para a conservação da espécie e para estudos futuros sobre a história evolutiva e o fluxo gênico entre as populações.

Tabela 3. Resultados da AMOVA das Populações de *P. nattereri* analisadas para o gene COI

Tipo de variação	Componente da variação	% do total Variação	FST	p*
Entre grupos	Va (3.90007)	95.69494	0.95695	0.00000
Dentro das populações nos Grupos	Vb (0.17545)	4.30506		
Entre grupos	Va (2.85532)	84.95858	0.84959	0.00000
Dentro das populações nos Grupos	Vb (0.50552)	15.04142		

7 grupos (1 - Paraná; 2 - Paraguai; 3 - Guaporé; 4 - Mearim, Pindaré, Itapecuru, São Bento, Tocantins, Araguaia, Munim, Rio Doce, Paraguai; 5 - Rio Branco, Amazonas, Purus, Madeira, Xingu, Paru, Tapajós, Trombetas, Filipinas; 6 - Parnaíba, Buriti; 7 - Pindaré, Itapecuru, Munim

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com estudos anteriores que identificaram múltiplas linhagens de *P. nattereri* no Brasil, destacando a necessidade de estudos para entender a diversidade genética e a taxonomia da espécie. O estudo demonstrou que as populações de *P. nattereri* apresentam uma forte estruturação populacional, com evidências de linhagens crípticas e uma possível redução de fluxo gênico entre algumas bacias hidrográficas, principalmente em bacias hidrográficas maranhenses.

A formação de haplótipos exclusivos em determinadas bacias, como observado nos rios Itapecuru, Munim e Pindaré reforça a hipótese de que a redução de fluxo gênico possa estar influenciando na diversificação genética da espécie. A divergência genética intraespecífica foi baixa (0 a 0,3%), com bacias próximas apresentando alta similaridade genética, enquanto bacias mais distantes mostraram maior divergência (até 5,7%). Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores que destacaram a importância da proximidade geográfica na formação de grupos genéticos distintos.

Portanto, conclui-se que algumas populações de *P.nattereri*, principalmente as pertencentes as bacias hidrográficas maranhenses, estão em processo de diferenciação desta

forma apresentando populações bem estruturadas geneticamente e com redução de fluxo gênico, o que implica na adoção de estratégias de manejo e conservação com o intuito de preservar estas novas linhagens.

REFERÊNCIAS

INKSCAPE. (2022). Inkscape (versão 1.3) [Software de gráficos vetoriais]. Disponível em: https://Inkscape.org/.

BIGNOTTO, T. S. et al. Caracterização molecular e relações genéticas de sete espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Characiformes: Serrasalmidae) das bacias hidrográficas Paraná-Paraguai, São Francisco e Tocantins no Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, [S.l.], 2019.

BETANCUR-R. R. et al. Incongruência filogenômica, teste de hipóteses e amostragem taxonômica: A monofilia dos peixes characiformes. **Evolução**, v. 73, n. 2, pág. 329-345, 2019.

BANDELT, Hans-J. et al. Retratos mitocondriais de populações humanas usando redes medianas. Genetics, v. 141, n. 2, p. 743-753, 1995.

DARRIBA, D. et al. JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods,** v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

EXCOFFIER, Laurent; LISCHER, Heidi E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

FUJISAWA, Tomochika; BARRACLOUGH, Timothy G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. **Systematic biology**, v. 62, n. 5, p. 707-724, 2013.

HALL, Tom A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. 1999. p. 95-98.

HEBERT, P.D.N.; A. CYWINSKA, S.L.; WAARD. J.R. Biological identifications through

DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 270, p. 313-322, 2003.

LIMA, R. C. et al. **Identificação de espécimes de peixes do Rio Tocantins, Brasil, usando código de barras de DNA**. **Journal of Fish Biology**, v. 104, n. 6, p. 1924-1939, 2024.

LUZ, Luciana Alves da et al. Genetic differentiation in the populations of red piranha, Pygocentrus nattereri Kner (1860)(Characiformes: Serrasalminae), from the river basins of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 838-845, 2015.

KIMURA, Motoo. Relógio evolucionário molecular e a teoria neutra. **Journal of molecular evolution** , v. 26, p. 24-33, 1987.

KUMAR, P. ; NAGARAJAN, A; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. **Cold Spring Harb. Protoc**, v. 2018, n. 6, p. 465-468, 2018.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSPv5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, v. 25, p. 1451-1452. 2009

MACHADO, V. N. et al. Mil códigos de barras de DNA de piranhas e pacus revelam estrutura geográfica e diversidade não reconhecida na Amazônia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 8387, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-26550-x.

MATEUSSI, Nadayca TB et al. Molecular data reveal multiple lineages in piranhas of the genus Pygocentrus (Teleostei, Characiformes). **Genes**, v. 10, n. 5, p. 371, 2019.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, Terri. The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. In: **Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: extreme digital discovery**. 2011. p. 1-8.

PUILLANDRE, Nicolas; BROUILLET, Sophie; ACHAZ, Guillaume. ASAP: assemble species by automatic partitioning. Molecular Ecology Resources, v. 21, n. 2, p. 609-620, 2021.

ROZAS, Julio et al. DnaSP 6: Análise de polimorfismo de sequências de DNA em grandes conjuntos de dados. **Biologia molecular e evolução**, v. 34, n. 12, p. 3299-3302, 2017

SARMIENTO, KP; Ventolero, MFH; Santos, MD Identificação de piranha vermelha proibida,Pygocentrus nattereri (Kner 1858) de peixes juvenis confiscados em Manila, Filipinas.Int. J. Philipp. Ciência. Tecnologia.2016,9, 7.

SUCHARD, Marc A. et al. Integração de dados filogenéticos e filodinâmicos bayesianos usando BEAST 1.10. **Virus evolution** , v. 4, n. 1, p. vey016, 2018

STAMATAKIS, Alexandros. RAxML versão 8: uma ferramenta para análise filogenética e pós-análise de grandes filogenias. **Bioinformatics** , v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

TOLEDO-PIZA, Mônica et al. Checklist das espécies da Ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi). **Neotropical Ichthyology** , v. 22, n. 1, p. e230086, 2024.

WARD, R.D., ZEMLAK, T.S., INNES, B.H., LAST, P.R. and HEBERT, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal

VENABLES, W. N.; SMITH, D. M. An introduction to R software. 2021.

ZHANG, J. et al. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869-2876, 2013.