

MONITORAMENTO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS REPRODUTORES E DA PROGÊNIE DE *Piaractus mesopotamicus* OBTIDA PELO SISTEMA SEMINATURAL

Nelson Mauricio Lopera-Barrero, Danilo Pedro Streit Junior, Rodolfo Nardez Sirol, Ricardo Pereira Ribeiro, Jayme Aparecido Povh*, Lauro Vargas, Patrícia Cristina Gomes, Tais da Silva Lopes, Carolina Beshpalhok Jacometo e Danielly Veloso Blanck

*Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR. E-mail: jpovh@hotmail.com

Resumo

A construção de barragens exige a adoção de medidas que reduzam os impactos sobre as populações de peixes durante e após a formação do reservatório. Uma das medidas mais utilizadas para contornar impactos tem sido a implantação de programas de repovoamento. Embora essa prática seja uma importante ferramenta que pode ser utilizada na conservação da biodiversidade, a falta de respaldo científico e de monitoramento genético pode torná-la um fator negativo que pode alterar outras populações naturais e o balanço biológico nas regiões onde é realizada. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi estimar a diversidade genética de um estoque de *Piaractus mesopotamicus* destinado para programas de repovoamento no rio Paranapanema - SP, utilizando o sistema seminatural, através do marcador molecular RAPD. A diversidade genética obtida para os reprodutores de *P. mesopotamicus* foi alta. Contudo, o manejo reprodutivo seminatural promoveu uma grande redução da variabilidade genética e aumento da similaridade genética na progênie.

Introdução

Apesar da grande importância dos peixes para o homem, pouco se conhece da sua diversidade e estima-se que 20% da ictiofauna de água doce do mundo estejam extintos ou ameaçados (Hilsdorf & Petrere Jr., 2002). Devido a isto, a aplicação de processos e estratégias de monitoramento e a exploração controlada de diversas biotecnologias e modelos de repovoamento devem ser propostos e usados.

P. mesopotamicus, conhecido como pacu, caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu, pertence à ordem Characiformes, família Characidae (Nakatani et al., 2001), é uma espécie originária das Bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Urbinati & Gonçalves, 2005) que vem apresentando uma redução drástica das suas populações naturais. O desaparecimento das populações é devido à severa alteração do habitat por causa de mudanças climáticas e principalmente, pela contaminação e modificação do meio ambiente pelo homem. Para contornar este problema, na conservação de espécies de peixes de água doce têm sido tradicionalmente usados programas de repovoamento.

De maneira geral, o repovoamento é uma prática válida para recuperar as populações de peixes, mas deve ser acompanhada de medidas de saneamento e proteção do habitat onde as progênies serão colocadas e de estudos que determinem a variabilidade genética dos estoques de reprodutores e suas progênies. Porque o repovoamento pode representar riscos genéticos nas populações naturais (Waples, 1999), é necessário o desenvolvimento de manejos genéticos de progênies que direcionem os potenciais riscos genéticos para ações específicas de manejo, incluindo a seleção dos reprodutores, acasalamentos, sistemas reprodutivos usados e práticas de criação e liberação.

Para esse objetivo, os marcadores moleculares, entre eles o RAPD, tem se mostrado eficientes e podem ser usados como ferramentas na determinação da diversidade genética de populações naturais e estoques mantidos em cativeiro. O marcador RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR com duas características distintivas: utiliza um *primer* único e de seqüência arbitrária e, portanto, sua seqüência alvo é conhecida (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Ali et al., 2004). Cada *primer* pode sintetizar vários fragmentos de DNA em diversos pontos do genoma, resultando assim na visualização de várias bandas no gel (Dinesh et al., 1993) razão pela qual gera um alto polimorfismo dos indivíduos ou populações analisadas (Oliveira et al., 2002).

Desse modo, o propósito do presente estudo foi estimar a diversidade genética de um estoque de *P. mesopotamicus* destinado para programas de repovoamento no rio Paranapanema - SP, utilizando o sistema reprodutivo seminatural, através do marcador molecular RAPD.

Material e Métodos

Foram usados 75 reprodutores (50♂ e 25♀) de *P. mesopotamicus* provenientes da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da DUKE ENERGY INTERNATIONAL (Geração Paranapanema), localizada na cidade de Salto Grande, SP, Brasil.

Os peixes foram conduzidos para o laboratório e induzidos a reprodução com extrato de hipófise de carpa segundo a metodologia descrita por Woynarovich & Horváth (1983). As fêmeas receberam 5,5 mg extrato de hipófise/kg de peixe vivo, divididos em duas aplicações, sendo 10% do total na primeira e, 24 horas depois, os 90% restantes; os machos receberam uma dose única concomitante com a segunda aplicação nas fêmeas, com a posologia de 2,5 mg de extrato de hipófise/kg de peixe vivo.

Após a indução hormonal e coleta de nadadeira, os reprodutores foram colocados em dois tanques circulares, com um raio de 5,1 m, 2,0 m de profundidade, um fluxo de água contínuo (131 L/s) em dois sentidos de vazão e um escoamento de água na porção central, que permitia a saída dos ovos para uma incubadora cilindro-cônica de 200 litros com fluxo contínuo (7 L/s). A função desta incubadora de captação é reter os óvulos obtidos na reprodução para em seguida estes serem levados a incubadoras individuais do tipo cilindro cônico. Este sistema de desova conhecido como seminatural foi descrito por Zaniboni-Filho & Nuñez (2004). Foi estabelecido um período de coleta de no máximo seis horas, com coleta e retirada dos óvulos a cada hora da incubadora de captação e, em seguida, foram conduzidos para as incubadoras do tipo cilindro cônico.

Três dias após a eclosão das larvas, 95 larvas foram coletadas e armazenadas em microtubos e conservadas em álcool para posterior extração e amplificação do DNA pelo marcador molecular RAPD. As larvas foram coletadas de forma aleatória de todas as incubadoras e em todos os horários de coleta durante as seis horas.

Para extração de DNA, tanto para as larvas (inteiras) quanto para os reprodutores (fragmentos de nadadeira caudal de aproximadamente 300 mg), foi utilizando a metodologia descrita por Aljanabi & Martinez (1997), modificada por Lopera-Barrero et al. (2007). Nos microtubos com as larvas e com as nadadeiras, foram adicionados 550 µL de tampão de lise (50 mm de Tris-HCl, 50 mm de EDTA, 100 mm de NaCl e 1% de SDS) e 7 µL de proteinase K (200 µg/mL). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C *overnight*.

Posteriormente, o DNA foi purificado com 600 μL de cloreto de sódio (5 M) e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos (600 μL), sendo o DNA precipitado com 700 μL de etanol absoluto, e permaneceu incubado por uma hora a -20°C . Em seguida, o DNA foi centrifugado, lavado com 700 μL de etanol 70% e ressuspendido em tampão TE - 10 mm de Tris pH 8,0 e 1 mm de EDTA –(80 μL para nadadeira e 35 μL para larva), sendo posteriormente tratado com 7 μL de RNase (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em banho-maria a 37°C por uma hora, e em seguida estocado no freezer a -20°C .

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu com absorvância de 260 nm. Posteriormente, as amostras foram diluídas para uma concentração de 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (reprodutores) e 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (larvas). Para checar a qualidade do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% e conduzida em tampão TBE 1X (500mM de Tris-HCl, 60mM de ácido bórico e 83mM de EDTA) por uma hora a 70 volts. O gel foi revelado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a imagem foi capturada por um sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

O DNA foi amplificado em um volume de reação de 15 μL , no qual se utilizou tampão 1X Tris-KCl, 2,5mM de MgCl_2 , 0,46 μM de primer, 0,2mM de cada dNTP, uma unidade de Platinun *Taq* DNA Polimerase, 10 ng de DNA para os reprodutores e 5 ng de DNA para larvas.

Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida foram realizados 40 ciclos, cada um consistindo de: um minuto de desnaturação a 94°C , um minuto e 30 segundos de anelamento a 40°C e dois minutos de extensão a 72°C , após realizou-se uma extensão final a 72°C por cinco minutos. As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler[®] Gradient”. Foi avaliada a amplificação de 60 diferentes oligonucleotídeos (*primers*) de 10 bases, dos Kits OPA OPX e OPW (Operon Technologies Ltd.), sendo escolhidos os que apresentaram melhor padrão de amplificação. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 0,5X (45mM de Tris-Borato e 1mM de EDTA) por quatro horas a 70 volts. A imagem foi capturada por um sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

O tamanho dos fragmentos obtidos com as ampliações foi estimado por comparação com o padrão ladder 100 pb.

A variabilidade genética foi determinada pelo Índice de diversidade genética de Shannon e pela porcentagem de fragmentos polimórficos através do programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999). Os valores de divergência genética foram obtidos e calculados usando o teste de Mantel pelo método de Monte Carlo através do programa Mantel-Struct (Miller, 1999).

Resultados e Discussão

Por apresentarem um melhor padrão na amplificação, os *primers* OPA01, OPA02, OPA04, OPA16, OPW01, OPW02, OPW03, OPW04, OPW08, OPW13, OPW19 e OPX01 foram escolhidos para as análises. O número de fragmentos variou de sete (*primers* OPW13 e OPX01) a 13 (*primer* OPW19), com tamanho entre 350 pb (*primer* OPW19) e 2200 pb (*primers* OPA16, OPW02, OPW03, OPW08 e OPW19). Foram encontrados no total 105 fragmentos, dos quais 81 (77,14%) foram polimórficos.

O valor de índice de Shannon de 0,4390 e a porcentagem de fragmentos polimorfismo de 75,24% indicaram alta variabilidade genética nos reprodutores. Estes valores são superiores ao obtido por outros estoques de peixes nativos, como se pode observar nos trabalhos de Wasko et al. (2004) e Povh et al. (2007).

Também estudando a espécie *P. mesopotamicus* no sistema seminatural, Povh (2007) constatou que somente seis de nove fêmeas e sete machos de 11 participaram da reprodução, no entanto, foi mantida a variabilidade genética na progênie. Contudo, no presente trabalho a progênie apresentou valores de índice de Shannon (0,2242) e locos polimórficos (38,10%) bastante inferiores ao encontrado nos reprodutores. A razão sexual de dois machos para uma fêmea, e o grande número de reprodutores colocados dentro do tanque de reprodução (75 reprodutores), são fatores que podem ter contribuído para a perda da variabilidade genética na progênie. Estes podem ter reduzido o número efetivo de reprodutores (N_e), devido à participação de poucos animais na reprodução ou contribuição diferencial destes com descendentes na progênie, o que levaria a perda da variabilidade genética. Isto foi observado por Porta et al. (2006a) após estudar *Solea senegalensis* em sistema seminatural. Estes autores concluíram que a participação de apenas uma fêmea e dois machos ($N_e = 2,67$) na reprodução seminatural, de um total de 11 machos e nove fêmeas ($N_e = 19,8$), foi o fator responsável por promover a redução da variabilidade genética dos parentais em relação à progênie. De qualquer forma, não se pode descartar no presente trabalho a possibilidade de erro amostral.

A divergência genética observada entre os reprodutores (0,1677) foi maior do que a observada entre os indivíduos da progênie (0,0899), demonstrando que o processo reprodutivo levou a um aumento da similaridade entre os indivíduos. Este efeito de afunilamento genético (efeito *bottleneck*) tende a reduzir ainda mais a variabilidade genética nas gerações subsequentes (Sekino et al., 2004). Isto foi constatado por Porta et al. (2006b) na reprodução seminatural de *Solea senegalensis*, em que os autores observaram, após análise de três gerações, grande redução da variabilidade genética já da primeira para a segunda geração.

Embora o sistema de reprodução seminatural possa proporcionar um menor estresse nos peixes em comparação com o sistema por extrusão e, dessa forma, aumentar a eficiência reprodutiva (Sirol & Britto, 2006), talvez o razão sexual de dois machos para uma fêmea, e o grande número de reprodutores colocados no tanque para reprodução, sejam os principais fatores que conduziram a uma grande redução da variabilidade genética na progênie.

Conclusão

A diversidade genética obtida para os reprodutores de *P. mesopotamicus* foi alta. Contudo, o manejo reprodutivo seminatural promoveu uma grande redução da variabilidade genética e aumento da similaridade genética na progênie.

Agradecimentos

Os autores agradecem a empresa de geração de energia hidroelétrica Duke Energy Internacional pelo apoio ao presente trabalho.

Referências

- ALI, B.A.,]; HUANG, T.H.; QIN, D.N.; WANG, X.M. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 14, p. 443–453, 2004.
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, v. 25, p. 4692-4693, 1997.
- DINESH, K.R.,]; LIM, T.M.; CHUA, K.L.; CHAN, W.K.; PHANG, V.P. RAPD analysis: an efficient of DNA fingerprinting in fisher. *Zoological Science*, v. 10, p. 849-854, 1993.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª edição. EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20. p 220, 1998.
- HILSDORF, A.; PETRERE JR, M. Conservação de peixes na bacia do rio do Paraíba do Sul. *Revista Ciência Hoje*, v. 30, p. 62-65, 2002.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; RIBEIRO, R.P.; JACOMETO, C.B.; LOPES, T. S. Comparison of DNA extraction protocols from preserved fish fins and larva for PCR amplification: modified salt extraction. *Genetics and Molecular Biology* (In submission), 2007.
- MILLER, M. MANTEL-ESTRUCT: a program for the detection of population structure via mantel tests. *J. Heded*, v. 90, p. 258-259, 1999.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C. VANELLI, C.S. *Ovos e larvas de peixes de água doce*. Maringá: EDUEM. p. 378, 2001.
- OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; PAVANELLI, C.S.; JÚLIO JR, H.F., PANARARI, R.S. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. *Genetica*, v. 115, p. 259-267, 2002.
- PORTA, J.; PORTA, J.M.; MATÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. et al. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture*, v.256, p.159-166, 2006a.
- PORTA, J.; PORTA, J.M.; MATÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. et al. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, v. 251, p. 46-55, 2006b.
- POVH, J.A. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, 75p. 2007.
- SEKINO, M.; SUGAYA, T.; HARA, M. et al. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, v.233, p.163-172, 2004.

SIROL, R.N.; BRITTO, S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Eds.). *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. RiMA, São Carlos, p. 275-284, 2006.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. *Pacu (Piaractus mesopotamicus)*. In: BALDISSEROTTO, B. AND GOMES, L.C. (Ed.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM. p. 225-246, 2005.

WAPLES, R.S. Dispelling some myths about hatcheries. *Fisheries*, v. 24, p. 12–21, 1999.

WASKO, A.P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchá (Brycon cephalus) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 20, p. 48–52, 2004.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: Escopo. pp. 220. 1983.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. POPGENE Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. TecArt, São Paulo, 533 p. 2004.