

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTOQUES DE *Prochilodus lineatus* DESTINADOS A PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO, ATRAVÉS DO MARCADOR RAPD

Nelson Maurício Lopera-Barrero, Taís da Silva Lopes*, Ricardo Pereira Ribeiro, Patrícia Cristina Gomes, Jayme Aparecido Povh, Carolina Bernal Jacometo, Sheila Nogueira de Oliveira, Danilo Pedro Streit Junior, Lauro Vargas e Danielly Veloso Blanck

*Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR. E-mail: tslopeszoo@yahoo.com.br

Resumo

A utilização de programas de repovoamento como estratégia de conservação tem se mostrado importante na manutenção de populações naturais que estejam em iminente risco de extinção. Para verificar a correta aplicação desses programas em ambientes impactados pelo homem é necessário um monitoramento reprodutivo, biológico e genético que garanta o sucesso do repovoamento. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi estimar a diversidade genética de três estoques de reprodutores de curimba (*Prochilodus lineatus*), destinados para programas de repovoamento, mediante a utilização do marcador molecular RAPD. Os resultados da variabilidade genética e da diferenciação genética mostraram uma semelhança entre os estoques de curimba, promovida possivelmente pelo efeito fundador do estoque e pelo número efetivo de reprodutores (N_e). Estes resultados são de grande importância na conservação desta espécie nos rios brasileiros, já que suas populações naturais estão diminuindo drasticamente pela modificação e alteração do meio ambiente por mudanças climáticas e pela ação do homem.

Introdução

O curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), conhecido também pelo nome de curimatá, grumatã ou papa-terra, é uma espécie migratória, de desova total, de fecundação externa sem cuidado parental e de hábito alimentar iliófago. Pertencente à Ordem Characiformes, sendo um peixe endêmico das bacias formadas pelos rios Paraná e Paraguai, atualmente apresenta uma diminuição do número de populações naturais.

Uma das ferramentas utilizadas atualmente na conservação da ictiofauna dos rios é a implantação de programas de repovoamento. Apesar destes programas serem aceitos pela sociedade e parte da comunidade científica, é primordial o monitoramento genético e biológico desses programas, já que o repovoamento pode representar riscos genéticos nas populações naturais (Waples, 1999). Pois, quando é utilizado sem o acompanhamento científico, é necessário o desenvolvimento de manejos genéticos de progênes que direcionem os potenciais riscos genéticos para ações específicas do manejo, incluindo a seleção dos reprodutores, acasalamentos e práticas de criação e liberação.

Outro fator que influencia os estoques mantidos em cativeiro é a diminuição da variabilidade genética devido ao efeito do acasalamento entre indivíduos aparentados, que por representar só uma pequena amostra da população natural, intensificam seu efeito de forma que o componente genético dos descendentes vai se homogeneizando, até diferir das populações naturais (Pineda-Santis, 2004).

Os marcadores moleculares têm apresentado eficiência na determinação da diversidade genética de populações naturais e estocadas utilizadas em programas de

piscicultura ou de repovoamento dos rios. Entre os vários marcadores moleculares desenvolvidos nos últimos anos, o marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é um dos mais usados em estudos de genética de peixes (Liu & Cordes, 2004), devido ao seu alto potencial de detecção de polimorfismo (Asensio et al., 2001); possibilita a análise simultânea de muitas amostras e com cobertura de grandes áreas do genoma (Gomes et al., 1998), não utiliza equipamentos muito sofisticados ou radioisótopos (Glienke-Blanco, 1999), necessita de quantidades diminutas de tecido, proporcionando uma possibilidade de coleta de amostra não invasiva e sem necessidade de sacrifício do animal (Elo et al., 1997).

O objetivo deste estudo foi estimar a diversidade genética de três estoques de curimba (*Prochilodus lineatus*), destinados para programas de repovoamento do rio Paraná, mediante a utilização do marcador molecular RAPD.

Material e Métodos

Foram coletadas 30 amostras de nadadeira caudal (0,5 cm² aproximadamente) de cada um dos três estoques de curimba (A, B e C) utilizados para programas de repovoamento do rio Paraná. Imediatamente as amostras foram armazenadas em microtubos e conservadas em álcool comum para posterior extração e amplificação do DNA pelo marcador molecular RAPD.

Para extração de DNA, foi utilizada a metodologia descrita por Aljanabi e Martinez (1997), modificada por Lopera-Barrero et al., (2007). Nos microtubos foram adicionados 550µL 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 ressuspensionado 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 µg/mL) em banho-maria a 37°C por uma hora, e em seguida foi 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 ng/µl. 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 µg/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, 2,5 mM de MgCl₂, 0,46 µM de primer, 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de Platinun *Taq* DNA Polimerase e 10 ng de DNA alvo. 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 1 mM 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 amplificações 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).

A diferenciação genética entre os indivíduos de cada população foi determinada pela diversidade genética de Nei (1973) (G_{st}), através do programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999). Para a determinação do nível de diferenciação estabeleceu-se a definição proposta por Wright (1978), em que valores entre 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25; e maior que 0,25; indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética, respectivamente. A similaridade genética foi obtida com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard. Utilizou-se para essa análise o programa NTSYS 1.7 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 1989).

Resultados e Discussão

Foram escolhidos os *primers* OPA01, OPW02, OPW03, OPW08, OPW13, OPW19 e OPX01 por apresentarem um melhor padrão na amplificação. O número de fragmentos variou de nove (*primers* OPW08 e OPW19) até 13 (*primers* OPA01 e OPW02). Foram encontrados no total 77 fragmentos com um tamanho entre 350 pb (*primers* OPA01, OPW03 e OPX01) e 2200 pb (*primers* OPA01 e OPX01). Destes fragmentos 71 (92,21%) foram polimórficos.

A porcentagem de fragmentos polimórficos, 83,12%, 85,71% e 81,82% para os estoques A, B e C, e os resultados do Índice de diversidade de Shannon, 0,4732, 0,4981 e 0,4627 para os estoques A, B e C respectivamente, mostraram uma variabilidade genética semelhante entre os três estoques. Possivelmente devido ao efeito fundador, em função que os três estoques terem sido formados a partir de populações naturais coletadas no rio Paraná, podendo desta forma apresentar similaridade entre os indivíduos.

Os resultados de diferenciação genética (G_{st}) entre os estoques (0,0606), valor que sugere moderada diferenciação genética segundo a definição de Wright (1978), mostra a existência de semelhança genética entre os indivíduos de cada estoque. A redução da variabilidade genética pode promover uma menor tolerância às mudanças ambientais, podendo afetar o crescimento (Moreira, 2001), a reprodução (Porta et al., 2006) e inclusive levar uma espécie à extinção (Oliveira et al., 2002). Desta forma, a manutenção da variabilidade genética é de grande importância para a conservação das espécies (Barroso et al., 2005). Técnicas de manejo, conservação e produção de peixes, por exemplo, dependem do conhecimento da variação genética da unidade reprodutiva (Carvalho, 1993).

Os resultados da similaridade genética (0,6837, 0,6796 e 0,6665 para os estoques A, B e C, respectivamente) foi encontrada uma semelhança entre os três estoques, confirmando a existência de um possível parentesco entre eles.

Outra explicação da semelhança genética encontrada entre os estoques pode ser devida ao tamanho efetivo da população (N_e), que geralmente na formação de estoques para

piscicultura e para programas de repovoamento é pequeno. Populações utilizadas em programas de pisciculturas ou de repovoamento devem ser fundadas a partir de um número suficientemente grande de indivíduos (Allendorf & Ryman, 1987) a fim de evitar-se uma redução importante no tamanho efetivo da população (N_e). Populações grandes fundadas a partir de grupos pequenos ou com contribuição desigual de progenitores podem exibir um N_e baixo (Briescoe et al., 1992). Baixos tamanhos efetivos populacionais são provavelmente uma das mais importantes causas da perda de variabilidade genética, em função da deriva genética (Frankham, 1996).

Um programa de piscicultura bem planejado deve evitar uma grande quantidade de mudança genética associada ao manejo reprodutivo e à formação dos estoques. Entretanto, apenas através de um programa de monitoramento genético utilizando, por exemplo, o marcador RAPD, é possível verificar se estas mudanças estão ocorrendo.

Conclusão

Os resultados da variabilidade genética mostraram uma semelhança genética dos estoques de curimba (*Prochilodus lineatus*), promovida possivelmente pelo efeito fundador do estoque e pelo número efetivo de reprodutores (N_e).

Referências

- 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.
- ALLENDORF, E W.; RYMAN, N. Genetic management of hatchery stocks. In: RYMAN, N.; UTTER, F. (Eds.), University of Washington Press, Seattle and London, p. 141- 159. 1987.
- ASENSIO, L.; GONZÁLEZ, I.; FERNÁNDEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.A.; HERNANDEZ, P.E.; GARCIA, T.; MARTÍN, R. PCR-SSCP: A simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), Wreck Fish (*Polyprion americanus*), and Nile Perch (*lates niloticus*) fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 1720-1723, 2001.
- BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M.; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, Y. Genetic diversity of wild and cultured populations of Brycon opalinus (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiaie) using microsatellites. *Aquaculture*, v. 247, p. 51-65, 2005.
- BRIESCOE, D.A.; MALPICA, J.M.; ROBERTSON, A.; SMITH, G.J.; FRANKHAM, R.; BANKS, R.G; BARKER, J.S.F. Rapid loss of genetic variation in large captive populations of Drosophila flies: implications for the genetic management of captive populations. *Conservation Biology*, v. 6, p. 416-425, 1992.
- CARVALHO, G.R. Evolutionary aspects of fish distribution: Genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*, v. 43, p. 53-73, 1993.
- ELO, K.; IVANOFF, S.; VUORINEN, J.A.; PIRONEN, J. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic Salmon. *Aquaculture*, v. 152, p. 55-65, 1997.

- FRANKHAM, R. Relationship of genetic variation to populations size in wildlife. *Conservation Biology*, v. 10, p. 1500-1508, 1996.
- GLIENKE-BLANCO, C. *Guignardia citricarpa* Kieli: análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Tese (Doutorado). Escola Superior Agrícola Luiz de Queiroz-USP, Piracicaba, 92 p, 1999.
- GOMES, C.; DALES, R.B.G.; OXFENFORD, H.A. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 1029-1039, 1998.
- LIU, Z.J.; CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, v. 238, p. 1-37, 2004.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; RIBEIRO, R.P.; JACOMETO, C.B.; LOPES, T. D.A.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.
- MOREIRA, H.L.M., 2001. Genética e melhoramento de peixes. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. and ZIMMERMANN, S. (Eds.). Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: ULBRA. pp. 135-147.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 70, p. 3321-3323, 1973.
- 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. 259-257, 2002.
- PINEDA-SANTIS, H.R. Estudio genético de las cachamas (subfamilia Serrasalminae) en poblaciones naturales y en cautiverio en Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, v. 17, p. 62-63, 2004.
- PORTA, J.; PORTA, J.M.; MATÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; ALVAREZ, M.C. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, v. 251, p. 46-55, 2006.
- ROHLF, F.J. NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Exeter Publishers, 1989.
- WAPLES. R.S. Dispelling some myths about hatcheries. *Fisheries*, v. 24, p. 12-21, 1999.
- WRIGHT, S. Evolution and genetics of populations. University of Chicago Press, Chicago, 511 p, 1978.
- 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.