

EFEITO DA REPRODUÇÃO PELO SISTEMA POR EXTRUSÃO NA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Piaractus mesopotamicus*

Jayme Aparecido Povh*, Ricardo Pereira Ribeiro, Rodolfo Nadez Sirol, Danilo Pedro Streit Junior, Patrícia Cristina Gomes, Nelson Mauricio Lopera-Barrero, Lauro Vargas, Taís da Silva Lopes, Carolina Bessalho Jacometo e Sheila Nogueira de Oliveira

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

Resumo

O manejo reprodutivo pode, em uma única geração, promover grande perda da variabilidade genética. Dessa forma, o monitoramento genético dos estoques de peixes é um recurso importante para a manutenção da variabilidade genética, parâmetro fundamental para possibilitar o melhoramento assim como para a conservação genética. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética das progênies de *Piaractus mesopotamicus* obtidas pela fertilização dos ovócitos de uma fêmea com sêmen um único macho e com um *pools* de sêmen de cinco e dez machos, através do marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Os resultados obtidos mostram que os dois *pools* de sêmen apresentaram valores de diversidade genética semelhante. Embora a diversidade genética na progênie obtida com o macho 2 tenha sido inferior ao obtido com os *pools* de sêmen, a progênie obtida pelo macho 1 apresentou diversidade bastante superior a estes, provavelmente devido ao efeito da endogamia. O emprego de *pools* de sêmen pode minimizar o impacto na perda da variabilidade genética na progênie quando não se tem o controle dos estoques. Contudo, fica evidente que a fertilização dos ovócitos com sêmen de um único macho (acasalamentos direcionados - um macho x uma fêmea) pode proporcionar alta variabilidade genética na progênie caso estes não apresentem alto grau de relacionamento genético.

Introdução

A produção de alevinos muitas vezes é proveniente de poucos casais, principalmente devido à alta prolificidade dos peixes (Povh et al., 2006a). Dessa forma, o manejo reprodutivo pode, em apenas uma geração, promover grande perda da variabilidade genética (Porta et al., 2006b).

A variabilidade genética confere aos peixes capacidade adaptativa às mudanças ambientais (Falconer, 1987), resistência às doenças e ainda pode afetar o crescimento (Moreira, 2001) e a reprodução (Porta et al., 2006a). Portanto, a manutenção deste parâmetro é fundamental para qualquer estratégia de melhoramento e de conservação genética (Sirol & Britto, 2006). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética das progênies de *Piaractus mesopotamicus* obtidas pela fertilização dos ovócitos de uma fêmea por sêmen um único macho e por *pools* de sêmen de cinco e dez machos, através do marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Material e Métodos

Sêmen de 10 machos foram congelados, após análise seminal quali-quantitativa. Para congelamento uma alíquota de 2 ml do sêmen foi diluída na proporção de 1:3 (sêmen/solução + crioprotetor) no diluente gema de ovo (sem a camada perivitelínica) (20%), dimetil-sulfóxido (10%), glicose (5%) e completado para 100 ml com água destilada. As alíquotas

homogeneizadas foram envasadas em “pallets” de 0,25 ml, esterilizados e identificados. Em média produziu-se 32 “pailletts”/animal. Os “pallets” foram colocados em “globelets” de metal, fixados nas “racks” e, em seguida, estocados no “canister” de um botijão com vapor de nitrogênio do tipo “dry shipper”, a -16°C . Após 18 horas no botijão “dry shipper”, as “racks” contendo as amostras de sêmen congeladas foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido para estocagem, a uma temperatura de -196°C .

Para avaliação da progênie de *P. mesopotamicus* a ser obtida pela fertilização dos ovócitos de uma fêmea procedeu-se conforme o esquema da Figura 1. Os ovócitos foram divididos em quatro partes iguais, sendo que duas partes foram fertilizadas com o sêmen criopreservado de dois machos diferentes e as outras duas partes por *pools* de sêmen de cinco machos e de dez machos, respectivamente. Um total de 11 reprodutores foi utilizado no experimento (uma fêmea e 10 machos).

Os reprodutores que participaram das fertilizações individuais e do *pool* de sêmen de cinco também participaram do *pool* de sêmen criopreservado com de 10 machos. Tomou-se o cuidado de utilizar o sêmen criopreservado, em função de garantir uma igual proporção de espermatozóides quando da utilização do *pool* de sêmen criopreservado. Ou seja, procedeu-se além da avaliação da motilidade progressiva e do vigor espermático dos espermatozóides, também a concentração dos espermatozóides. De antemão sabia-se qual a concentração de cada amostra de sêmen congelada a ser utilizada. Desse modo, quando foi utilizado o *pool* de sêmen acrescentou uma proporção equitativa de espermatozóides das amostras congeladas dos 10 machos utilizados.

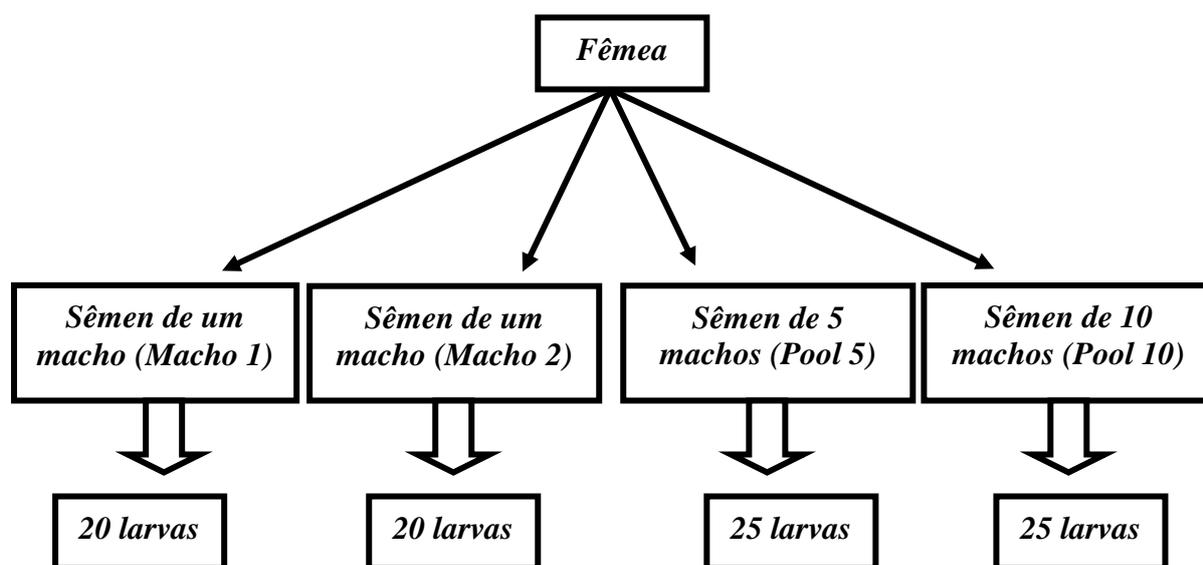


Figura 1. Delineamento do experimento de fertilização dos ovócitos de uma fêmea com sêmen de apenas um macho (Macho 1 e Macho 2) e com *pools* de sêmen de cinco (*Pool 5*) e dez (*Pool 10*) machos de *P. mesopotamicus*.

Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita por Aljanabi e Martinez (1997) modificada por Povh et al. (2006b). O DNA foi quantificado por comparação com concentrações de DNA fago λ conhecidas em gel de agarose 1%, revelado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40mM de Tris-acetato e 1mM de EDTA) por uma hora a 70 volts. 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 μ L, no qual se utilizou 1X de tampão Tris-KCl, 2,0 mM de MgCl₂, 0,46 μ M de *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de *Taq* DNA Polimerase e 10 ng de DNA. Foram avaliados 60 *primers* do Kit OPA, OPX e OPW da Operon (Operon Technologies Ltd.). 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 trinta segundo de anelamento a 40°C e dois minutos de extensão a 72°C, após realizou-se uma extensão final a 72°C por sete minutos. As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”.

A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 0,5X (45 mM 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 ampliações foi estimado por comparação com o padrão ladder 100 pb. A variabilidade genética foi determinada pela porcentagem de fragmentos polimórficos (polimorfismo) e pelo índice de diversidade genética de Shannon, sendo estes obtidos através do programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999).

A divergência genética entre os indivíduos de cada uma das progênes foi analisada com o teste de Mantel com base no coeficiente de Jaccard, sendo as correlações entre as matrizes foram estimadas pelo teste de Mantel com 10000 permutações utilizando método Monte Carlo. Essa análise foi realizada através do programa Mantel-Struct (Miller, 1999).

Resultados e Discussão

Os oito *primers* selecionados para análise da variabilidade genética foram: OPA01 (CAG GCC CTT C), OPA02 (TGC CGA GCT G), OPA16 (AGC CAG CGA A), OPW01 (CTC AGT GTC C), OPW02 (ACC CCG CCA A), OPW03 (GTC CGG AGT G), OPW19 (CAA AGC GCT C), OPX02 (TTC CGC CAC C). Esses geraram 87 fragmentos, com tamanho das bandas entre 300 e 2400 pb. O número de fragmentos por *primer* variou de oito a 14.

O número de fragmento polimórficos, o índice de Shannon e a divergência genética nas progênes obtidas pela fertilização dos ovócitos com sêmen de um único macho (M1 e M2) e com pools de sêmen de cinco e dez machos, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem de locos polimórficos, índice de Shannon e divergência genética das progênes obtidas com a fertilização dos ovócitos de uma fêmea com sêmen de apenas um macho (M1 e M2) e com *pools* de sêmen de cinco e dez machos (*Pool 5* e *Pool 10*)

Populações (Nº de amostras)	Polimorfismo	Índice de Shannon	Divergência genética
M1 (20)	71,26	0,378	0,203
M2 (20)	29,89	0,155	0,113
<i>Pool 5</i> (25)	47,13	0,234	0,164
<i>Pool 10</i> (25)	42,53	0,229	0,161

A progênie obtida a partir fertilização dos ovócitos com sêmen de um único macho apresentou maior polimorfismo com o macho 1 ($M1 = 71,26\%$) do que o macho 2 ($M2 = 29,89\%$). O mesmo aconteceu com relação ao índice de diversidade genética de Shannon, em que a progênie obtida com o macho 1 apresentou maior valor ($M1 = 0,378$) em relação a progênie obtida com o macho 2 ($M2 = 0,155$). Esses resultados indicam uma maior variabilidade genética na progênie obtida pela fertilização dos ovócitos com o macho 1 do que com o macho 2. Esta diferenciação na variabilidade genética obtido com os diferentes machos pode sugere um maior relacionamento genético entre a fêmea e o macho 2 do que aquela com o macho 1. Portanto, a endogamia pode ter sido o fator responsável pelo perda da diversidade genética na progênie obtida a partir do macho 2.

As progênies obtidas da fertilização dos ovócitos pelos *pools* de sêmen de cinco e de dez machos apresentaram valores similares de polimorfismo (*Pool 5* = 47,13% e *Pool 10* = 42,53%) e de índice de diversidade genética de Shannon (*Pool 5* = 0,234 e *Pool 10* = 0,229), indicando semelhante variabilidade genética. Ainda, os *pools* apresentaram valores de polimorfismo e de índice de diversidade genética de Shannon superiores à progênie obtida com o macho 2 e inferior ao obtido pelo macho 1.

Considerando que o sêmen de todos reprodutores tenham contribuído com a progênie, o número efetivo de reprodutores (N_e) máximo seria de 3,33 e de 3,64 para os *pool* de sêmen com cinco e dez machos, respectivamente. Esses valores de N_e máximo são superiores com a fertilização dos ovócitos com sêmen de um único macho ($N_e = 2,0$). Contudo, o maior N_e como a utilização dos *pools* não proporcionou uma maior variabilidade genética. Ainda, mesmo que o macho 2 tendo participado dos dois *pools* de sêmen, as diferenças qualitativa e quantitativa podem ter influenciado com que o sêmen de um ou outro macho possa ter um maior número de descendentes. Sekino et al. (2003) destacam que a variação na qualidade do sêmen pode ter sido um dos fatores que proporcionou que apenas um dos seis machos de *Paralichthys olivaceus* tenha sido responsáveis por 99% da progênie. De forma semelhante, Campton (2004) também atribui que a qualidade do sêmen afetou a contribuição dos machos na progênie de *Salmo salar*.

Semelhantemente a variabilidade genética obtida pelo polimorfismo e índice de diversidade genética de Shannon, a divergência genética também foi superior na progênie obtida pela fertilização dos ovócitos do macho 1 (0,203), sendo que os *pools* apresentaram valores semelhantes (*Pool 5* = 0,164 e *Pool 10* = 0,161), e o macho 2 a menor divergência genética. Esses resultados indicam que a progênie obtida por fertilização exclusiva com o macho 2 apresenta indivíduos mais similaridade geneticamente em relação a obtida com o macho 1 e dos *pools*.

Portanto, acasalamentos direcionados (um macho x uma fêmea) em vez do *pools* de sêmen podem proporcionar eficientemente a manutenção da variabilidade genética. No entanto, o manejo reprodutivo (N_e) deve sempre utilizar o maior número efetivo de reprodutores possível, principalmente devido ao efeito *bottleneck* (gargalo genético) (Sekino et al., 2004), que pode ocasionar grande perda da diversidade genética em poucas gerações. Segundo Frankham et al. (2002), seria necessário um N_e de no mínimo 50 para que em curto prazo não ocorra uma depressão endogâmica.

Conclusão

Os resultados obtidos indicam que o emprego dos *pools* com sêmen de cinco ou dez machos pode permitir a manutenção da variabilidade genética, principalmente quando não existe muito controle sobre os reprodutores estoques. Contudo, fica evidente no presente trabalho, que a fertilização dos ovócitos com sêmen de um único macho (acasalamentos direcionados - um macho x uma fêmea) pode proporcionar alta variabilidade genética caso estes não apresentem alto grau de relacionamento genético.

Agradecimentos

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

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.
- CAMPTON, D.C. Sperm competition in salmon hatcheries: the need to institutionalize genetically benign spawning protocols. *Transactions of the American Fisheries Society*, v.133, p.1277-1289, 2004.
- FALCONER, D.S. *Introdução a genética quantitativa*. Viçosa: UFV, 1987. 279p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. *Introduction to Conservation Genetics*. New York: Cambridge University Press, 2002. 640p.
- MILLER, M. MANTEL-ESTRUCT: a program for the detection of population structure via mantel tests. *Journal Heded*, v.90, p.258-259, 1999.
- MOREIRA, H.L.M. Genética e melhoramento de peixes. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. et al. (Ed.). *Fundamentos da moderna aquíicultura*. Canoas: ULBRA, 2001. p. 135-147.
- 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.; RIBEIRO, R.P.; MANGOLIN, C.A. et al. Padronização de protocolo de extração de DNA de pacu (*Piaractus mesopotamicu*). In: AquaCiência, 2., 2006, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquabio, 2006b. CD-ROM.
- POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N. et al. Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. In: AquaCiência, 2., 2006b, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquabio, 2006a CD-ROM.

SEKINO, M.; SAITOH, K.; YAMADA, T. et al. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, v.221, p.255-263. 2003.

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. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. São Carlos: RiMA, 2006. p.275-284.

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