

## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

### **Diversidade genética de estoques de *Brycon orbignyanus* utilizados em programas de repovoamento, obtidos com diferentes sistemas reprodutivos<sup>1</sup>**

**Nelson Mauricio Lopera-Barrero<sup>2</sup>, Ricardo Pereira Ribeiro<sup>3</sup>, Camilo Andres Reyes Alvarez<sup>4</sup>, Maria del Pilar Rodriguez-Rodriguez<sup>5</sup>, Lauro Vargas<sup>2</sup>, Darci Carlos Fornari<sup>5</sup>, Jayme Aparecido Povh<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Parte da monografia do terceiro autor

<sup>2</sup>Pesquisador do Aquateq (UFMT) e Núcleo de Pesquisa PeixeGen (UEM). e-mail: nelson.peixegen@gmail.com

<sup>3</sup>Professor do Departamento de Zootecnia - UEM/Maringá.

<sup>4</sup>Aluno de Graduação em Biologia/Universidad del Tolima/Colômbia.

<sup>5</sup>Aluno do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEM/Maringá. Bolsista da CAPES.

<sup>6</sup>Professor do Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas - UFMT/Rondonópolis.

**Resumo:** Os sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural são utilizados para espécies migratórias de peixes. Entretanto, são necessárias análises que verifiquem sua eficiência na preservação da variabilidade genética. O objetivo deste estudo foi estimar a diversidade genética de progênies de *Brycon orbignyanus* utilizadas em programas de repovoamento, obtidas com os sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural, com marcadores microsatélites. Os quatro loci utilizados produziram um total de 11 alelos. Na progênie do sistema por extrusão foram observados alelos de baixa frequência para os locus BoM5 (alelo B = 0,095) e BoM7 (alelo C = 0,059) e houve uma diminuição da variabilidade genética dos parentais à progênie. Para a progênie do sistema seminatural, as frequências dos alelos se mantiveram estáveis sendo verificada uma frequência desigual para cada locus e a variabilidade genética na progênie foi preservada. Observaram-se desvios ( $P < 0.01$ ) no equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação para os dois sistemas reprodutivos. O coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) mostrou déficit de heterozigotos na progênie do sistema por extrusão.

**Palavras-chave:** genética da conservação, peixes, piracanjuba, sistema por extrusão, sistema seminatural, variabilidade genética

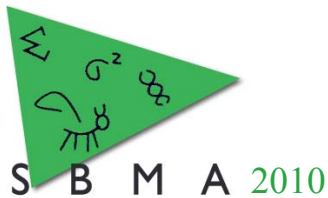
### **Genetic diversity of *Brycon orbignyanus* stocks used in stock enhancement programs obtained with different reproductive systems**

**Abstract:** The extrusion and semi-natural reproductive systems are used for migratory fish species. However, analysis is needed to verify its effectiveness in preserving the genetic variability. The aim of this study was to estimate the genetic diversity of *Brycon orbignyanus* offspring used in stock enhancement programs, obtained with the extrusion and semi-natural reproductive systems, with microsatellite markers. The four loci used produced a total of 11 alleles. The progeny of the extrusion system were observed low-frequency alleles for the locus BoM5 (allele B = 0.095) and BoM7 (allele C = 0.059) and there was a decrease in genetic variability of parents to offspring. For the progeny of semi-natural system, the frequencies of alleles were stable and found an uneven frequency for each locus and the genetic variability in the progeny was preserved. Deviations ( $P < 0.01$ ) in Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium for both reproductive systems were observed. The inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ) showed a deficit of heterozygotes in the progeny of the extrusion system.

**Keywords:** extrusion system, fishes, genetic conservation, genetic variability, piracanjuba, semi-natural system

### **Introdução**

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) é uma espécie nativa das bacias formadas pelos rios Uruguai e Paraná que tem despertado um grande interesse nos pesquisadores e produtores devido a seu elevado valor, precocidade, boa conversão alimentar e boa aceitação de alimentos artificiais. Por outro lado, o desaparecimento de populações nos principais locais de pesca é preocupante, sendo atualmente catalogada como espécie em risco de extinção.



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

Das ações empregadas para mitigar esses impactos, os programas de repovoamento são comumente utilizados, porém, esta prática que tem sido utilizada há mais de três décadas no Brasil não conta com um respaldo científico. Adicionalmente para esta análise genética em peixes, é importante um bom manejo reprodutivo, já que erros como um número insuficiente de reprodutores, ou sistemas reprodutivos inadequados podem gerar problemas e promover diminuição da variabilidade genética (Lopera-Barrero, 2009). Entretanto, se necessitam maiores análises para a confirmação da eficiência de esses sistemas na preservação da variabilidade genética e conservação dos reprodutores de espécies migratórias como o *B. orbignyanus*. O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de progênies de *Brycon orbignyanus* utilizadas em programas de repovoamento, obtidas com os sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural, com marcadores microsatélites.

### Material e Métodos

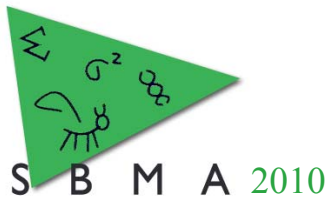
O trabalho foi realizado entre fevereiro e julho de 2009 nas instalações do laboratório de biologia molecular do Núcleo de Pesquisa PEIXEGEN, da Universidade Estadual de Maringá (UEM) - Estado do Paraná (Brasil). Utilizaram-se 20 reprodutores (10♂ y 10♀) de *B. orbignyanus* selecionados de um estoque mantido em cativeiro nas instalações da Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International, localizada na cidade de Salto Grande (49°13'W e 23°10'S), São Paulo, Brasil. Os sistemas de reprodução analisados, o sistema por extrusão e o sistema seminatural, foram caracterizados por Zaniboni-Filho e Nuñez (2004). Nos dois sistemas os peixes foram induzidos à reprodução com extrato de hipófise de carpa.

Para extração de DNA foi utilizado o protocolo de extração com NaCl descrito por Lopera-Barrero et al. (2008c). O DNA foi amplificado para um volume final de reação de 15 µL, utilizou-se 1X do tampão Tris-KCl, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µM de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 0,4 mM de cada dNTP, uma unidade de Platinum *Taq* DNA Polimerase, 10 ng de DNA para larvas e 20 ng de DNA para os reprodutores. Se amplificaram quatro loci descritos por Barroso et al. (2003) para *Brycon opalinus* (nº Acesso GeneBank AF513621-BoM1, AF513622-BoM2, AF513623-BoM5 y AF513626-BoM7). Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida será realizado 30 ciclos, cada um consistindo de 30 segundos de desnaturação a 94°C; 30 segundos de anelamento, sendo a temperatura variável para cada *primer* respectivamente (54°C, 60°C, 51°C y 51°C); e um minuto de extensão a 72°C; após realizou-se uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poli-acrilamida 10% (acrilamida : bisacrilamida – 29 : 1) desnaturante (6 M de uréia), e conduzida em tampão TBE 1X (90 mM de Tris-Borato e 2 mM de EDTA) com 320 V e 250 mA por sete horas. Para a visualização dos alelos microsatélites, foi utilizada a coloração com nitrato de prata pelo método descrito por Bassam et al. (1991) modificado.

O tamanho dos alelos foi calculado pelo programa Kodak EDAS-290, utilizando DNA *ladder* (Invitrogen) de 10, 50 e 100 pb. O número de alelos, a heterozigosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*) e o índice de Shannon foram calculados utilizando o programa PopGene 1.31. A frequência alélica e a deficiência ou excesso de heterozigotos se calcularam para cada locus usando o programa GENEPOP 1.2. O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação se calcularam utilizando o programa Arlequin 3.1 pelo método da cadeia de Markov. A diversidade genética de Nei e o coeficiente de endogamia (*F<sub>is</sub>*) se calcularam com o programa FSTAT 2.9.3.2.

### Resultados e Discussão

Os quatro loci utilizados produziram um total de 11 alelos, sendo observados três alelos (BoM1, BoM5 e BoM7) e dois alelos (BoM2) por locus presentes nos parentais e na progênie. De forma geral, foram observados alelos de alta frequência nos parentais e nas progênies dos dois sistemas e não foram encontrados alelos exclusivos. O baixo número de alelos por locus (3 e 2 alelos) observado no estudo pode estar correlacionado à dificuldade na utilização dos loci heterólogos (desenvolvidos para *Brycon opalinus*), o que faz sugerir a utilização de outros loci na realização de estudos genéticos em *B. orbignyanus*. A heterozigosidade observada (*Ho*) nos parentais dos dois sistemas reprodutivos foi alta para os loci BoM1, BoM5 e BoM7 (1.000), sendo caracterizada uma menor heterozigosidade para o locus BoM2 (0,600 e 0,900 para o sistema por extrusão e seminatural, respectivamente). Esses resultados demonstram que existe uma adequada variabilidade genética intra-populacional a pesar dos reprodutores



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

estarem em cativeiro há seis anos sem a introdução de novos indivíduos, o que sugere que o plantel de reprodutores se formou a partir de um número grande de reprodutores que permitiu conservar um adequado perfil genético, não sendo influenciado pelo efeito fundador. Esta afirmação é corroborada pelos valores de índice de Shannon – IS (0,937 e 0,927 para o sistema por extrusão e seminatural, respectivamente) e de diversidade genética de Nei – DGN (0,604 e 0,593 para o sistema por extrusão e seminatural, respectivamente) que ratificaram uma alta variabilidade genética intra-grupal a pesar do processo de perda de alelos pelo qual passa o estoque.

Ao comparar os parentais e a progênie do sistema reprodutivo por extrusão se observou desvio dos valores de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) nos reprodutores e a progênie (larvas e alevinos), o que caracteriza os desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg observados. O desequilíbrio de ligação se observou em quatro diferentes pares. Verificou-se que a pesar de ter uma alta variabilidade genética intra-grupal (índice de Shannon – IS = 0,886 e diversidade genética de Nei – DGN = 0,566) houve uma diminuição da variabilidade genética na progênie, a qual foi evidenciada pelos valores de heterozigosidade observada média (0,900 e 0,823 para parentais e progênie, respectivamente). Ao comparar os parentais e a progênie do sistema reprodutivo seminatural se observou desvio dos valores de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) nos reprodutores e na progênie (larvas e alevinos), o que igualmente caracteriza os desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg observados. Observou-se desequilíbrio de ligação em seis diferentes pares. O coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) apresentou valores negativos em todos os loci, indicando ausência de endogamia na progênie. Verificou-se que a variabilidade genética na progênie foi preservada, sendo corroborado pelos valores de heterozigosidade observada média (0,975 e 0,945 para parentais e progênie, respectivamente) y pelos valores de índice de Shannon – IS (0,927 e 0,924 para parentais e progênie, respectivamente) e diversidade genética de Nei – DGN (0,593 e 0,581 para parentais e progênie, respectivamente).

O sistema reprodutivo seminatural pode ter influenciado na preservação da variabilidade genética da progênie, já que esse sistema reduz a seleção não intencional no processo reprodutivo que ocorre normalmente no sistema reprodutivo por extrusão. No presente estudo, com a utilização do sistema reprodutivo seminatural, não houve mortalidade dos reprodutores utilizados (verificado um dia depois do processo reprodutivo) e aconteceu a preservação da variabilidade genética na progênie, demonstrando a efetividade desse sistema reprodutivo.

### Conclusões

O sistema reprodutivo seminatural permitiu obter uma mortalidade nula nos reprodutores de *Brycon orbignyanus* e preservou a variabilidade genética na progênie.

### Agradecimentos

À *Duke Energy International* (Geração Paranapanema) por fornecer as amostras e instalações.

### Literatura citada

BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M. et al. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). **Molecular Ecology Notes**, v.3, n.2, p.297-298, Oxford, 2003.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, n.196, v.1, p.80-83, New York, 1991.

LOPERA-BARRERO, N.M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.36, n.2, p. 191-208, Santiago, 2009.

LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. et al. Comparación de protocolos de extracción de ADN com muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). **Ciencia e Investigación Agraria**, v.35, n.1, p.15-24, Santiago, 2008.

ZANIBONI-FILHO, E; NUÑER, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. Pag. 45-73. In: J.E.P.Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracalossi, and N. Castagnolli (eds.). **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. TecArt, São Paulo, Brasil. 2004.