

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 *Piaractus mesopotamicus* utilizados em programas de repovoamento, através do marcador microssatélite

**Nelson Mauricio Lopera-Barrero¹, Ricardo Pereira Ribeiro², Silvio Carlos Alves dos Santos³,
Maria del Pilar Rodriguez-Rodriguez⁴, Darci Carlos Fornari⁴, Lauro Vargas¹, Fernanda
Tanamati⁵**

¹Pesquisador do Aquapeq (UFMT) e Núcleo de Pesquisa PeixeGen (UEM).

²Professor do Departamento de Zootecnia - UEM/Maringá. e-mail: rpribeiro@uem.br

³Hidrelétrica AES Tietê – AES/Promissão.

⁴Aluno do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEM/Maringá. Bolsista da CAPES.

⁵Aluno do Programa de Graduação em Zootecnia – UEM/Maringá.

Resumo: O monitoramento genético é fundamental para verificar a viabilidade dos programas de repovoamento de peixes e evitar efeitos adversos na ictiofauna natural. O objetivo deste estudo foi estimar a diversidade genética de quatro estoques de reprodutores (A, B, C e D) de *Piaractus mesopotamicus* utilizados em programas de repovoamento, com marcadores microssatélites. Os quatro loci utilizados produziram um total de 17 alelos. Os valores de heterozigosidade observada média refletiram uma alta variabilidade genética intra-populacional, onde o estoque A apresentou o maior valor (0,723) seguida do estoque C (0,719), B (0,673) e D (0,556). Os valores de *Fis* apresentaram valores médios negativos em todos os loci, indicando a ausência de endogamia. Os maiores valores médios de *Fis* foram encontrados no estoque C (0,719). O índice de Shannon foi diferente entre os estoques indicando que existe diferenciação genética entre eles. O maior valor foi apresentado pelo estoque A (1,149). Esse índice sugere que existe uma maior diferenciação genética entre os estoques A e D e uma maior similaridade genética entre os estoques A e B. Os valores de distância genética apresentados corroboraram os resultados observados com o índice de Shannon, demonstrando que entre os estoques A e B existe uma menor distância (0,024) do que entre os estoques A e D (0,048).

Palavras-chave: genética da conservação, pacu, peixes, variabilidade genética

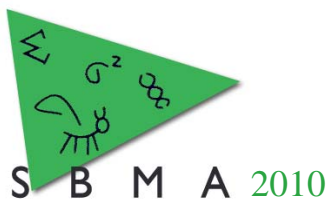
Genetic diversity of *Piaractus mesopotamicus* stocks used in stock enhancement programs, through the microsatellite marker

Abstract: The monitoring genetic is fundamental to verify the viability of the fish stocks enhancement programs and to avoid adverse effects in the natural ictiofauna. The objective of this study was to estimated the genetic diversity of four *Piaractus mesopotamicus* broodstocks (A, B, C and D) used in stock enhancement programs, with microsatellites markers. The four loci used produced a total of 17 alleles. The observed heterozygosity average values reflected a high intra-population genetic variability, where the A stock presented the high value (0.723) followed by stock C (0.719), B (0.673) and D (0.556). The values of *Fis* presented negative medium values in all the loci, indicating the endogamy absence. The high medium values of *Fis* were found in the stock C (0.719). The Shannon index was different among the stocks indicating that genetic differentiation exists among them. The high value was presented by the stock A (1.149). That index suggests that a high genetic differentiation exists among the stocks A and D and a high genetic similarity among the stocks A and B. The values of genetic distance presented they corroborated the results observed with the Shannon index, demonstrating that among the stocks A and B a smaller distance exists (0.024) than among the stocks A and D (0.048).

Keywords: fishes, genetic conservation, genetic variability, pacu

Introdução

O pacú (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie nativa do continente sul-americano, apresenta característica reprodutiva migratória, excelentes características zootécnicas e grande aceitação na piscicultura brasileira (Urbinati e Gonçalves, 2005). Embora apresente grande potencial para piscicultura, em alguns rios sua captura é muito rara.



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 (Lopera-Barrero, 2009). Desta forma, são necessárias pesquisas que permitam confirmar a qualidade genética com que as liberações de peixes estão sendo realizadas e assim verificar a eficiência desses programas na preservação da variabilidade genética e conservação de populações naturais. O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de quatro estoques de *Piaractus mesopotamicus* da piscicultura da Hidroelétrica da AES, utilizadas em programas de repovoamento, com marcadores microssatélites.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado entre dezembro de 2009 e janeiro de 2010 nas instalações do laboratório de biologia molecular do Núcleo de Pesquisa PEIXEGEN, da Universidade Estadual de Maringá (UEM) - Estado do Paraná (Brasil). Utilizaram-se 119 reprodutores de quatro estoques de reprodutores (A: 30; B: 30; C: 28 e D: 31 amostras) de *P. mesopotamicus* mantidos em cativeiro nas instalações da Estação de Aquicultura da AES Tietê, localizada na cidade de Promissão (49°5'W e 21°32'S), São Paulo, Brasil.

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 MgCl₂, 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 Calcagnotto et al. (2001) (Pme2, Pme4, Pme5 e Pme14). 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* 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 poliacrilamida 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 microssatélites, 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 (H_o) e esperada (H_e), o índice de Shannon, a distância genética e o dendrograma foram calculados utilizando o programa PopGene 1.31. O coeficiente de endogamia (F_{is}) se calculou com o programa FSTAT 2.9.3.2.

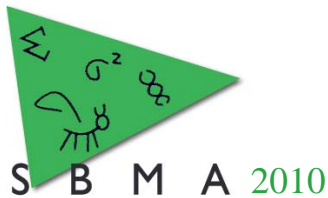
Resultados e Discussão

Os quatro *loci* produziram 17 alelos variando de quatro (Pme4, Pme5 e Pme14) a cinco alelos (Pme2) por *locus*. O tamanho dos alelos variou de 80 pb (*locus* Pme5) a 115 pb (*locus* Pme2). Os dados de heterozigosidade observada média refletiram uma alta variabilidade genética intra-populacional, onde o estoque A apresentou o maior valor (0,7226) seguida do C (0,7187), B (0,6727) e D (0,5564) (Tabela 1).

Os valores de F_{is} , que representam uma medida de desvio das frequências genotípicas em relação às frequências panmíticas, expressas em termos de deficiência ou excesso de heterozigotos e que também podem ser interpretados como coeficientes de endogamia apresentaram valores médios negativos em todos os *loci*, indicando a ausência de endogamia. Os maiores valores médios de F_{is} foram encontrados no estoque C (0,7187) (Tabela 1).

O índice de Shannon foi diferente entre os estoques indicando que existe diferenciação genética entre eles. O maior valor foi apresentado pelo estoque A (1,1492). Esse índice sugere que existe uma maior diferenciação genética entre os estoques A e D e uma maior similaridade genética entre os estoques A e B (Tabela 1).

Os valores de distância genética corroboraram os resultados observados com o índice de Shannon, demonstrando que entre os estoques A e B existe uma menor distância (0,0236) do que entre os estoques A e D (0,0480).



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

Tabela 1 Número de alelos por *locus* (N.A), heterozigose observada (*Ho*), heterozigose esperada (*He*), índice de fixação (*Fis*), teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{WH}) e índice de Shannon (IS) para os estoques de reprodutores e os juvenis de *Piaractus mesopotamicus*.

<i>Locus</i>	Pop	A	B	C	D	Média
	N	30	30	29	31	120
Pme2	N.A	5	5	5	5	---
	Ho	0,8667	0,9667	0,9286	0,6452	0,8518
	He	0,7107	0,7571	0,6299	0,5230	0,6552
	F_{is}	-0,2401	-0,2985	-0,5010	-0,2538	-0,3234
Pme4	N.A	4	4	4	4	---
	Ho	0,8571	0,7241	0,6500	0,4333	0,6661
	He	0,6578	0,5584	0,5141	0,4424	0,5432
	F_{is}	-0,3268	-0,3196	-0,2968	0,0038	-0,2348
Pme5	N.A	4	4	4	4	---
	Ho	0,6333	0,4828	0,6296	0,7241	0,6174
	He	0,5554	0,5590	0,5807	0,5245	0,5549
	F_{is}	-0,1597	0,1212	-0,1047	-0,4048	-0,1370
Pme14	N.A	4	4	4	4	---
	Ho	0,5333	0,5172	0,6667	0,4231	0,5351
	He	0,5565	0,5910	0,4885	0,3582	0,4985
	F_{is}	0,0254	0,1095	-0,3938	-0,2042	-0,1158
Media	N.A	17	17	17	17	---
	Ho	0,7226	0,6727	0,7187	0,5564	0,6688
	He	0,6201	0,6164	0,5533	0,4620	0,5629
	F_{is}	-0,1753	-0,0969	-0,3240	-0,2147	-0,2027
	IS	1,1492	1,1165	0,9783	0,8559	---

Os resultados deste estudo demonstram que através de um correto manejo reprodutivo e genético dos estoques, é possível a manutenção da produção de indivíduos com vistas ao repovoamento.

Conclusões

Os estoques analisados apresentam uma alta variabilidade genética intra-populacional que viabiliza a sua utilização em programas de repovoamento.

Agradecimentos

À Hidrelétrica AES por fornecer as amostras e instalações.

Literatura citada

- CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DeSALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.245-247, 2001.
- 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.
- URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B. GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM. P. 225-246, 2005.