

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

**Variabilidade genética de uma população natural e de um estoque de peixes jovens da espécie piraputanga (*Brycon hilarii*) por meio de marcadores microssatélites<sup>1</sup>**

Mariana Stucki Alves<sup>2</sup>, Annaiza Braga Bignardi<sup>3</sup>, Naiane Gessy Genero<sup>4</sup>, Caroline Michele Marinho Marciano<sup>4</sup>, Nelson Maurício Lopera-Barrero<sup>5</sup>, Jayme Aparecido Povh<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pela FAPEMAT

<sup>2</sup>Graduação em Zootecnia – UFMT, Rondonópolis. Bolsista da FAPEMAT. e-mail: marianastucki@gmail.com

<sup>3</sup>Curso de Zootecnia – UFMT, Rondonópolis. e-mail: annaizabb@hotmail.com

<sup>4</sup>Graduação em Zootecnia – UFMT, Rondonópolis. Bolsista UFMT. e-mail: naia-jf@hotmail.com, karol-marinho@hotmail.com

<sup>5</sup>Departamento de Zootecnia – UEL, Londrina. e-mail: nelson.peixegen@gmail.com

<sup>6</sup>Departamento de Zootecnia – UFMS, Campo Grande. e-mail: jayme.peixegen@gmail.com

**Resumo:** Os marcadores moleculares tem sido de grande praticidade e de relativa facilidade em uso nos programas de peixamento. Entre esses marcadores o microssatélite tem sido utilizado para avaliações das estruturas genéticas em diversas espécies aquícolas, além do mesmo em verificação de variabilidade de estoques de populações criadas em cativeiro e bem como da integridade genética das populações naturais, buscando, em bases científicas um direcionamento correto em programas de solturas. Foram utilizados 126 animais nos quais 30 pertencentes de uma população natural e 96 de estoque de peixes jovens oriundos de reprodutores em cativeiro. Para as reações de amplificações foram utilizadas sete *locus* microssatélites, tendo como resultante um total de 56 alelos. De acordo com a heterozigosidade observada, verificou uma menor variabilidade nos estoques de peixes jovem (0,5794) e relativamente maior variabilidade intra-populacional na população natural. De acordo com o  $F_{st}$  (0,26226) o distanciamento entre as duas populações se mostrou alto, sendo preocupante a soltura de animais a partir desse estoque juvenil.

**Palavras-chave:** distanciamento genético, endogamia, marcadores moleculares, peixamento

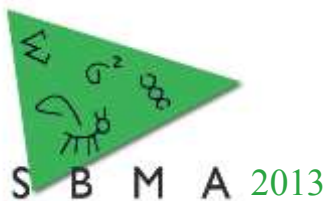
**Genetic variability in a natural population and a stock of young fish species piraputanga (*Brycon hilarii*) by microsatellite markers**

**Abstract:** Molecular markers have been of great practicality and relative ease of use in stocking programs. Among these microsatellite markers have been used for evaluation of genetic structures in various aquaculture species, beyond even to find variability of populations in captivity and as well as the genetic integrity of natural populations, seeking a direction scientifically correct programs of releases. 126 animals were used in which 30 belong to a natural population and 96 fish stock young people from breeding in captivity. For the amplification, reactions were used seven microsatellite loci, with the resulting 56 alleles. According to heterozygosity observed less variation found in young fish stock (0.5794) and relatively greater intra-population variability in natural populations. According to  $F_{st}$  (0.26226) the distance between the two populations showed high concern being the release of animals from this stock juvenile.

**Keywords:** genetic distance, inbreeding, molecular markers, stocking

**Introdução**

A caracterização da variabilidade genética nas populações é de grande importância, pois possibilita que as ações tomadas no intuito de preservação e manutenção da estrutura genética permaneçam em índices que não causem problemas futuros como a depreciação gênica. A espécie piraputanga (*Brycon hilarii*) está sendo foco de estudo, devido a seu número populacional reduzido, buscando estabelecer um equilíbrio entre as bases genéticas pré-existentes sem grandes alterações em suas estruturas genômicas. O conhecimento quanto ao distanciamento entre as populações que se adentram aos programas de repovoamento, busca a minimização dos impactos causados com a introdução de animais que, por mais que sejam pertencentes à mesma espécie, apresentam bases genéticas distintas decorrentes de sua formação. Isso se torna mais agravante principalmente aos animais criados em ambientes de cativeiro, onde as taxas endogâmicas, devido ao manejo incorreto, permanecem altas na população. Então, a introdução desses animais em ambientes naturais deve ser



## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

critérios analisada, em bases científicas para que os danos decorrentes sejam os mínimos possíveis. Este trabalho teve como objetivos caracterizar geneticamente de populações de piraputanga (*Brycon hilarii*) criadas no centro-oeste do Brasil com o auxílio de marcadores microssatélites buscando gerar informações que possam ser empregadas em programas de peixamento da espécie.

### Material e Métodos

Foram coletadas amostras de nadadeiras (fragmento de  $\pm 1$  cm armazenado em álcool 70%) de uma população (30 amostras) e um estoque de peixes jovens (96 amostras) oriundos de acasalamento de reprodutores. Para extração de DNA foi utilizado o protocolo de extração com NaCl descrito por Lopera-Barrero et al. (2008). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu com absorvância de 260 nm. As amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng/ $\mu$ L. Para conferir a qualidade do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, conduzida em tampão TBE 1X (500 mM Tris-HCl, 60 mM ácido bórico e 83 mM EDTA) por uma hora a 70 V. O gel foi visualizado sob radiação UV, depois da sua exposição com brometo de etídio (0,5 ng/ml) por uma hora. Posteriormente, a imagem foi fotografada utilizando o programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5). Foi avaliado o número e a frequência de sete *loci* microssatélite de peixes da espécie piraputanga (*Brycon hilarii*) para verificação quanto variabilidade e divergência genéticas entre essas populações. Foram utilizados os seguintes *loci* microssatélite: BH-5, BH-6, BH-8, BH-13, BH-15, BH-16 e BH-17.

O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 20  $\mu$ L, no qual foi utilizado tampão 1X Tris-KCl, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8  $\mu$ M de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de Platinun *Taq* DNA Polimerase e 20 ng de DNA. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida, realizados 30 ciclos, cada um consistindo de: 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 56°C e um minuto de extensão a 72°C, após foi realizado uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações foram amplificadas em termociclador “Bio-Rad”. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida (10 %) por 12 horas com corrente de 50 mA. Para a visualização dos alelos microssatélite, foi utilizado a coloração com nitrato de prata protocolo de Bassam et al. (1991). Para as análises estatísticas, foram calculadas para cada *locus* usando o programa GENEPOP 1.2 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Os valores de diferenciação genética (FST) foram estimados pelo método de Weir e Cockerham (1984) utilizando o programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2001).

### Resultados e Discussão

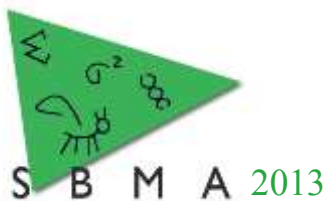
A obtenção total dos alelos foi de 56 dos setes *locus* microssatélites. O tamanho dos alelos variou de 130 pb (*locus* Bh-15) a 233 pb (*locus* Bh-8). O *loci* que se apresentou em maior grau polimórfico foi o Bh-17, com um total de sete alelos adquiridos. Quando em comparação, os dados de heterozigidade observada média refletiram uma alta variabilidade na população natural (0,6290) e em menor grau no estoque de peixes jovens (0,5794). Esse resultado pode ser devido a formas de acasalamento dos reprodutores no qual se obteve os peixes jovens indicando ocorrência de endogamia nesse plantel (Tabela 1).

Tabela 1- Resumo das estatísticas de *locus* microssatélites entre as populações de *Brycon hilarii*.

Média	Peixes Jovens	Estoque Natural
$H_o$	0,5794	0,6290
$H_e$	0,6229	0,6485
$F_{IS}$	0,1100	0,0110
HWE	**	**
$N_A$	29	27

$H_o$ , heterozigidade observada;  $H_e$ , heterozigidade esperada;  $F_{IS}$ , coeficiente de endogamia;  $P_{HW}$ , teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $N_A$ , número de alelos por *loci*.

Quando se analisou o coeficiente de endogamia interpopulacional ou índice de fixação de alelos ( $F_{st}$ ), verificou-se que, de modo geral, a endogamia é relativamente alta dentro dos plantéis de peixes jovens ( $F_{is}$  = 0,1100). Quanto ao distanciamento obtido pelo coeficiente de ancestralidade  $F_{st}$  (0,26226),



## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

indica grande diferenciação genética entre essas duas populações. Isso acontece em populações distintas com formação de “pools” de genes diferentes embasados em sua formação (Tabela 2), sendo preocupante, portanto a soltura no ambiente natural, resultando em baixa inviabilidade do uso desses peixes.

Tabela 2- Resumo das estatísticas utilizadas nas combinações das populações de *Brycon hilarii*.

Grupos	Peixes jovens x Estoque Natural
$F_{st}$	0,26226
Wright	Grande diferenciação

$F_{ST}$ , coeficiente de ancestralidade; Wright, diferenciação genética de Wright (1978).

### Conclusões

1. O estoque de peixes jovens apresentaram moderada variabilidade genética e a população natural alta variabilidade intra-populacional;
2. Foi alta a diferenciação genética entre a população natural e o estoque de peixes jovens destinados ao repovoamento, sendo preocupante a sua soltura no ambiente natural.

### Literatura citada

LEUZZI, M.S.P., F.S. ALMEIDA, M.L. ORSI Y M.L.K. SODRÉ. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs of the River Paranapanema. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p.355-362, 2004.

LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A; RIBEIRO, R.P; GOMES P.C; JACOMETO C.B; LOPES, T.S. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). *Ciencia e Investigación Agraria*, v.35, p.77-86, 2008.

POVH, J. A.; LOPERA BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; LUPCHINSKI JR, E.; GOMES, P. C.; LOPES, T. S. Importancia del monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria*, Santiago, v. 35, n. 1, p. 25-35, 2008.

YUE, G.H.; ORBAN, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. *Molecular Ecology Notes*, v.2, p.99-100, 2002.