

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Amplificação e caracterização de *locus* microssatélites em piraputanga (*Brycon hilarii*) para estimativa de divergência genética para fins de repovoamento¹

Mariana Stucki Alves², Annaiza Braga Bignardi³, Caroline Michele Marinho Marciano⁴, Naiane Gessy Genero⁴, Nelson Maurício Lopera-Barrero⁵, Jayme Aparecido Povh⁶

¹Trabalho financiado pela FAPEMAT

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

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

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

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

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

Resumo: A espécie piraputanga (*Brycon hilarii*) está sofrendo declínio de sua população natural em decorrência da exorbitante pesca predatória. Com isso, o objetivo desse trabalho é a verificação da diversidade genética entre essas populações por meio do marcador microssatélite embasados com o propósito de peixamento. Foi utilizado um total de 60 indivíduos, nos quais 30 retirados do ambiente natural localizado na bacia do Rio Itiquira e os demais pertencentes a uma população de reprodutores de uma piscicultura. Utilizaram-se as informações polimórficas de seis *locus* microssatélites, tendo uma variação de 2 (Bh-15) à 7 (Bh-17) por loci e em sua totalidade, 55 alelos obtidos. Os valores de heterozigosidade média observada demonstram que ambas as populações possuem alta variedade intra-populacional, onde o estoque de reprodutores apresentaram valores maiores quando em comparação com a natural. Os valores de *Fis* foram negativos para a população de reprodutores, indicando ausência de endogamia, enquanto na população natural esses valores se mostraram positivos, possivelmente ocasionados por acasalamentos entre indivíduos genes semelhantes, isso em decorrência do possível declínio populacional. O valor de *Fst* entre os dois estoques foi de 0,023 demonstrando pequena diferenciação genética entre essas duas populações, revelando proximidades genéticas ou mesmo grau de ancestralidade em comum.

Palavras-chave: co-dominância, microssatélite, repovoamento, variações genéticas

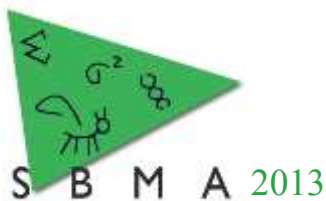
Amplification and characterization of microsatellite loci in piraputanga (*Brycon hilarii*) to estimate genetic divergence for restocking

Abstract: The species piraputanga (*Brycon hilarii*) is suffering from a natural population decline due to overfishing exorbitant. Thus, the aim of this work is to verify the genetic diversity among these populations through microsatellite marker for stocking. We used 60 fish, 30 of which removed the natural environment located in the Rio Itiquira and the other belonging to a brood of a fish farming. We used the information six polymorphic microsatellite loci, ranged from 2 (Bh-15) to 7 (Bh-17) per loci, 55 alleles was obtained. The values of mean heterozygosities demonstrate that both populations possess high intra-array population where the broodstock were higher when compared to natural. *Fis* values were negative for the population of breeding, indicating the absence of inbreeding, while the natural population these values were positive, possibly caused by mating between individuals with similar genes, it can be due to population decline. The *Fst* value between the two stocks was 0.023 demonstrating little genetic differentiation between these two populations, showing nearby or even degree of genetic ancestry in common.

Keywords: co-dominance, microsatellite, repopulation, genetic variations

Introdução

A espécie piraputanga (*Brycon hilarii*) tem grande aceitação pelo sua qualidade nutricional e pelas características próprias de paladar, bem como, utilizadas em determinados sistemas de produção. Porém o declínio populacional acentuado está fazendo com que, a espécie esteja em estado de atenção, visto que, a captura sem um controle prévio pode resultar em danos a ictiofauna. Os programas de repovoamento tem por objetivo a minimização destes impactos, porém essas análises devem ter um respaldo técnico para que, a população introduzida não cause efeitos negativos, como aparecimentos de



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

alelos deletérios, ou mesmo ligados aos genes da adaptabilidade. Para isso a utilização de marcadores moleculares tem sido de grande eficiência e tem se mostrado eficaz para essas análises, tornando o manejo dirigido e minimizando qualquer efeito negativo na estrutura gênica dessas populações.

Os marcadores microssatélites têm sido utilizados para o monitoramento genético em peixes, tais como, sistema de cruzamento, fluxo gênico e estrutura genética dos estoques (Yue & Orban, 2002). Em termos de acasalamento endogâmicos, esse marcador tem se empregado com relativa eficiência, além de possibilitar o estudo de acasalamento em espécies de populações naturais, cujo comportamento reprodutivo é de difícil avaliação (Colbourne et al., 1996), e podem ser utilizados para identificar possíveis relações genéticas entre a geração parental e progênie (Fessehayet et al., 2006).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a variabilidade e diferenciação genética entre as duas populações de piraputanga (*Brycon hilarii*), para fins de peixamento por meio de marcadores microssatélites.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de nadadeiras (fragmento de ± 1 cm armazenado em álcool 70%) de uma população (30 amostras) e um estoque de reprodutores (30 amostras). 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/ μ 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 cinco *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-6, BH-8, BH-13, BH-15, BH-16 e BH-17.

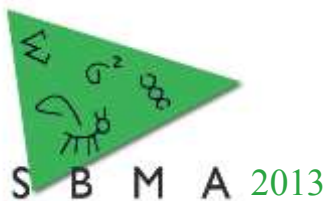
O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 20 μ L, no qual foi utilizado tampão 1X Tris-KCl, 2,0 mM de $MgCl_2$, 0,8 μ M de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de Platinun *Taq* DNA Polimerase e 20 ng de DNA. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por 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 poliacrilamida (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

Os seis *loci* produziram um total de 53 alelos, variando de dois (Primer Bh-15) a sete alelos (Bh-8) por *locus*. O tamanho dos alelos variou de 185 pb (*locus* Bh-15 e Bh-13) a 233 pb (*locus* Bh-8). Os dados de heterozigosidade observada média refletiram uma alta variabilidade genética intra-populacional, onde o estoque de reprodutores apresentou o maior valor (0,7204) seguida do estoque de populacional natural (0,6290) (Tabela 1).

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

Média	Estoque Natural	Estoque de Reprodutores
H_o	0.6290	0.7204
H_e	0.6485	0.6608
F_{IS}	0,0110	-0,093
HWE	**	NS
N_A	27	26



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

H_O , heterozigiosidade observada; H_E , heterozigiosidade esperada; F_{IS} , coeficiente de endogamia; P_{HW} , teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg; N_A , número de alelos por *locus*.

Os valores de F_{IS} , que representam uma medida de desvio das frequências genotípicas em relação às frequências panmíticas, verificando 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 do estoque de reprodutores indicando a ausência de endogamia (-0,093) (Tabela 1). Porém, na população natural esse valor se mostrou positivo, mostrando, em pequeno grau de severidade, um coeficiente endogâmico nessa população. Isso pode ser em decorrência do afinamento do número de indivíduos dessa população. A pequena diferenciação genética obtida entre a população natural e o estoque de reprodutores pelo F_{ST} indica uma proximidade genética entre estes (Tabela 2). O que se permite concluir que o pool de genes é semelhante, fato relevante quando se realizam programas de repovoamento, pois um pool diferente entre eles poderia significar baixa viabilidade do uso do estoque e provocar perda de genes importantes de adaptação ao ambiente na população natural e baixa sobrevivência das progênes repovoadas.

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

Grupos	Estoque Natural x Estoque de reprodutores
F_{ST}	0,0238
Wright	Pequena diferenciação

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

Conclusões

1. O estoque de reprodutores e estoque natural avaliado apresentaram alta variabilidade intra-populacional;
2. Verificou-se que a diferenciação genética entre a população natural e o estoque de reprodutores formador dos peixes destinados ao repovoamento é pequena.

Literatura citada

COLBOURNE, J.K.; NEFF, B.D.; WRIGHT, J.M.; GROSS, M.R. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.53, p.342-349, 1996.

FESSEHAYE, Y.; EL-BIALY, Z.; REZK, M.A.; CROOIJMANS, R.; BOVENHUIS, H.; KOMEN, H. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. *Aquaculture*, v.256, p.148- 158, 2006.

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2007.

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