

# ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE DOIS ESTOQUES DE *Colossoma macropomum*

Taís da Silva Lopes\*, Danilo Pedro Streit Junior, Ricardo Pereira Ribeiro,  
Jayme Aparecido Povh, Nelson Mauricio Lopera-Barrero, Lauro Vargas,  
Patrícia Cristina Gomes, Jorge Roberto Queiroz e Carlindo Pinto Filho

\*Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR. E-mail: tslopeszoo@yahoo.com.br

## Resumo

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie nativa de grande importância na piscicultura brasileira. Contudo, poucas pesquisas têm sido realizadas com esta espécie, principalmente com relação ao manejo reprodutivo, o qual pode levar a grande redução da variabilidade genética e, conseqüentemente, promover prejuízos à aqüicultura. Frente a este cenário, o monitoramento através de metodologias como os marcadores moleculares tornaram-se fundamentais para o reconhecimento e caracterização genética de estoques. Desta forma, o objetivo do projeto foi determinar a diversidade genética de dois estoques de tambaqui, um em Pimenta Bueno, RO e outro em Ouro Preto do Oeste, RO, através do marcador molecular RAPD. Os estoques mostraram um alto nível de Polimorfismo (75 a 77%) e de índice de diversidade genética de Shannon (0,4396 a 0,4687), indicando alta variabilidade genética nos dois estoques. Além disso, pode-se observar um baixo nível de diferenciação genética ( $G_{st}$ ) entre estes (0,0361).

## Introdução

O Brasil possui espécies nativas com grande potencial para exploração pela aqüicultura. No entanto, a grande maioria delas necessita ainda de uma série de aportes científicos para colocá-las em patamar de plena viabilidade zootécnica e econômica. O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma das espécies mais freqüentemente utilizadas na piscicultura brasileira (Araújo-Lima et al., 2005).

*C. macropomum* é da ordem Characiformes, que inclui as piranhas, pirapitinga e os pacus; conhecido ocasionalmente como *black pacu*. Esta espécie ocorre naturalmente nas bacias do Rio Amazonas e do Orinoco. De uma forma geral, o habitat desta espécie é caracterizado por águas ricas em nutrientes com temperaturas médias entre 25 e 34°C e abundância de áreas alagáveis (Araújo-Lima et al., 2005).

A espécie *C. macropomum* não se reproduz espontaneamente em tanques, sendo a reprodução, como a maioria dos peixes migradores, induzida com a utilização de hormônios. Assim, o manejo adequado do plantel de reprodutores é a chave para o sucesso da indução e posterior reprodução (Araújo-Lima et al., 2005). Contudo, o inadequado manejo reprodutivo pode conduzir a redução da variabilidade genética (Porta et al., 2006) e, dessa forma, promover a perda do potencial no melhoramento genético, assim como reduzir a viabilidade, prejudicar o crescimento (Moreira, 2001) e a reprodução (Porta et al., 2006).

Frente a este cenário, qualquer ação que vise o monitoramento genético é fundamental para o sucesso, seja na conservação genética ou no melhoramento genético (Hilsdorf et al., 2006). Desta forma, o emprego de metodologias, como os marcadores moleculares, torna-se fundamental para o reconhecimento e caracterização genética de estoques. Entre estes

marcadores, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) baseia-se na análise de fragmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), é uma ferramenta bastante simples, rápida e eficiente (Ferreira & Grattapaglia, 1998) que pode ser usada no processo de monitoramento e melhoramento genético (Povh et al., 2006a). Assim, o objetivo foi determinar a diversidade genética de duas populações de *C macropomum* de Pimenta Bueno e de Ouro Preto do Oeste, através do marcador molecular de RAPD.

### Material e Métodos

As amostras foram obtidas de dois estoques de reprodutores de *C. macropomum*, uma da região de Pimenta Bueno e de Ouro Preto do Oeste. Para cada estoque foram colhidas 30 amostras de nadadeira caudal.

Para a extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita por Bardakci e Skibinski (1994), modificada por Povh et al. (2006b). Fragmentos de nadadeira caudal (0,5 cm<sup>2</sup>) foram colocados em tubos com 550µl de tampão de lise e 200µg/ml de proteinase K e mantidos em banho-maria a 50,0°C *overnight*. Posteriormente, o DNA foi purificado com 400 µL de cloreto de sódio (5M) e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm, sendo em seguida precipitado com 400 µL de etanol absoluto. Após a incubação de duas horas em freezer, o DNA foi precipitado, lavado com etano 70% e diluído em 80µl de tampão TE. Para a degradação do RNA o DNA foi tratado com 30µg/mL de RNase por 60 minutos em banho-maria a 37,0°C. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 1% por comparação com DNA de fago λ, sendo a eletroforese conduzida em 60 volts por uma hora e 30 minutos usando tampão TAE 1X.

O DNA foi amplificado em um volume de reação de 15µl, utilizando 1X de tampão Tris-KCl, 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,46 µM de *primer* (Kit Operon OPA, OPW e OPX), 0,2mM dNTPs, uma unidade de Taq DNA Polimerase, e 15ng de DNA. As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> Gradient”, programado para 40 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 94°C por cinco minutos e um passo final de extensão a 72°C por sete minutos. Cada ciclo consistiu de um minuto a 94°C, um minuto e meio a 40°C e dois minutos a 72°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose na concentração de 1,5 % durante quatro horas a 60 volts usando tampão TBE 1X.

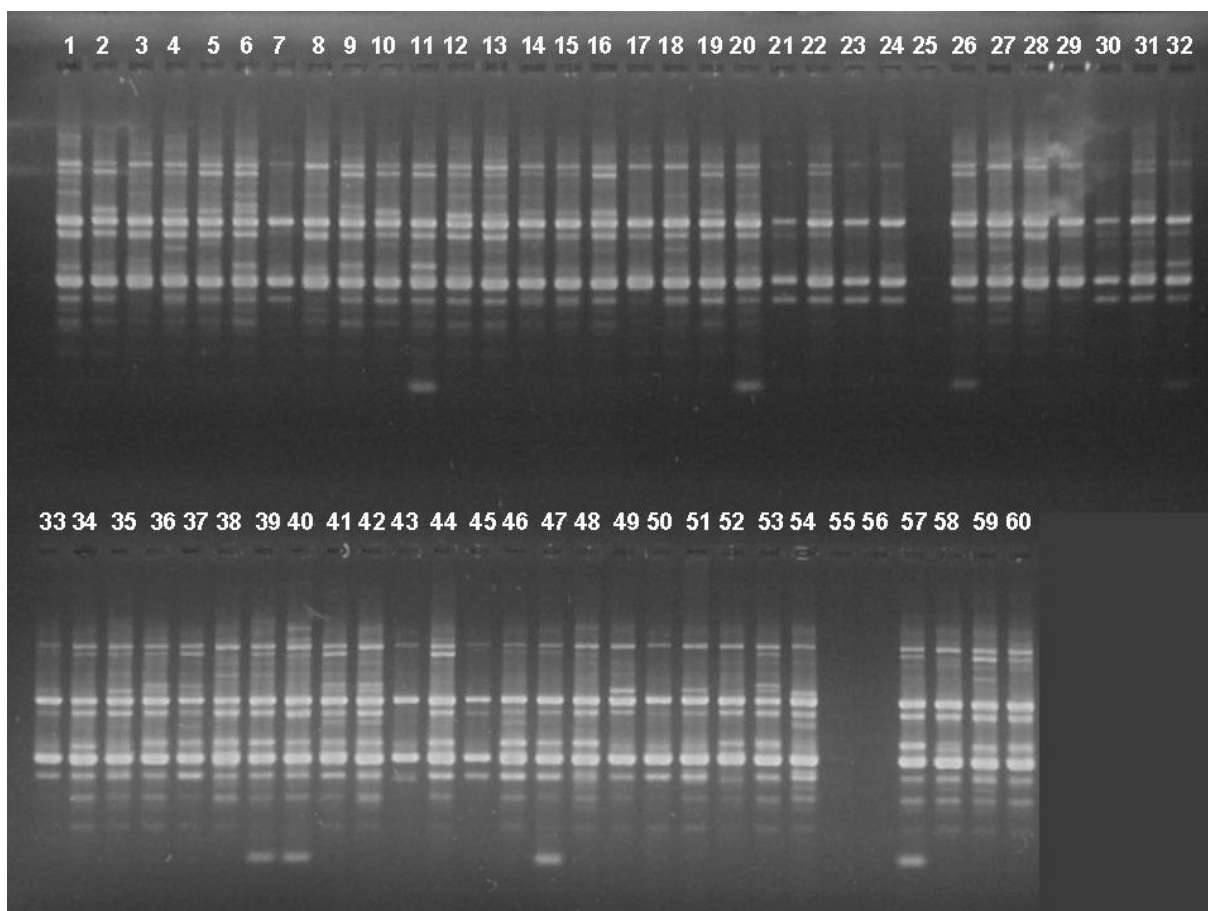
Ambos os géis de quantificação e amplificação foram corados em uma solução de 30µl/l de brometo de etídio, e visualizados em transluminador com luz ultravioleta, onde a imagem foi capturada por um sistema da EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o 100 pb DNA ladder. A variabilidade genética dos estoques foi determinada pelo Índice de diversidade genética de Shannon e pela porcentagem de fragmentos polimórficos, e a diferenciação genética entre os estoques foi determinada pela diversidade genética de Nei's (1973) (*Gst*), e pelo número de migrantes por geração (*Nm*). Estas análises foram feitas com o programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999).

### Resultados e Discussão

Os *primers* selecionados produziram diferentes padrões de fragmentos RAPD. O número de bandas geradas por *primer* variou de oito a 12, totalizando 100 fragmentos, e o

tamanho desses permaneceu entre 90 a 2500 pb. Na Figura 1, pode-se observar o padrão de amplificação obtido.



**Figura 1.** Amplificação do primer X1 em gel de agarose 1,7%.

O polimorfismo obtido nos estoques de reprodutores de Pimenta Bueno e de Ouro Preto do Oeste foi semelhante (Tabela 1). Os valores de polimorfismo podem ser considerados alto comparados ao encontrado por outras espécies nativas, como por exemplo, as populações de *Pimelodus maculatus* nativas dos rios Paranapanema e Tietê (51,94 a 61,51%), encontrado por Almeida *et al.* (2003), e para populações de *Astyanax altiparanae* (42,64 a 75%) do rio Paranapanema por Leuzzi *et al.* (2004).

Ainda, os resultados do índice de shannon foram superiores quando comparados com estoques (0,289 e 56,53%) e populações nativas (0,345 e 61,17%) de *Piaractus mesopotamicus* analisados por Povh *et al.* (2007).

**Tabela 1.** Índice de variabilidade genética e porcentagem de fragmentos polimórficos obtidos entre os estoque de *C. macropomum*.

Estoques	Índice de Shannon	Polimorfismo (%)
Ouro Preto do Oeste	0,4687	77,0
Pimenta Bueno	0,4396	75,0

Os estoques avaliados no presente trabalho sugerem que estes não tenham conduzidos à perda de variabilidade genética durante as gerações após sua formação. O que não aconteceu

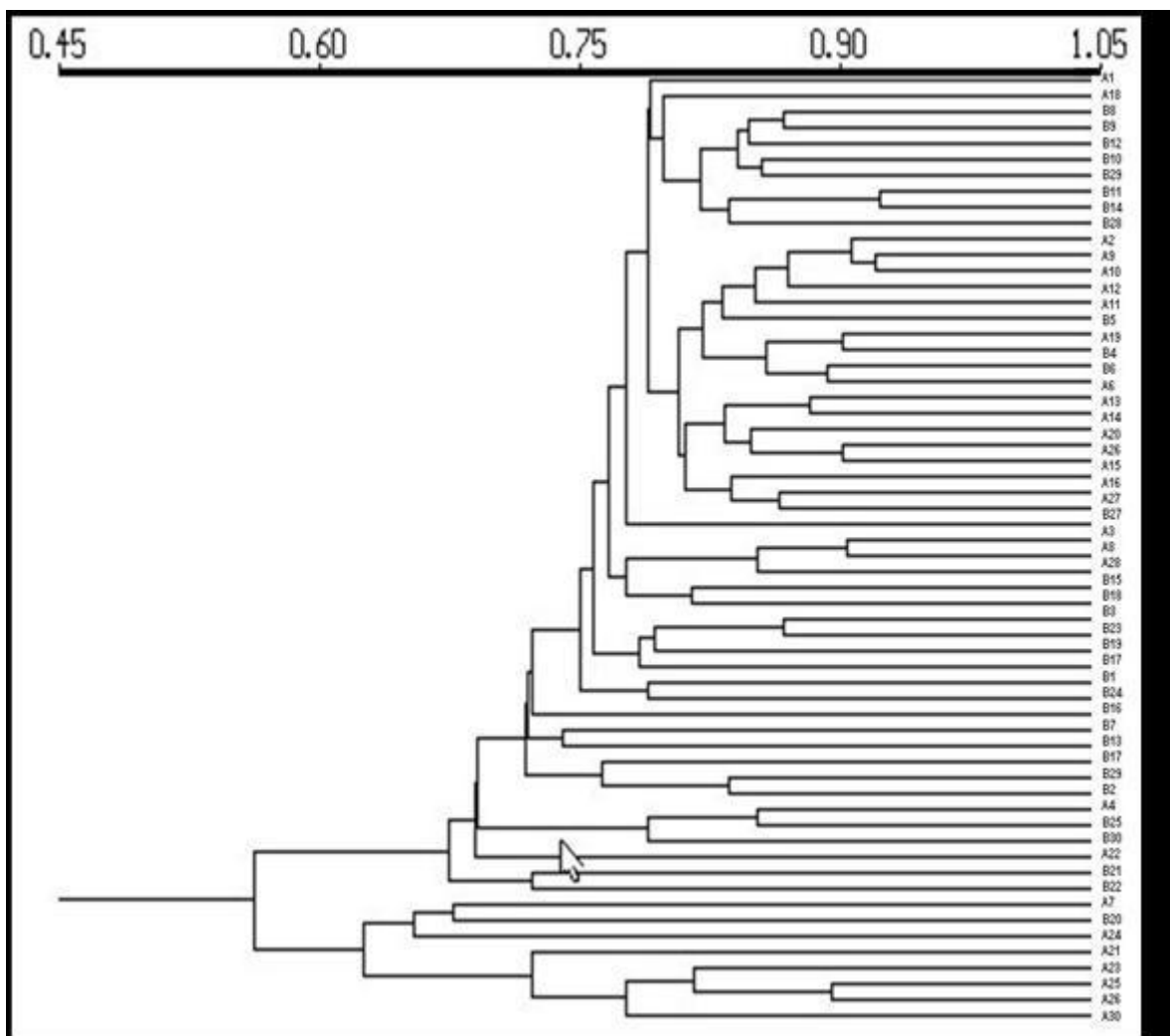
em uma única geração de *Solea senegalensis* observada por Porta et al. (2006). Estes autores observaram grande redução da variabilidade genética na reprodução de nove fêmeas e 11 machos, o que sugeriram ter ocorrido devido a participação de apenas uma fêmea e dois machos na progênie, fazendo com que o  $N_e$  diminuísse de 19,8 para 2,67. Isto é comum em muitas piscicultura, pois a alta prolificidade dos peixes e limitada estrutura física, levam a utilização de um pequeno número efetivo de reprodutores, promovendo, com o passar das gerações, um afunilamento genético (efeito *bottlencke*) e conseqüentemente levando a redução da variabilidade genética (Povh et al., 2006b).

O índice de diversidade genética ( $G_{st}$ ) entre os estoques de reprodutores de Ouro Preto do Oeste e Pimenta Bueno indica baixa diferenciação genética entre estes estoques, o que segundo Wright (1978) mostra uma homogeneidade genética entre estes (Tabela 2). O alto número de migrantes por geração obtido pode indicar a existência de um grande fluxo gênico entre os estoques, o que poderia explicar esta baixa diferenciação genética, que segundo Almeida et al. (2003) e Leuzzi et al. (2004), faz que seja menor a probabilidade de ocorrer perda de genes importantes quando as sub-populações são misturadas, ou quando são soltos peixes no ambiente.

**Tabela 2.** Diversidade genética Nei's ( $G_{st}$ ) e o número de migrantes por geração ( $N_m$ ) obtidos entre os estoques de *C. macropomum*.

Par de Populações	$G_{st}$	$N_m$
Ouro Preto x Pimenta Bueno	0,0361	13,3544

Pelo dendograma da Figura 2, pode-se observar que não houve formação de grupos distintos entre os estoques de *C. macropomum*, corroborando com a homogeneidade genética obtida pela diversidade genética de Nei's.



**Figura 2.** Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA dos reprodutores de *C. macropomum* pelo coeficiente de Jaccard, utilizando o programa NTSYS. A: Estoque de reprodutores da região de Ouro Preto do Oeste, RO; B: Estoque de reprodutores da região de Pimenta Bueno-RO.

### Conclusão

Os estoques de *C. macropomum* de Ouro Preto do Oeste e Pimenta Bueno apresentaram alta variabilidade genética e baixa diferenciação genética.

### Referências

- ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K.; CONTEL, E.P.B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, n. 3, p. 301-305, 2003.
- ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; GOMES, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Ed. da UFSM. p. 67, 104. 2005.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. A polymorphic SCAR-RAPD marker between species of tilapia (*Pisces: Cichlidae*). *Animal Genetics*, v. 30, p. 78-79, 1999.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: EMBRAPA. 3 ed. 1998. 220 p.

HILSDORF, A.W.;S.; RESENDE, E.K.; MARQUES, D.K.S. *Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 44 p.

LEUZZI, M.S.P.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; SODRÉ, M.L.K. 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.

MOREIRA, H.L.M. *Genética e melhoramento de peixes*. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN Maringá. *Fundamentos da moderna aqüicultura*. Canoas: ULBRA, 2001. p. 135-147.

PORTA, J.; PORTA, J.M.; MATÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; ALVAREZ, M. del C. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, v. 251, p. 46-55, 2006.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; MANGOLIN, C.A. et al. Padronização de protocolo de extração de DNA de pacu (*Piaractus mesopotamicu*). In: AquaCiência 2006, Bento Gonçalves. *Anais*. Bento Gonçalves: Aquabio, 2006b. CD-ROM.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MANGOLIN, C.A.; GASPARINO, E.; BARRERO, N.M.L.; GOMES, P.C.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L. Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. Em: AQUACIÊNCIA 2006, 2006, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquabio: FURG, 2006a. CD-ROM.

POVH, J.A. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá, 2007.

WRIGHT, S. *Evolution and genetics of populations*. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 511p.

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