

AValiação Reprodutiva e da Diversidade Genética de *Piaractus mesopotamicus* NO SISTEMA SEMINATURAL

Jayme Aparecido Povh*, Ricardo Pereira Ribeiro, Rodolfo Nadez Sirol, Danilo Pedro Streit Junior, Héden Luiz Marques Moreira, Nelson Mauricio Lopera-Barrero, Lauro Vargas, Patrícia Cristina Gomes, Carolina Besspalhok Jacometo e Taís da Silva Lopes

*Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR. E-mail: jpovh@hotmail.com

Resumo

Atualmente tem-se constatado a diminuição de muitas espécies de peixes em vários ambientes aquáticos. Como forma de minimizar esse impacto, o repovoamento tem sido muito empregado, contudo, pouca importância tem sido dada à variabilidade genética, parâmetro fundamental para qualquer prática de conservação genética. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade genética e a contribuição dos reprodutores na progênie de *Piaractus mesopotamicus* obtida pelo sistema de reprodução seminatural, através do marcador molecular microsatélite. Os resultados obtidos mostraram igual número de alelos para a progênie e para os reprodutores (cinco alelos), e que a heterozigose observada também foi semelhante, com valores de 0,563 e 0,550 respectivamente, indicando que foi mantida a variabilidade genética da progênie de *P. mesopotamicus* obtida pelo sistema seminatural. Ainda, foi observada a ocorrência de paternidade múltipla e contribuição diferenciada dos reprodutores para a progênie.

Introdução

Em muitos rios brasileiros tem ocorrido redução e até mesmo o desaparecimento de muitas espécies de peixes que antes eram comumente capturadas por pescadores. Entre essas espécies, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) atualmente é raramente encontrado em alguns rios brasileiros, como no Paranapanema (Britto et al., 2003). Isso ocorreu principalmente devido à poluição, assoreamento, construção de barragens e sobrepesca (Agostinho et al., 2005). Das ações empregadas para reduzir esses impactos, destaca-se o repovoamento, que vem se tornando cada vez mais comum (Hilsdorf et al., 2006). Essa prática, existente a mais de três décadas no Brasil, tem sido realizada, em geral, sem respaldo científico (Agostinho et al., 2005).

A ausência de um monitoramento genético dos peixes que serão soltos no ambiente é preocupante, pois o manejo reprodutivo pode proporcionar, em uma única geração, grande redução da variabilidade genética (Porta et al., 2006) e, conseqüentemente, reduzir a resistência às doenças e a capacidade de adaptar-se em um novo ambiente (Barroso et al., 2005), além de poder prejudicar o crescimento e a reprodução (Porta et al., 2006). Dessa forma, a manutenção da variabilidade genética através dos marcadores moleculares é fundamental para conservação genética (Sirol & Britto, 2006), e necessária para os indivíduos enfrentarem as mudanças ambientais, desenvolverem e evoluírem (Baerwald et al., 2007). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade genética e a contribuição dos reprodutores para a progênie de *P. mesopotamicus* obtida através do sistema de reprodução seminatural empregando o marcador molecular microsatélite.

Material e Métodos

Para este estudo foram utilizados 20 reprodutores (11 machos e 9 fêmeas) de *P. mesopotamicus* da Estação de Hidrologia e Aqüicultura da Duke Energy, localizada em Salto Grande, São Paulo. Esses peixes tinham, em média, 2,5 kg de peso; quatro anos de idade; e foram provenientes de um lote de 250 reprodutores, formados a partir de peixes capturados no rio Paraná.

O sistema reprodutivo utilizado foi o seminatural. Os reprodutores foram conduzidos para o laboratório e induzidos à reprodução com a aplicação de extrato de hipófise de carpa (Wojnarovich & Horváth, 1983). Sendo que após a indução à reprodução, os 20 reprodutores foram colocados em um tanque circular. Este apresentava 5,1 m de raio, 1,85 m de profundidade média, fluxo de água contínuo de 131 L/s, e um cano de seis polegadas com a função de permitir o escoamento da água na porção central. Dessa forma, os ovos puderam ser redirecionados pelo fluxo de água (7 L/s) para uma estação coletora. Uma incubadora cilíndrico-cônica de 200 litros de água, dentro da estação coletora recebeu os ovos proveniente do tanque circular, retendo-os, para em seguida serem transportados para a incubação no laboratório. Estabeleceu-se a retirada dos ovos na incubadora de captação a cada hora por um período de seis horas.

Para a amostragem da progênie, colheu-se 50 larvas um dia após a eclosão de forma aleatória das incubadoras de todos os horários de coleta de ovos. Essas foram armazenadas em microtubos e conservadas em álcool para posterior extração e amplificação do DNA.

O sêmen de todos os machos foi analisado após a reprodução quanto à motilidade progressiva, concentração e morfologia dos espermatozoides.

Extração e Amplificação do DNA

Para extração de DNA, foi utilizada a metodologia descrita por Aljanabi & Martinez (1997) modificada por Povh et al. (2006). Foram extraídas amostras de DNA de 50 larvas colhidas aleatoriamente e de fragmentos de nadadeira caudal de 0,5 cm² dos 20 reprodutores. A quantificação do DNA foi por comparação com concentrações de DNA de fago λ conhecidas em gel de agarose 1%, revelado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL). A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA) por uma hora a 70 volts, sendo a imagem capturada pelo sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

O DNA foi amplificado para um volume final de reação de 20 μ L, utilizou-se 1X do tampão Tris-KCl, 2,0 mM de MgCl₂, 0,8 μ M de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 0,2 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. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida foram realizados 30 ciclos, cada um consistindo de 30 segundos de desnaturação a 94°C; 30 segundos de anelamento do *primer* a temperatura variável para cada *locus* (Pme2, Pme4, Pme5 e Pme28 a 60°; Pme14 a 62°C; Pme20 a 58°C; Pme21 a 68°C; e Pme32 a 66°C); e um minutos de extensão a 72°C; após realizou-se uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Foram amplificados oito *loci* descritos por Calcagnotto et al. (2001), sendo as amostras após a amplificação submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% desnaturante (6 M de uréia) em tampão TBE 1X com 50 mA por sete horas. Em

seguida, utilizou-se a coloração com nitrato de prata, sendo que após a visualização das bandas, os géis foram fotografados com câmera digital da Sony (DSC-P93A).

Análise estatística

O número de alelos, a frequência dos alelos, e a heterozigose observada e esperada, foram calculadas para cada *locus* usando o programa GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset, 1995). Esse programa também foi utilizado para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, a deficiência ou excesso de heterozigotos e desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci*, calculados pelo método de cadeia de Markov. Os valores de diferenciação genética (F_{st}) entre os reprodutores e a progênie foram estimados pelo método de Weir e Cockerham usando o programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). A determinação da paternidade da progênie foi realizada através do programa Microsoft Excel.

Resultados e Discussão

Diversidade genética

Os oito *loci* produziram um total de 31 alelos, sendo que o tamanho variou de 182 pb (*locus* Pme5) a 268 pb (*locus* Pme21). Todos os alelos observados nos reprodutores foram encontrados na progênie; no entanto, as frequências desses para os *loci* Pme2 e Pme4 foram um pouco alteradas, sendo que o alelo de maior frequência para esses *loci* foi o “B” para os reprodutores e o “A” para a progênie. Ainda, apenas o *locus* Pme5 foi o único que apresentou alteração quanto ao alelo de menor frequência, passando do “D” nos reprodutores (7,5%) para o “A” na progênie (2,94%) (Tabela 1).

Tabela 1. Número (N°), tamanho (pb), menor frequência (< freq) e maior frequência (> freq) dos alelos para os oito *loci* obtidos para os reprodutores e a progênie de *P. mesopotamicus*.

Reprodutores	<i>Loci</i>							
	Pme2	Pme4	Pme5	Pme14	Pme20	Pme21	Pme28	Pme32
N°	5	5	4	4	2	3	5	3
pb	195-213	191-213	182-200	195-208	213-215	260-268	209-227	242-247
< freq	D (0,125)	E (0,125)	D (0,075)	A (0,025)	A (0,300)	C (0,025)	C (0,075)	C (0,075)
> freq	B (0,300)	B (0,250)	B (0,425)	B (0,725)	B (0,700)	B (0,925)	B (0,350)	B (0,800)
Progênie	<i>Loci</i>							
	Pme2	Pme4	Pme5	Pme14	Pme20	Pme21	Pme28	Pme32
N°	5	5	4	4	2	3	5	3
pb	195-213	191-213	182-200	195-208	213-215	260-268	209-227	242-247
< freq	D (0,047)	E (0,070)	A (0,029)	A (0,020)	A (0,171)	C (0,010)	C (0,031)	C (0,064)
> freq	A (0,361)	A (0,349)	B (0,412)	B (0,735)	B (0,829)	B (0,958)	B (0,438)	B (0,809)

Para os reprodutores, os *loci* Pme2, Pme5 e Pme28 mostraram desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que o Pme2 e o Pme28 indicaram um excesso de heterozigotos, com valores de Fis de -0,195 e -0,180, respectivamente, e o Pme5 indicou uma deficiência de heterozigotos, com Fis de 0,358 (Tabela 2).

O excesso de heterozigotos observado para os *loci* Pme2 e o Pme28 pode indicar a quebra do efeito Wahlund caso estes tenham sido formados por peixes coletados de diferentes

localizações do rio Paraná. Ainda, a deficiência de heterozigoto, observada para o *locus* Pme5 e também o Fis médio, pode ter ocorrido principalmente devido à endogamia, contudo, não se pode descartar a possibilidade de amostragem não aleatória.

Foi semelhante a heterozigose média observada na progênie (0,563) em relação a dos reprodutores (0,550). Contudo, na progênie quase todos os *loci* apresentaram valores de Fis negativos (-0,02 a -0,360), com exceção do *locus* Pme5 que apresentou Fis positivo (0,031). No entanto, nenhum valor de Fis diferiu de zero, indicando que não houve excesso nem deficiência de heterozigotos em todos os *loci* e, dessa forma, a reprodução pelo sistema seminatural de *P. mesopotamicus* indica que foi mantido o equilíbrio de Hardy-Weinberg na progênie (Tabela 2).

Tabela 2. Número de alelos (A), heterozigose observada (Ho), heterozigose esperada (He), coeficiente de endogamia (Fis) e teste de probabilidade para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (P(HW)) para os oito *loci* avaliados em *P. mesopotamicus*.

Amostras	<i>loci</i>								Média
	Pme2	Pme4	Pme5	Pme14	Pme20	Pme21	Pme28	Pme32	
Reprodutores (n=20)									
A	5	5	4	4	2	3	5	3	3,875
Ho	0,95	0,9	0,45	0,35	0,3	0,15	0,9	0,4	0,550
He	0,799	0,812	0,695	0,449	0,431	0,145	0,762	0,347	0,555
Fis	-0,195	-0,112	0,358	0,225	0,309	-0,040	-0,180	-0,160	0,010**
P(HW)	0,001**	0,101 ^{ns}	0,002**	0,294 ^{ns}	0,286 ^{ns}	1,000 ^{ns}	0,013*	1,000 ^{ns}	-
Progênie (n=50)									
A	5	5	4	4	2	3	5	3	3,875
Ho	0,791	0,744	0,882	0,490	0,342	0,083	0,833	0,340	0,563
He	0,759	0,768	0,658	0,431	0,287	0,081	0,713	0,329	0,503
Fis	-0,042	0,031	-0,360	-0,138	-0,190	-0,02	-0,170	-0,030	-
P(HW)	0,281 ^{ns}	0,687 ^{ns}	0,233 ^{ns}	0,822 ^{ns}	0,575 ^{ns}	1,000 ^{ns}	0,250 ^{ns}	0,426 ^{ns}	0,122 ^{ns}

n: número de amostras; ^{NS}Não significativo; *Significativo (P<0,05); **Significativo (P<0,01).

Composição genética da progênie

A análise da paternidade pelos alelos dos oito *loci* estudados permitiu a determinação de apenas 60% da progênie. Destes, ainda não foi possível a distinção de 13,3% e 3,3% da progênie entre os machos três e quatro e as fêmeas seis e nove, respectivamente (Gráfico 1).

Apenas seis fêmeas (F1, F3, F5, F6, F8 e F9) das nove fêmeas e seis ou sete (M1, M2, M3, M4, M7/M8 e M9 - não foi possível distinguir os machos sete e oito) de onze contribuíram com descendentes na progênie. Como todos os machos apresentaram valores qualitativo (motilidade de 40% a 90%) e quantitativo (0,17 a 2,5 x 10⁶ espermatozoides por mL e porcentagem de espermatozoides normais de 41% a 80%) considerados adequados para reprodução, não foi por problemas relacionados ao sêmen que os machos cinco, seis, dez e onze deixaram de contribuir para a progênie (Tabela 3).

Os reprodutores que contribuíram com descendentes na progênie resultaram em uma redução do número efetivo de reprodutores (N_e) de 19,8 para no máximo 12,9. Contudo, este N_e foi o suficiente para manter a heterozigose na progênie (0,563) em relação aos reprodutores (0,550), indicando que foi mantida a variabilidade genética na progênie.

Para ambos os sexos, a contribuição com descendentes na progênie foi diferenciada, sendo que um ou dois machos (M7 e/ou M8) e quatro fêmeas (F1, F3, F5 e F9) produziram um maior número de descendentes (Figura 1). Ainda, todos os reprodutores apresentaram comportamento de paternidade múltipla, sendo que as fêmeas foram fertilizadas por dois a seis machos, e os machos por três a cinco fêmeas.

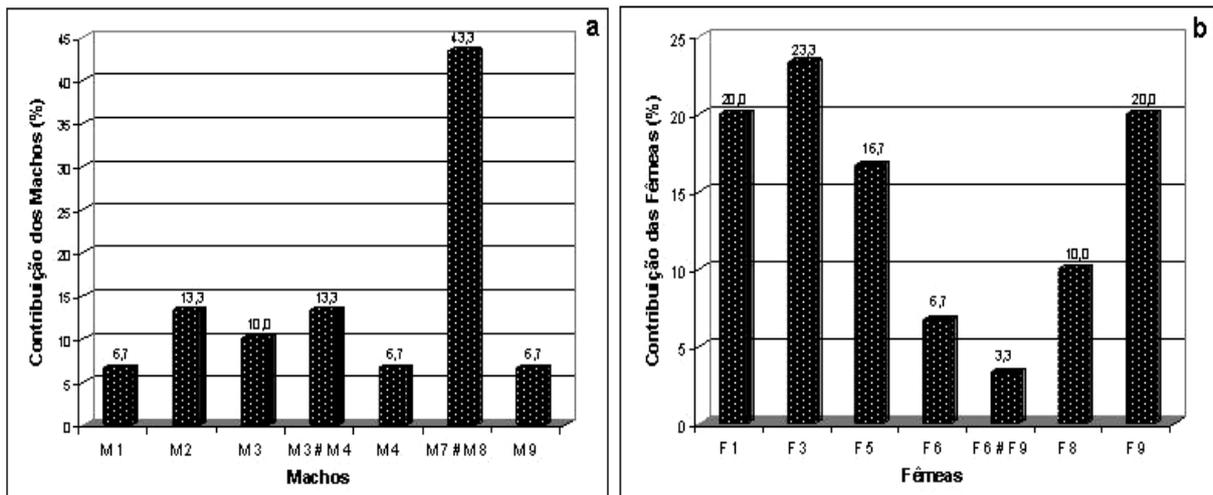


Figura 1. Participação dos reprodutores de *P. mesopotamicus* na composição da progênie através sistema reprodutivo seminatural. As figuras **a** e **b** mostram a contribuição genética dos machos e das fêmeas, respectivamente, para a composição da progênie.

É pouco provável que a contribuição desproporcional dos machos sete e/ou oito em relação aos demais esteja relacionada com a qualidade ou concentração do sêmen, como se pode observar pela análise dos machos que apresentaram sêmen com melhores parâmetros qualitativo e quantitativo em relação aos que contribuíram com mais descendentes. Além do mais, considerando que cada um desses dois machos tenha contribuído com metade dos 43,3% da progênie, esse contraste seria bastante reduzido em relação aos outros machos que apresentaram entre 6,7% a 13,3% de descendentes. Com relação às fêmeas, o contraste na contribuição para a progênie foi inferior ao encontrado nos machos, sendo que somente as fêmeas seis e oito tiveram contribuição bastante inferior (3,3% a 10%) ao encontrado para as fêmeas um, três, cinco e nove (16,7% a 23,3%).

Segundo Tuytens & Macdonald (2000), o nível de estresse pode afetar o estabelecimento de hierarquias e conseqüentemente o padrão dos acasalamentos e, portanto, podem ser uma das razões que levaram a contribuição desproporcional em ambos os sexos. Ainda, a baixa determinação de paternidade pelos oito *loci* estudados, apenas 60%, e a amostragem não aleatória talvez sejam fatores que possam estar levando a uma estimativa desproporcional entre a contribuição dos reprodutores com a progênie.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que houve paternidade múltipla, contribuição diferenciada para progênie de alguns reprodutores e que a variabilidade genética dos reprodutores foi mantida na progênie de *P. mesopotamicus* com a reprodução seminatural.

Agradecimentos

Os autores agradecem a empresa de geração de energia hidroelétrica Duke Energy Internacional pelo apoio ao presente trabalho.

Referências

AGOSTINHO, A.A; THOMAZ, S.M; GOMES, L.C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, v. 1, n.1, p.70-78, 2005.

ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, v.25, p.4692-4693, 1997.

BAERWALD, M.; BIEN, V.; FEYRER, F. et al. Genetic analysis reveals two distinct Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*) populations. *Conserv Genet*, v.8, p.159-167, 2007.

BARROSO, R.M; HILSDORF, A.W.S; MOREIRA, H.L.M. et al. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiaie) using microsatellites. *Aquaculture*, v.247, p.51-65, 2005.

BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; VIANNA, N.C. et al. *Peixes do rio Paranapanema*. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, 2003. 112p.

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.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.1), 2000.

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. 44p.

PORTA, J.; PORTA, J.M.; MATÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. et al. 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, 2., 2006, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquabio, 2006b. CD-ROM.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (version 3.3): population genetics software for exact tests and ecumenicism, 2001. Available from <http://www.cefe.cnrs-mop.fr/> Updated from RAYMOND, M.; ROUSSET, F., 1995.

SIROL, R.N.; BRITTO, S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M.G; HENRY, R.; JORCIN, A. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. São Carlos: RiMA, 2006. p.275-284.

TUYTTENS, F.A.M.; MACDONALD, D.W. Consequences of social perturbation for wildlife management and conservation. In: GOSLING, M.L.; SUTHERLAND, W.J. (Ed.). *Behaviour and Conservation*, Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p.315-329.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. *A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão*. Brasília: Escopo, 1983. 220p.