

# Análise genética de estoques de reprodutores de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) da Estação de Piscicultura de Promissão, utilizando marcadores de RAPD

F. Foresti, C. Oliveira, E. Revaldaves, F. P. Foresti e S. A. Santos

**Resumo-** O conhecimento da variabilidade genética dos estoques naturais e cultivados de peixes é de fundamental importância para um manejo correto desses estoques. Assim, cada vez mais, há a necessidade de ações diretas no sentido de procurar minimizar o efeito das barragens sobre as populações de peixes migradores dos grandes rios. O presente trabalho propõe a análise da estrutura genética de estoques cultivados de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), componentes do plantel de reprodutores da Estação de Piscicultura de Promissão. Os resultados mostraram que o valor médio de heterozigosidade observada para curimatá foi de  $H=0,2745$  e para pacu de  $H=0,1435$ . Esses resultados são similares a outros descritos na literatura porém estão abaixo do verificado para espécies migradoras. O correto manejo dos estoques mantidos em cativeiro permitirá a manutenção e, se necessário, o incremento da heterozigosidade dos exemplares a serem liberados nas operações de peixamento.

**Palavras-chave**— Genética de populações, monitoramento genético, conservação, peixes, RAPD.

## I. INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de populações, quer cativas, quer selvagens. Esses marcadores permitem a verificação tanto de relações filogenéticas entre espécies quanto de segregação reprodutiva entre populações reprodutivamente isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum [1, 3, 8, 9, entre outros]. Além das referências citadas, uma série de trabalhos vêm sendo desenvolvido, com o objetivo de auxiliar na conservação genética das espécies [4].

Com o presente projeto, pretendeu-se analisar os estoques de reprodutores de curimatá e pacu da Estação de Piscicultura de Promissão, com o objetivo de avaliar o

grau de variabilidade genética existente, através dos seus índices de heterozigosidade e polimorfismo.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### A. Materiais

Os animais utilizados no presente estudo são provenientes de estoques cultivados de *Prochilodus lineatus* (curimatá) e *Piaractus mesopotamicus* (pacu) componentes do plantel de reprodutores mantidos na Estação de Piscicultura de Promissão (São Paulo) da CGEET. Foi realizada a marcação de 120 exemplares com 'tags' magnéticos, 60 de pacu e 60 de curimatá, para identificação individual dos peixes. Os indivíduos marcados estão sendo mantidos separados em tanques de piscicultura. Após a marcação, foram tomadas amostras de sangue de cada exemplar. O sangue foi fracionado por centrifugação, sendo as células preservadas em álcool 95% com 100  $\mu$ M de EDTA e o plasma congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### B. Métodos

A técnica empregada para caracterização dos estoques é a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNAs*), conforme descrito na literatura [2], utilizando um kit e as respectivos sondas da empresa Amersham Pharmacia Biotech.

O DNA total foi obtido a partir de amostras de sangue ou de fragmentos de nadadeira utilizando o "kit" para extração de DNA total da Promega Inc. ("Wizard Genomic DNA Purification kit"). O DNA obtido foi analisado em géis de agarose [5] e quantificado por espectrofotometria.

As reações de amplificação dos alelos de RAPD foram efetuadas num ciclador térmico de PCR utilizando-se o "kit" comercial "Ready-to-go RAPD Analysis Beads" da empresa Amersham Pharmacia Biotech. A solução final obtida para a amplificação dos loci apresenta um volume final de 25  $\mu$ l e contém solução tampão de PCR, 20 pmol de sonda, 250 mM de dNTPs, 2,5 unidades da enzima *AmpliTaq*, e 25-50 ng do DNA genômico. Cada ciclo de PCR consiste basicamente da denaturação por 1 minuto a  $94^{\circ}\text{C}$ , hibridação por 1 minuto a  $50-55^{\circ}\text{C}$  e extensão por 2

---

Este trabalho é apoiado financeiramente pela Duke Energy International, Geração Paranapanema, Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP e pela Fundação do Instituto de Biociências de Botucatu.

F. Foresti, C. Oliveira, E. Revaldaves e F. P. Foresti trabalham no Depto. de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu (e-mail: fforesti@ibb.unesp.br).

S. A. Santos trabalha na Companhia de Geração de Energia Elétrica Tietê (e-mail: sasantos@tiete.fc.aesc.com.br).

minutos a 72°C. Esse ciclo é repetido 35 vezes e o passo final inclui uma extensão por 5 minutos a 72°C. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose. A detecção dos alelos foi feita em um sistema automatizado de análise de géis da Kodak.

Os dados obtidos foram analisados através do programa TFPGA (Miller, 1997).

### III. RESULTADOS

O DNA genômico foi extraído dos 60 exemplares amostrados de pacu e dos 60 exemplares de curimatá. O resultado das extrações foi checado em géis de agarose. O tamanho dos fragmentos obtidos foi compatível com as exigências das análises de RAPD. A quantidade de DNA de cada amostra foi verificada por espectrofotometria. Os resultados obtidos mostraram que a quantidade era suficiente para as análises programadas.

A seguir foram conduzidos testes para análise das amostras de DNA pela técnica de RAPD. Os procedimentos iniciais foram bastante satisfatórios, sendo que todas as seis sondas utilizadas amplificaram um grande número de bandas. Considerando que as sondas que amplificaram o maior número de bandas foram as de número 1 e 6 para pacu e 1 e 4 para curimatá, optou-se por iniciar os estudos populacionais por essas sondas.

Foram realizadas reações de PCR das 120 amostras com as sondas relacionadas acima. Dos exemplares de pacu analisados 47 apresentaram resultados satisfatórios para as sondas 1 e 6, sendo possível a identificação de 11 loci para a amostra. A análise estatística dos resultados mostrou que o valor médio de heterozigidade observada para essa espécie era de  $H=0,1435$  e a porcentagem de loci polimórficos de 45,45%. Dos exemplares de curimatá analisados 52 apresentaram resultados satisfatórios em todos os experimentos, sendo possível a identificação de 19 loci para a amostra. A análise estatística dos resultados mostrou que o valor médio de heterozigidade observada para essa espécie era de  $H=0,2745$  e a porcentagem de loci polimórficos de 78,94%.

### IV. DISCUSSÃO

Poucos estudos têm sido realizados até o momento no sentido de se verificar a heterozigidade em populações cultivadas de peixes, principalmente neotropicais. Os valores de heterozigidade observada para o pacu ( $H=0,1435$ ) e para o curimatá ( $H=0,2745$ ) são bastante elevados quando comparados àqueles obtidos para peixes de deserto da América do Norte ( $H=0,016$ ); são similares aos obtidos para pecílideos não migradores da espécie *Poeciliopsis occidentalis* ( $H=0,213$ ) e são menores que aqueles observados para a truta de lagos *Oncorhynchus clarki lewisi* ( $H=0,676$ ) e para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* ( $H=0,850$ ) [7]. Os estudos futuros de outras populações naturais em ambientes não impactados e de estoques de piscicultura permitirão uma melhor avaliação da heterozigidade dos estoques. Por outro lado, o correto manejo dos estoques hoje em cativeiro permitirá a manutenção e, se necessário, o incremento da hetero-

zigosidade dos exemplares a serem liberados nas operações de peixamento.

### V. AGRADECIMENTO

Os autores são gratos aos técnicos da Estação de Piscicultura de Promissão pelo auxílio na coleta e manutenção dos animais e aos alunos Alex Tadeu Ferreira e Yuri Rocha Arbex pelo auxílio na análises de laboratório.

### VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. Policansky and J. J. Magnuson, "Genetics, meta-populations, and ecosystem management of fisheries". *Ecol. Appl.* 8(1), pp. S119-S123, 1998.
- [2] F. Bardakci and D. O. F. Skibinski, "Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification". *Heredity*, 73, pp. 117-123, 1994.
- [3] G. Kotoulas, A. Magoulas, V. Immondi and E. Zouros, "Population genetics and fisheries management: the case of the swordfish, *Xiphias gladius*". in 5<sup>th</sup> Hellenic Symposium on Oceanography and Fisheries. Kavala, Greece, pp. 75-78, 1997.
- [4] J. C. Avise and H. L. Hamrick, *Conservation Genetics. Case histories from nature*. New York, Chapman & Hall, 1996, p. 512.
- [5] J. Sambrook, T. Maniatis and E. F. Fritsch, *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p. 1210.
- [6] M. P. Miller, "Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data". Programa de computador distribuído pelo autor, 1997.
- [7] R. C. Vrijenhoek, "Conservation genetics of North America desert fishes". In: J. C. Avise and H. L. Hamrick eds.: *Conservation Genetics. Case histories from nature*. New York, Chapman & Hall, pp. 367-397, 1996.
- [8] S. K. J. McConnell, D. E. Ruzzante, P. T. O'Reilli, L. Hamilton and J. M. Wrigth, "Molecular loci reveal highly significant genetic differentiation among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks from the east coast of Canada". *Molecular Ecology*, 6, pp. 1075-1089, 1997.
- [9] V. J. Birstein, J. Betts and R. DeSalle, "Molecular identification of *Acipenser sturio* specimens: A warning note for recovery plans". *Biol. Conserv.*, 84, pp. 97-101, 1998.