

Análise genética de populações selvagens de curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e lambari (*Astyanax altiparanae*) do rio Paranapanema, utilizando marcadores de RAPD

C. Oliveira, A. C. Pereira, E. Galhardo, F. Foresti e J.A. Moreira

Resumo- 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. No presente trabalho iniciou-se a análise da estrutura genética de populações naturais de curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e de lambari (*Astyanax altiparanae*) do rio Paranapanema. Os resultados mostraram que o valor médio de heterozigiosidade observada para curimbatá foi de $H=0,1856$ e para lambari de $H=0,2145$. Esses resultados estão abaixo do verificado para espécies de peixes migradoras, o que pode sugerir que as alterações ambientais no rio Paranapanema estejam causando algum impacto nas populações naturais. O correto manejo dos novos estoques em cativeiro permitirá a manutenção e, se necessário, o incremento da heterozigiosidade dos exemplares a serem liberados nas operações de peixamento envolvendo essas espécies.

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

I. INTRODUÇÃO

O conhecimento da variabilidade genética dos estoques naturais e cultivados de peixes é de fundamental importância para um manejo correto desses estoques. 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 pretende-se formar na Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Salto Grande estoques geneticamente caracterizados de reprodutores das espé-

cies *Astyanax altiparanae* (lambari) e *Prochilodus lineatus* (curimbatá) para peixamento. Essas espécies foram escolhidas por apresentarem ciclos de vida curto, no caso de *A. altiparanae*, e alta capacidade para sobrevivência em reservatórios, no caso de *P. lineatus*.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

A. Materiais

Os animais utilizados no presente estudo são provenientes de populações naturais de *Astyanax altiparanae* (lambari) e *Prochilodus lineatus* (curimbatá), coletadas no rio Paranapanema, São Paulo. Das amostras coletadas foram selecionados 120 exemplares de lambari e 100 exemplares de curimbatá, que foram marcados individualmente com "tags" magnéticos e estão sendo mantidos em tanques de piscicultura na Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura de Salto Grande (São Paulo) da Duke Energy International, Geração Paranapanema.

Durante o processo de marcação foram retiradas amostras de sangue de cada animal, no caso do curimbatá e de segmentos da nadadeira caudal, no caso do lambari. Esses tecidos foram preservados em etanol 95% com 100 μ M de EDTA, para as análises moleculares.

B. Métodos

A técnica empregada para caracterização dos estoques é a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNAs*), empregada conforme descrito na literatura [2], utilizando um kit e as respectivas 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 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 total de

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.

C. Oliveira, A. C. Pereira e F. Foresti trabalham no Depto. de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu (e-mail: claudio@ibb.unesp.br).

E. Galhardo trabalha no Departamento de Psicologia Experimental, Instituto de Psicologia, UNESP, Assis (egalhard@assis.unesp.br.)

J.A. Moreira trabalha na Duke Energy International, Geração Paranapanema (e-mail: jamoreira@duke-energy.com).

25µl e contém solução tampão de PCR, 20 pmol de sonda, 250 mM de dNTPs, 2,5 unidades da enzima *Ampli-Taq*, e 25-50 ng do DNA genômico. Cada ciclo de PCR consiste basicamente da denaturação por 1 minuto a 94°C, hibridação por 1 minuto a 50-55°C e extensão por 2 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

A. Formação de um plantel de reprodutores de lambari (*Astyanax altiparanae*)

Foi extraído o DNA genômico de todos os 120 exemplares marcados de lambari. O resultado das extrações foi checado em géis de agarose, quando observou-se que o tamanho dos fragmentos obtidos era compatível com as exigências das análises de RAPD. A quantidade de DNA de cada amostra foi verificada por espectrofotometria, e os resultados obtidos mostraram que a quantidade era suficiente para as análises de RAPD. 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 a sonda que amplificou o maior número de bandas foi a de número 4, optou-se por iniciar os estudos populacionais por essa sonda. Assim, foram realizadas reações de PCR das 120 amostras com a sonda número 4. Dos animais analisados 98 apresentaram resultados satisfatórios, sendo possível a identificação de 18 loci para a população. Foi feita uma análise estatística dos resultados que mostrou que o valor médio de heterozigosidade observada era de $H=0,2145$ e a porcentagem de loci polimórficos chegou a 94,4%.

B. Formação de um plantel de reprodutores de curimatá (*Prochilodus lineatus*)

Foi extraído o DNA genômico de todos os 100 exemplares amostrados de curimatá. O resultado das extrações foi checado em géis de agarose, quando observou-se que o tamanho dos fragmentos obtidos era compatível com as exigências das análises de RAPD. A quantidade de DNA de cada amostra foi verificada por espectrofotometria, e os resultados obtidos mostraram que a quantidade era suficiente para as análises de RAPD. Os procedimentos iniciais para análise das amostras de DNA pela técnica de RAPD foram bastante satisfatórios, sendo que cinco das seis sondas utilizadas amplificaram um grande número de bandas. Com base na análise do número de alelos amplificados nas reações de RAPD optou-se por iniciar os estudos populacionais do curimatá com a sonda número 3. Assim, foram realizadas reações de PCR das 100 amostras com a sonda número 3. Dos animais analisados 92 apresentaram resultados satisfatórios, sendo

possível a identificação de 29 loci para a população. Foi feita uma análise estatística dos resultados que mostrou que o valor médio de heterozigosidade observada era de $H=0,1856$ e a porcentagem de loci polimórficos chegou a 100%.

IV. DISCUSSÃO

Poucos estudos têm sido realizados até o momento no sentido de se verificar a heterozigosidade em populações naturais de peixes, principalmente na região Neotropical. Os valores de heterozigosidade observada para o lambari, $H=0,2145$, e para o curimatá, $H=0,1856$, são bastante elevados quando comparados àqueles obtidos para peixes de deserto da América do Norte ($H=0,016$); são similares aos obtidos para peixes 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]. Em termos gerais, considerando que ambas as espécies estudadas são conhecidamente migradoras, a heterozigosidade parece baixa, o que pode estar refletindo o efeito do impacto causado pelas barragens no rio Paranapanema. Porém, somente o estudo futuro de outras populações naturais de lambaris e curimatás, em ambientes não impactados e de estoques de piscicultura, permitirá uma melhor avaliação da heterozigosidade dos estoques. Por outro lado, o correto manejo dos estoques hoje em cativeiro permitirão a manutenção e, se necessário, o incremento da heterozigosidade dos exemplares a serem liberados nas operações de peixamento.

V. AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos aos técnicos da Estação de Hidro-biologia e Aquicultura de Salto Grande, em particular ao Sr. Marco A. T. Silva, pelo auxílio na coleta e manutenção dos animais.

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 5th 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*. 2nd 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 América 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. Wrieth, "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.