

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas

Alexandre Benvindo de Sousa¹ e Pedro Manoel Galetti Jr²

¹Professor Adjunto do Coltec UFMG

²Professor Titular do Dep. de Genética da UFSCar

RESUMO

Dois grupos, um nativo e outro cultivado, de Surubim Pintado *Pseudoplatystoma corruscans* provenientes da Bacia do São Francisco foram analisados por meio de marcadores de RAPD (Random amplified polymorphic DNA), O objetivo foi verificar a possível perda de variabilidade genética do grupo cultivado frente aos animais provenientes da natureza. Sob todos os aspectos analisados (teste de heterogeneidade, índice de fixação de alelos, distância e identidade genética de NEI) foi possível diferenciar os dois grupos e verificou-se uma acentuada redução da variabilidade genética no grupo cultivado, com um maior grau de similaridade genética entre os indivíduos provenientes de piscicultura. As causas desta redução e suas implicações sob o manejo da pesca, aquacultura e preservação desta espécie, são discutidas.

Palavras chave: Surubim, Marcadores moleculares, Efeito fundador, Piscicultura.

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.

Founder effect in a cultured stock of spotted catfish *Pseudoplatystoma corruscans*

ABSTRACT

Two groups cultured and native of the spotted catfish were studied with Random Amplified Polymorphic DNA markers. The aim of this paper is to assess a possible genetic variability loss in the cultured group if compared to native one. The population parameters analyzed, F_{st} , genetic distance, heterogeneity and genetic similarity revealed important differences between the groups, a strong reduction in genetic variability with great genetic similarity within the cultured group. The causes and the implications of such reduction to fisheries, conservation and aquaculture are discussed.

Key Words: Spotted catfish, Molecular markers, Founder effect, and Aquaculture.

INTRODUÇÃO

A aquacultura é o ramo da pecuária que mais tem crescido nas últimas duas décadas. Seja para a produção de alimento, alevinos ou ainda, com o objetivo de recompor os efetivos numéricos de espécies que vem sofrendo reduções de seus contingentes populacionais na natureza. Dentro das espécies neotropicais o surubim pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) é, ao lado do pirarucu (*Arapaima gigas*), a espécie que melhor se enquadra no contexto acima descrito. Ocorrendo nas bacias do Paraná, Paraguai e São Francisco, este animal é o principal objetivo tanto da pesca profissional quanto da amadora (Godinho *et al.* 1997). Este interesse tornou-o candidato natural à exploração comercial visando seu cultivo de forma intensiva. A despeito destes fatos, suas populações nativas estão reduzidas e em algumas sub-bacias praticamente desapareceu. A reintrodução, buscando recuperar estes grupos, já vem ocorrendo há algum tempo com animais provenientes de estações de piscicultura. Em geral, estes animais são oriundos de poucos pais, às vezes, de um só casal. Até o momento, os aspectos genéticos deste tipo de ação tem

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.

sido pouco considerados, dentre eles: a origem das matrizes, a redução da variabilidade genética que ocorre devido ao reduzido número de reprodutores na fundação do estoque, o efeito que estes novos estoques cultivados possam exercer sobre as populações nativas e ainda, se estes últimos podem responder as pressões seletivas do ambiente natural.

O conhecimento da estrutura e função do genoma de animais domésticos tem trazido um enriquecimento significativo no entendimento da biologia e cultivo de espécies de peixes (DAVIS e HETZEL, 2000). A utilização de marcadores moleculares tanto na ictiologia quanto na aquicultura tem demonstrado ser uma ferramenta valiosa, prática e de alta eficiência, auxiliando a resolver uma ampla gama de questões que vão desde a identificação de espécie à obtenção de mapas genéticos, passando por caracterização de populações até a definição de estratégias de conservação e melhoramento (FERGUSON *et al.*, 1995). Dentre as ferramentas moleculares a técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), descrita simultaneamente por WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH e MCLELLAND (1990), tem sido utilizada. Por não exigir um conhecimento prévio do genoma, uma vez que se utilizam iniciadores ("primers") decâmeros inespecíficos, e por ser uma técnica menos dispendiosa que outras ferramentas, ela tem se tornado, em algumas situações, a primeira técnica a ser utilizada, a despeito do inconveniente de apresentar padrão de segregação dominante e problemas de repetibilidade. Essas inconveniências podem ser suplantadas com a utilização de ferramentas estatísticas adequadas e estabelecimento de abordagem laboratorial criteriosa (escolha dos "primers", definição dos padrões de PCR, padronização de marcadores de interesse etc.).

Com o objetivo de comparar dois grupos de animais, um nativo oriundo de quatro locais na bacia do São Francisco e outro cultivado, utilizamos a técnica de RAPD a fim de verificar se houve redução da variabilidade genética no grupo cultivado e sugerir as possíveis causas desta redução e ainda, suas

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.

prováveis conseqüências sobre o manejo da pesca, conservação e cultivo desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinquenta e nove animais do grupo nativo foram capturados em quatro diferentes pontos da região centro norte do Estado de Minas Gerais (MG), Brasil e para efeito de análise da variabilidade genética foram considerados como uma metapopulação. Os animais do estoque cultivado tratam-se de treze animais, irmãos completos filhos de um único casal nativo proveniente da sub-bacia do Rio Paracatu (Miranda, comunicação pessoal), cuja desova foi realizada na estação de Piscicultura e Hidrobiologia da CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco) e foram mantidos na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como reprodutores.

A extração de DNA dos tecidos, fígado ou nadadeira, foi feita utilizando-se a técnica de fenol clorofórmio descrita por SAMBROOK *et al.* (1989). Para a obtenção de marcadores de RAPD, utilizou-se o kit *Ready to-go* da Amersham-Pharmacia-Biotech de acordo com as recomendações do fabricante. Foram testados onze oligonucleotídeos arbitrários. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador automático PTC 100 da MJ *Research* com conforme Sousa (2003). O programa adotado consistia de 35 ciclos, sendo o ciclo inicial de 94°C por 4 minutos, ciclo de desnaturação de 92°C por 1 minuto, ciclo de anelamento a 37°C por 1:30 minutos, ciclo de alongação de 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 3 minutos, findo estes ciclos o aparelho mantinha as amostras a 4°C.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose e ao final do processo o resultado foi fotografado em transluminador ultravioleta com o sistema de captura de imagens da Kodak EDAS 290. A partir das imagens obtidas construíram-se matrizes de ausência (0) e presença (1) de bandas para as análises estatísticas. Para proceder estas análises foram

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.

escolhidos para uso os seguintes softwares estatísticos: NTSYS versão 1.80 (Numerical Taxonomy and Multivariate analysis System) (Rohlf,1993) para a construção das matrizes de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (1901) ; para a análise de fluxo gênico, índice de fixação de alelos, frequência gênica, distância genética e dendrogramas utilizou-se o programa POPGENE 1.32 (YEH *et al.*, 1999), para a análise de diferenças entre as médias de similaridade genética entre os grupos utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) com teste de Mann-Whitney, disponíveis no pacote estatístico GraphPad InStat version 3.00 (www.graphpad.com) .

RESULTADOS

Dos onze nucleotídeos testados, três foram escolhidos para as análises populacionais por serem aqueles que apresentaram melhor padrão de repetibilidade e por serem os mais polimórficos, a saber, os oligonucleotídeos 1(5`-GGTGCGGGAA-3`) , 2 (5`-GTTTCGCTCC-3`) e 3 (5`-GTAGACCCGT-3`) da Amersham-Pharmacia-Biotech.

Foram evidenciados 35 locos polimórficos, com bandas que variaram de 220 a 1650 pares de bases (pb). A análise da frequência gênica mostrou que dos 35 locos polimórficos, 22 mostraram-se suficientemente resolutivos para discriminar os dois conjuntos estudados.

Os valores de identidade e distância genética de NEI (1978) índice de fixação de alelos (Tabela 1) permitiram diferenciar nitidamente os dois grupos populacionais estudados.

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.

Tabela 1- Comparação dos parâmetros populacionais entre os grupos nativo e cultivado de *P. corruscans* da bacia do São Francisco.

Número de loci polimórficos	Gst	Distância genética	Identidade Genética
35	0,323	0,300	0,740

Com relação à similaridade intrapopulacional a metapopulação nativa foi a que apresentou o menor valor de similaridade ($0,526 \pm 0,131$) com coeficiente de variação mais acentuado, 24,90%. O maior valor foi encontrado para o grupo cultivado com $0,803 \pm 0,066$ e menor coeficiente de variação 8,22%. Tabela 2 Os valores de coeficientes de similaridade encontrados foram significativamente diferentes entre os grupos

Tabela 2-Valores de Similaridade de Jaccard dos grupos estudados porcentagem de polimorfismo. ***Comparações entre as médias pelo Teste de Mann Withney ao nível de $p < 0,0001$.

Grupo	Valores de Similaridade e desvio Padrão	Coeficiente de Variação	Porcentagem de polimorfismo
Nativo	0,526 (0,131)***	24,90%	97.14 %
Cultivado	0,803 (0,066)***	8,22%	42.86 %

DISCUSSÃO

A utilização de marcadores moleculares em populações cultivadas de peixes tem se ampliado devido à eficiência e ao desenvolvimento das técnicas de DNA, auxiliando em diversas questões tais como: detecção de diferenças entre

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.

linhagens cultivadas e linhagens clonais (DESVIGNES *et al.* 2001), avaliação de heterozigose de linhagens (APPLEYARD e MATHER, 2000) identificação de marcadores de QTL (*Quantitative trait loci*) (SAKAMOTO *et al.* 1999), análise e construção de mapas de ligação (SAKAMOTO *et al.* 2000;) , determinação de paternidade (GARCIA DE LEON *et al.* 1998) e identificação de híbridos (Carvalho *et al.* 2009). O surubim pintado (*P. corruscans*) é a espécie nativa de maior valor econômico da piscicultura brasileira, tendo seu cultivo se espalhado rapidamente pelas regiões sul, sudeste e nordeste do país. Os produtores têm se valido de populações nativas para a obtenção de matrizes, embora, com as facilidades propiciadas pela piscicultura, matrizes cultivadas vem conquistando espaço junto ao mercado. Uma das questões chave relacionadas a aquicultura é a redução da variabilidade genética dos estoques cultivados, devido ao uso de poucos casais na obtenção de alevinos (NORRIS *et al.* 1999). No presente estudo estes efeitos são claros uma vez que, ainda que os dois grupos tenham como origem à mesma bacia hidrográfica, diferenças entre os mesmos foram detectadas por todas as análises estatísticas. O dendrograma obtido pelo método de UPGMA mostrou-se eficiente em separar todos os indivíduos em dois "clusters" distintos. Os animais do grupo cultivado mostraram uma similaridade maior ($0,803 \pm 0,066$) e menor taxa de polimorfismo (42,86%) que os animais nativos que apresentaram valores de similaridade de $0,526 \pm 0,131$, coeficiente de variação mais acentuado, 24,90%, e taxa de polimorfismo de 97,14%. Estes dados parecem indicar ter havido a fixação de alelos mais comuns ou mesmo a perda de alelos raros, o que explicaria a redução na taxa de polimorfismo. Efeito semelhante já foi descrito em Salmões por Norris *et al.* (1999) e em carpas por Desvignes *et al.* (2001). Segundo estes autores quando uma população passa por um efeito de *bottleneck* muitos alelos com baixas frequências são eliminados. Outros parâmetros confirmam a distinção entre as duas populações, a identidade genética entre elas foi considerada baixa (0,740) enquanto a distância genética alta (0,300). Diferenças entre estoques nativos e cultivados têm sido relatadas para camarões, (XU *et al.* 2001),

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.

Acará-disco (KOH *et al.* 1999), salmões (NORRIS *et al.* 1999 e TESSIER *et al.* 1995), truta marrom (HANSEN *et al.* 1997), dentre outras espécies. A utilização de apenas um casal para formar a população da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais levou ao estabelecimento de um efeito fundador, ocasionando a redução da variabilidade genética neste grupo.

A perda de variabilidade devido à utilização de um único casal fundador pode causar, em médio prazo, efeitos tais como a depressão por endogamia, o que limitaria, substancialmente, o potencial de ganho genéticos em futuros trabalhos de seleção e melhoramento desta espécie.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação à utilização de animais provenientes desta abordagem para fins de recomposição de efetivos numéricos, deve se levar em consideração uma vasta gama de fatores tais como: a interação entre os animais cultivados e o ambiente natural, a interação entre as populações cultivadas e as populações nativas, as características genéticas da população original fundadora do estoque cultivado, entre outros. Sugerimos que a utilização de vários casais e a utilização de famílias de meio-irmãos para a fundação de estoques cultivados deva minimizar a perda da variabilidade genética, ampliando assim a margem dos ganhos de seleção em programas de melhoramento desta espécie e aumente a variabilidade genética dos animais utilizados em programas de repovoamento.

APOIO FINANCEIRO:

Os autores são gratos a FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro na condução deste artigo.

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.

REFERÊNCIAS

APPLEYARD, S. A.; MATHER, P. B. Investigation into the mode of inheritance of allozyme and random amplified polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture Research*, v. 31, 435-445, 2000.

CARVALHO, D.C.; SEERIG, A.R.; MELO, D.C.; SOUSA, A.B.; OLIVEIRA, D.A.A. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.** In press, 2009.

DESVIGNES, J.F.; LAROCHE, J.; DURAND, J.D.; BOUVET, Y. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. **Aquaculture**, V.194, p.291-231, 2001.

ELO, K. ; IVANOFF, S. ; VUORINEN, J. A. ; PIIRONEN, J. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. **Aquaculture**, v. 152, p. 55-65, 1997.

FERGUSON, A., TAGGART, J. B., PRODHÖL, P. A. et. al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. **J. Fish. Biol.**, v.47 (suppl A), p. 103-126, 1995.

GARCIA de LEON, F.J.; CANONNE, M.; QUILLET, E.; BONHOMME, F.; CHATAIN, B. The application of microsatellite markers to breeding programs in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Aquaculture**, v.159, p.303-316, 1998.

GODINHO, H. P., MIRANDA, M.O.T., GODINHO, A.L., SANTOS, J.E. Pesca e biologia do Surubim *Pseudoplatystoma corruscans* no rio São Francisco. IN: MIRANDA, M.O.T. (org) **Surubim**. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p. 27-42 (Coleção meio ambiente, Séries de Estudos de Pesca, 19).

GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.** v. 37, p. 547-579, 1901.

KOH, T.L.; KHOO, G ; FAN, L.Q. PHANG, V. P. E. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of *Discus* (*Symphisodon spp.*) as revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. **Aquaculture**, v. 173, p. 485-497. 1999.

NILSSON, J., SCHMITZ, M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) in Arctic char. **Nordic. J. Fresh. Res.**, v.71, p.372-377, 1995.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 593-590, 1978.

NORRIS, A.T.; BRADLEY, D.G.; CUNNINGHAM, E.P. Microsatellite genetic variation between and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. **Aquaculture**, v.180, p.247-264, 1999.

ROHLF, J. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. NTSYS-pc Manual. Version 1.80. Exeter Software. New York. State University of New York. 1983.

SOUSA, A.B. e GALETTI Jr, P.M. Efeito fundador em um estoque cultivado de *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces: Pimelodidae): Uma análise da variabilidade genética entre populações silvestres e cultivadas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 742, 2010.

SAKAMOTO,T. ; DANZMANN,R.G. ; OKAMOTO, N. ; FERGUSON, M. ; IHSEN,P.E. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, V.173,p.33-43,1999.

SAKAMOTO,T.; DANZMANN,R.G. ; GHARBI,K. et. al. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sexspecific differences in recombination rates. **Genetics**,v.155,p.1331-1345,2000.

SAMBROOK, J., FRITISH,E.F., MANIATIS,T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,1989.

SOUSA, A. B. **Análise da variabilidade genética do Surubim do São Francisco, *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces, Pimelodidae): subsídios à conservação e ao cultivo da espécie**. São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar, 2003, 101p, il.(Tese de doutorado em Ciências). UFSCar, São Carlos.

TESSIER,N., BERNATCHEZ,L., PRESA, P., et al. Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. **J. Fish Biol.** v.47 (suppl A),p.156-163,1995.

XU,Z.PRIMAVERA,J.H.; De LA PENA,L;D. et.al. Genetic diversity of wild and cultured tiger shrimp (*P. monodon*) in the Philippines using microsatellites.**Aquaculture**.v.199.p.13-40,2001.

WELSH,J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, v.18,p.7321-7218,1990

WILLIAMS, J. G. K. ; KUBELIK, A. N. ; LIVAK, K. J. ; RAFALSKI,J. A. ; AND TINGEY,S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v. 18, p.6531-6535.1990.

YEH, F. C. ; YANG,R . ; BOYLE, T. Popgene Version 1.32. Microsoft Window based freeware for population genetic analysis. Quick user guide. Canada.University of Alberta. Centre for International Forestry Research.1999.