**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTEIS DE MATRIZES DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*, Cuvier 1818, NOS MUNICÍPIOS DE SANTARÉM E PEIXE-BOI NO ESTADO DO PARÁ.**

Leandro de Araújo Ferreira1\*, Igor Guerreiro Hamoy2,

Paola Fabiana Fazzi Gomes3, Sávio Lucas de Matos Guerreiro4.

1Mestre em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais (IFPA/Tucuruí); 2 Mestre em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais (UFRA/Belém); 3 Engenheiro de Pesca (UFRA/Belém)) 4 Doutor em genética e biologia molecular (UFPA/Belém).

\*Autor correspondente: leandroarferreira@gmail.com

**RESUMO**

O cultivo de peixes na região Norte do Brasil vem apresentado um desenvolvimento significativo. A espécie *Colossoma macropomum* é a espécie amazônica mais cultivada na região. O *C. macropomum* vem sendo objeto de estudo para programas de melhoramento genético no Brasil devido possuir um pacote tecnológico de reprodução fechado. Uma das principais preocupações em criações em cativeiro é a determinação da variabilidade genética dos planteis, a qual fornece a força que dá às populações capacidade de suportar pressões ambientais e antrópicas, principalmente, em sistemas de cultivo. A determinação da variabilidade genética é importante uma vez que pode mostrar a relação genética entre indivíduos, populações e até mesmo entre espécies diferentes. Logo, o trabalho tem como objetivo avaliar o nível de variabilidade de planteis de matrizes cultivadas de tambaqui em dois diferentes municípios do estado do Pará, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites. No trabalho foram analisadas 50 matrizes de tambaqui *C. macropomum* provenientes de duas estações de alevinagem, as quais estão localizadas nos seguintes municípios: Santarém e Peixe-boi. Para genotipagem foi utilizado um painel multiplex de microssatélites tri e tetra nucleotídeos. Foram calculados índices de diversidade genética, como: heterozigosidade, número de alelos por *locus*, e riqueza alélica, além de diferenciação populacional, teste de atribuição de assinatura genética e FST.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aquicultura, avanços tecnológicos, criação de peixes.

**ABSTRACT**

The cultivation of fish in the northern region of Brazil has presented a significant development. The species *Colossoma mamacropomum* is the more cultivated Amazonic species in the region. *C. macropomum* has been studied for breeding programs in Brazil because it has a closed breeding technology package. One of the major concerns in captive breeding is the genetic determination of the resources variability, qualification of a force that gives the ability to withstand environmental and anthropogenic pressures, especially in farming systems. The determination of genetic variability is important as it can show the genetic relationship between individuals, populations and even between different species. Therefore, the objective of this work is to evaluate the variability of broodstocks of cultivated of matrices in two different municipalities of Pará state, using molecular markers of microsatellite type. In the work, 50 matrices of *C. macropomum* tambaqui were born from four fish farms were analyzed, located in the following municipalities: Santarém and Peixe-boi. A multiplex panel of tri and tetra nucleotide microsatellites were used for genotyping. Indices of genetic diversity, heterozygosity, number of alleles per locus, and allelic richness, as well as the differentiation population and FST were calculated.

**Key words**: Aquaculture, technological advances, fish farming.

**INTRODUÇÃO**

O cultivo de peixes é considerado uma das atividades agropecuárias que mais cresce no Brasil. Sendo que, a criação de espécies nativas vem crescendo nos últimos anos. O tambaqui (*Colossoma macropomum,* Cuvier 1818) é a espécie nativa mais cultivada no Brasil, com uma produção de 135,86 mil toneladas em 2015 (IBGE, 2015).

Gran­de parte do aumento da produção desta espécie tambaqui *C. macropomum* é pela fa­cilidade de adaptação a alimentação artificial, rusticidade e resistência aos sistemas de cultivos, boa conversão alimen­tar e ótimo ganho de peso, sendo sua carne muito aprecia­da e com alto valor nutritivo (LOPERA­-BARRERO et al. 2011).

O processo de domesticação de uma espécie leva à perda natural de variabilidade genética. Na piscicultura brasileira, além da perda natural devido a este processo, há também uma tendência dos plantéis serem formados em sua maioria por um pequeno número de reprodutores e com alto grau de parentesco (HASHIMOTO et al., 2012).

 Logo, a determinação do grau de variabilidade nos estoques de reprodutores é de grande importância para iniciar um programa de melhoramento, pois o potencial evolutivo e de melhoramento depende da variabilidade genética (MELO et al., 2006). Desse modo, a correta identificação de estoques pode servir como ferramenta para o estabelecimento de bases de seleção, em programas de melhoramento. Este aspecto pode ser utilizado para aumentar a variabilidade genética (JACOMETO et al., 2010).

Vários marcadores moleculares têm sido utilizados para estudar a variabilidade genética em populações cultivadas de peixes. Dentre esses, os microssatélites são os marcadores com maior precisão para responder questões como endogamia e perda da diversidade genética (NAVARRO et al., 2008).

O Objetivo deste estudo foi avaliar o nível de variabilidade genética e estrutura populacional de reprodutores de tambaqui de duas estações de alevinagem do estado do Pará (Amazônia Oriental), gerando informações fundamentais para implantação de programas de melhoramento genético no estado.

**MATERIAL E MÉTODOS**

 As coletas foram realizadas em duas estações de alevinagem de diferentes municípios do Estado do Pará, sendo eles: Santarém (30 indivíduos) e Peixe-Boi (20 indivíduos). Deste modo, foram coletadas amostras, da nadadeira caudal, de 50 reprodutores de tambaqui, preservadas em etanol 95% e posteriormente armazenadas a -20°C.

 A extração do DNA foi realizada com o kit “*Genomic DNA Isolation Kit”*, da Norgen Biotek Corporation. A concentração do DNA das amostras foi calculada pelo índice de absorbância (A) das bases a 260 nm em espectrofotômetro NanoDropTM ND-1000 (Thermo Scientific). Após quantificação estas foram padronizadas para uma concentração de 5 ng/μl.

 As amostras foram genotipadas utilizando o sistema de genotipagem multiplex com 10 marcadores microssatélites. As PCRs foram realizadas no termociclador Applied Biosystems Simple Amp™.

 A heterozigosidade observada (HO) e esperada (HE) e seus possíveis desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Os valores de HE, foram testados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon no programa BioStat 5.0 (AYRES et al. 2007) para verificar se há diferenças significativas entre os valores encontrado neste estudo e os valores descritos por Fazzi-Gomes (2017), para os mesmos marcadores, em populações naturais, caracterizando assim a redução ou não, de variabilidade genética. O número de alelos por locus (Na), a frequência alélica e a riqueza alélica (AR) foram estimados utilizando o programa Fstat versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

 A diferenciação genética interpopulacional foi verificada com o FST (distância genética adequada ao modelo mutacional IAM) (WEIR; COCKERHAM, 1984) executado no programa Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A magnitude da diferenciação entre as populações foi determinada segundo a definição de Wright (1978), caracterizando como pequena valores de 0 a 0,05, moderada valores de 0,05 a 0,15, grande valores de 0,15 a 0,25 e extensa para valores acima de 0,25.

 Foi utilizado o programa Structure 2.2 (PRITCHARD et al., 2000) que utiliza análise bayesiana para inferir o número de populações geneticamente homogêneas (K) com maior probabilidade (média de Lnprob) de ocorrer no banco de dados analisado. Essa análise atribui genótipos individuais para um determinado número de agrupamentos levando a um equilíbrio de Hardy-Heinberg e equilíbrio de ligação em função das frequências alélicas dentro de cada agrupamento. O número real de K (com maior probabilidade de explicar o banco de dados) é obtido após execução da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) com múltiplas simulações entre os clusters atribuídos pelo programa e a variação de K inserida.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As tabelas 1 e 2 apresentam estimativas de variabilidade genética que são a heterozigosidade esperada (HE), o número de alelos por locus (NA), a riqueza alélica (AR) nos diferentes planteis analisados.

Tabela 1 - Índices de diversidade genética do plantel de Santarém(n=30).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Loci** | **Ho** | **He** | **Na** | **Ar** |
| Cmacrμ01 | 0,566 | 0,625 | 5 | 4,569 |
| Cmacrμ03 | 0,700 | 0,697 | 6 | 6,189 |
| Cmacrμ04 | 0,900 | 0,850 | 10 | 7,944 |
| Cmacrμ05 | 0,666 | 0,803 | 7 | 6,357 |
| Cmacrμ07 | 0,833 | 0,846 | 12 | 10,929 |
| Cmacrμ08 | 0,533\* | 0,786\* | 9 | 6,876 |
| Cmacrμ09 | 0,800 | 0,754 | 9 | 6,693 |
| Cmacrμ10 | 0,833 | 0,762 | 7 | 5,988 |
| Cmacrμ12 | 0,600\* | 0,875\* | 12 | 11,167 |
| Cmacrμ13 | 0,766 | 0,723 | 7 | 7,658 |
| **Média** | **0,720** | **0,772** | **8,4** | **7,437** |
| **Mediana** | **0,700** | **0,786** | **9,000** | **6,693** |

\* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005).

HO= Heterozigosidade observada, HE= Heterozigosidade esperada, NA= Número de alelos por locus e AR= Riqueza alélica.

Tabela 2 - Indices de diversidade genética do plantel de Peixe-boi(n=20).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Loci** | **Ho** | **He** | **Na** | **Ar** |
| Cmacrμ01 | 0,400 | 0,452 | 4 | 4,559 |
| Cmacrμ03 | 0,550 | 0,626 | 3 | 5,663 |
| Cmacrμ04 | 0,800 | 0,796 | 6 | 8,933 |
| Cmacrμ05 | 0,650 | 0,653 | 4 | 6,849 |
| Cmacrμ07 | 0,750 | 0,802 | 9 | 10,279 |
| Cmacrμ08 | 0,750 | 0,688 | 5 | 7,657 |
| Cmacrμ09 | 0,650 | 0,573 | 4 | 7,849 |
| Cmacrμ10 | 0,750 | 0,719 | 5 | 6,297 |
| Cmacrμ12 | 0,300\* | 0,765\* | 7 | 10,522 |
| Cmacrμ13 | 0,700 | 0,658 | 6 | 6,63 |
| **Média** | **0,630** | **0,673** | **5,3** | **7,524** |
| **Mediana** | **0,650** | **0,653** | **4,000** | **7,657** |

\* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005).

HO= Heterozigosidade observada, HE= Heterozigosidade esperada, NA= Número de alelos por locus e AR= Riqueza alélica.

Os dados significativos, das comparações por FST, entre os dois planteis, nos mostram diferenças nas frequências alélicas entre STM e PB (0,074). (Tabela 3)

Tabela 3 - Resultados observados no programa Arlequin 3.5.1.3 para a medida de FST, segundo Wright (1978) .

|  |  |
| --- | --- |
| **Populações** | **STM (30)** |
| **PB (20)** | 0,074 |

PB, Peixe Boi; STM, Santarém. Os valores não mostraram diferenças significativas com p-valor < 0.05.

 Pequena diferenciação genética

 Moderada diferenciação genética

 Grande diferenciação genética

 Extensa diferenciação genética

Os resultados do programa Structure com base na estatística de Evanno et al. (2005) mostra um ΔK ótimo = 2 (Figura 1). Formando, assim, duas grandes populações, representada pelas populaçoes heterogeneas de Santarém (verde) e Peixe-boi (vermelho). O distanciamento genético entre os planteis, nos mostra uma grande distância genética entre Santarém e peixe-boi (Figuar 2).

**Figura 1** – Estimativa do número de popuações de acordo com o método de Evanno Et al. (2005), o maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo.



**Figura 2** – Barplot originado no programa Structure, mostrando a clusterização das populações de matrizes.



 Perdas consideráveis de variabilidade genética foram detectadas, por microssatelites, os planteis de reprodutores Peixe-Boi (HE mediana = 0,653) quando comparado á populações selvagens de tambaqui descritas por Hamoy et al. (2011), Hamoy & Santos (2012), Aldea-Guevara et al.(2013) e Fazzi-Gomes et al. (2017), que utilizaram o mesmo painel de marcadores moleculares deste estudo. Já o estoque de Santarém (HE mediana = 0,786) apresentou a menor perda de variabilidade genética.

 A redução da variabilidade genética é esperada, em razão da seleção não intencional dos reprodutores de *C. macropomum* e do tamanho pequeno da população, quando não há um manejo genético adequado do plantel de reprodutores.

 O plantel de Santarém não apresentou redução significativa na variabilidade genética, fato que pode ser justificado pela facilidade da renovação de matrizes, pois esta piscicultura se localiza dentro da área de distribuição natural do tambaqui, o que não ocorre com a outra piscicultura investigada que esta mais distante geograficamente do ambiente natural dessa espécie, dificultando a introdução de novas matrizes.

 O NA para os planteis investigados neste trabalho foram, Santarém (NA mediana = 9,000), Peixe Boi (NA mediana = 4). O NA de Peixe-boi apresenta tendência decrescente comparado com dados de populações selvagens, de Hamoy (2011) (NA mediana= 9,6), Hamoy & Santos (2012) (NA mediana = 8,6), Aldea-Guevara et al.(2013) (NA mediana = 8,58) e Fazzi-Gomes et al. (2017) (NA mediana = 8.7).

 A moderada diferenciação genética associada à redução de variabilidade genética encontrada na maioria dos planteis de tambaqui no estado do Pará, são importantes informações para futuros programas de manejo genético, melhoramento genético e também de conservação da diversidade genética dessa espécie.

**CONCLUSÕES**

 O plantel de matrizes de Santarém apresentou menor perda de variabilidade genética, em relação às populações selvagens de tambaqui *C. macropomum*.

 As populações das matrizes em estudo ficaram divididas em dois clusters o que se considera a estruturação de dois estoques.

**REFERÊNCIAS**

ALDEA-GUEVARA, M.; HARGROVE, J.; AUSTIN, J.D. Diversity and geneflow in a migratory frugivorous fish: implications for Amazonian habitat connectivity. Conserv Genet. 2013. 14:935–942

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. Biostat 5.0.Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM; CNPQ. 364p. 2007.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, . Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14(8): 2611–2620. 2005.

EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 2010. v.10, p. 564-567.

FAZZI-GOMES, P.; GUERREIRO, S.; PALHEITA, G. D. A.; MELO, N. F. A. C. de; SANTOS, S.; and HAMOY, I. G. High genetic diversity and connectivity in Colossoma macropomum in the Amazon basin revealed by microsatellite markers. Genetics and Molecular Biology ,Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685. 2017.

GOUDET, J. FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3.2) Available at http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html. 2002.

HAMOY, I. G. Desenvolvimento de um painel multiplex de microssatélites para o tambaqui (Colossoma macropomum, characiforme: serrasalminae): Ferramenta eficiente para aplicação em manejo e conservação. Tese de Doutorado, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Pará. Belém. 136p. 2011.

HAMOY, I.G. & SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossomamacropomum*, developed as a tool for use inconservation and broodstock management. Geneticsand Molecular Research 11 (1): 141-146, 2012.

HASHIMOTO, D.T.; ALVES, A.L.; VARELA, E. S.; MORO, G.V.; &IWASHITA, M.K.P. Cartilha de Genética na Piscicultura : Importância da variabilidade genética, marcação e coleta paraanálise de DNA. Brasília, DF : Embrapa, 2012b.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Producão da Pecuária Municipal –. IBGE, Rio de Janeiro-Brasil. v. 43. p.1-49, 2015.

JACOMETO, C.B; LOPERA-BARRERO, N.M; RODRIGUEZ‑RODRIGUEZ, M.P; GOMES, P.C; POVH, J.A.; JUNIOR, D.P.S; LAURO VARGAS, L.; RESENDE, E.K de; &RIBEIRO, R.P. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae)de diferentes regiões do Brasil.Pesq. agropec. bras., Brasília, v.45, n.5, 2010. p.481-487.

LOPERA-BARRETO M.N., RIBEIRO R.P., POVH J.A., MENDES L.D.V. & POVEDA-PARRA A.R. Produção de organismos aquáticos: Uma visão geral do Brasil e no Mundo. Editora Agro livros, Guaíba, RS, 2011.320p.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA,C.S.; SOUSA, A.B.; COELHO, E.G.A.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA E.A. Caracterização genética de seis plantéis comerciaisde tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites.Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, v.58, 2006. p.87‑93.

NAVARRO, A.; BADILLA, R.; ZAMORANO. M.J.; PASAMONTES, V.; HILDEBRANDT, S.; SÁNCHEZ, J.J.; AFONSO, J.M. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparusauratus* L.), red porgy (*Pagruspagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. Aquaculture 285: 30-37. 2008.

PRITCHARD, J. K; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics. 2000. v. 155, p. 945-959.

WEIR, B. S; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution.1984. v. 38, p. 1358-1370.