**VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTEIS DE MATRIZES DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*, Cuvier 1818, NOS MUNICÍPIOS DE BREU BRANCO E ULIANÓPOLIS NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL.**

Leandro de Araújo Ferreira1\*, Paola Fabiana Fazzi Gomes2,

Sávio Lucas de Matos Guerreiro3, Igor Guerreiro Hamoy4.

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 tambaqui, *Colossoma macropomum*, é a espécie mais usada na aquicultura na região Amazônica. Apesar do cultivo desta espécie ser importante como alternativa para a exploração dos recursos pesqueiros, esta atividade precisa ser estrategicamente planejada para que seja rentável, sustentável, e não venha a trazer prejuízos para as populações naturais, que já se encontram em estado claro de sobreexplotação. Em sistema de cultivo, considera-se uma das principais preocupações em um plantel de matrizes a determinação da variabilidade genética, a qual fornece a força que dá às populações capacidade de suportar pressões ambientais e antrópicas. Deste modo, 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. Neste estudo foram analisadas 60 matrizes de tambaqui *C. macropomum* provenientes de duas estações de alevinagem, as quais estão localizadas nos seguintes municípios: Breu Branco e Ulianópolis. 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:** sustentabilidade, pressões antrópicas, cultivo de peixes.

**ABSTRACT**

The tambaqui, *Colossoma macropomum,* and the species most used in aquaculture in the Amazon region. Although the cultivation of this species is important as an alternative to the exploitation of the fishery resources, this activity needs to be strategically planned to be profitable, sustainable, and do not harm natural populations, they are already in a clear state of overexploitation. 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. 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, 60 matrices of *C. macropomum* tambaqui were born from four fish farms were analyzed, located in the following municipalities: Breu Branco and Ulianopolis. 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**: Sustainability, anthropic pressures, fish farming.

**INTRODUÇÃO**

O tambaqui é a espécie nativa mais cultivada no Brasil, seu cultivo é considerado uma fonte alternativa à exploração dos estoques selvagens (IBGE, 2015). Devido à sua importância econômica regional e nacional, este foi incluído no programa brasileiro de melhoramento genético (LOPES et al., 2009).

Apesar do crescente avanço, a realidade da maioria dos centros de alevinagem da espécie é a ausência de registros de avaliação zootécnica dos planteis comerciais e manejo genético. Outra questão observada nas estações de alevinagem é o baixo número de reprodutores utilizados no processo de produção (Santos et al., 2016), com grandes chances de acasalamento entre indivíduos consanguíneos.

Os efeitos da consanguinidade em peixes com domesticação recente, têm sido mundialmente investigados, demonstrando declínios de desempenho produtivo e perda de variabilidade genética, com acúmulos dos efeitos negativos a cada geração quanto maior o grau de parentesco genético, (VARELA, 2015).

O conhecimento da variabilidade genética permite, juntamente com a determinação de diferenças genéticas entre populações, um manejo genético organizado, minimizando os efeitos do endocruzamento, levando a uma melhor produtividade (JACKSON et al., 2003).

Os marcadores moleculares microssatélites tem sido muito utilizados para estudo variabilidade genética em populações cultivadas de peixes. Outra abordagem muito empregada com os microssatélites é a análise de parentesco, que revela informações relevantes para o manejo e conservação de espécies cultivadas (JONES et al., 2010).

Considerando, então, sua importância econômica para a região amazônica e em virtude dos problemas atuais relatados, fica evidente a necessidade de estudos genéticos de plantéis reprodutores de tambaqui, como forma de avaliar os níveis de variabilidade genética, gerando informações para futuros programa de melhoramento genético no estado do Pará.

**MATERIAL E MÉTODOS**

 O material das coletas foi adquirido em duas estações de alevinagem de diferentes municípios do Estado do Pará, sendo eles: Breu Branco (21 amostras) e Ulianópolis (39 amostras). As amostras foram, então, coletadas da nadadeira caudal, de 60 reprodutores de tambaqui, preservadas em etanol 95% e posteriormente armazenadas a -20°C.

 Realizou-se o processo de genotipagem utilizando o sistema 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 de Breu Branco e Ulianópolis.

**Tabela 7** - Índices de diversidade genética do plantel de Breu Branco (n=21).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Loci** | **Ho** | **He** | **Na** | **Ar** |
| Cmacrμ01 | 0,380 | 0,371 | 2 | 2 |
| Cmacrμ03 | 0,904 | 0,715 | 6 | 5,952 |
| Cmacrμ04 | 0,619 | 0,591 | 5 | 4,951 |
| Cmacrμ05 | 0,857 | 0,609 | 4 | 3,952 |
| Cmacrμ07 | 0,904 | 0,699 | 9 | 8,714 |
| Cmacrμ08 | 0,666\* | 0,470\* | 3 | 2,952 |
| Cmacrμ09 | 0,904 | 0,659 | 7 | 6,855 |
| Cmacrμ10 | 0,761 | 0,752 | 4 | 4 |
| Cmacrμ12 | 0,476\* | 0,684\* | 5 | 4,951 |
| Cmacrμ13 | 0,571 | 0,47 | 5 | 4,905 |
| **Média** | **0,704** | **0,602** | **5** | **4,923** |
| **Mediana** | **0,857** | **0,609** | **4,500** | **4,951** |

\* 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 8** - Índices de diversidade genética do plantel de Ulianópolis (n=39).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Loci** | **Ho** | **He** | **Na** | **Ar** |
| Cmacrμ01 | 0,589 | 0,463 | 5 | 2,999 |
| Cmacrμ03 | 0,512 | 0,485 | 10 | 5,255 |
| Cmacrμ04 | 0,794 | 0,703 | 10 | 4,766 |
| Cmacrμ05 | 0,589 | 0,744 | 8 | 4 |
| Cmacrμ07 | 0,615 | 0,731 | 19 | 6,629 |
| Cmacrμ08 | 0,487\* | 0,644\* | 10 | 3,947 |
| Cmacrμ09 | 0,717 | 0,664 | 11 | 5,226 |
| Cmacrμ10 | 0,512 | 0,469 | 8 | 3,924 |
| Cmacrμ12 | 0,461\* | 0,729\* | 14 | 6,533 |
| Cmacrμ13 | 0,410 | 0,518 | 11 | 2,513 |
| **Média** | **0,569** | **0,615** | **10,6** | **4,579** |
| **Mediana** | **0,589** | **0,664** | **10,000** | **4,766** |

\* 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 quatro planteis, mostram moderada diferenciação entre BB e U (0,106). (Tabela 3)

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

|  |  |
| --- | --- |
| **Populações** | **BB(21)** |
|  |   |
| **U (39)** | 0,106 |

BB, Breu Branco; U, Ulianópolis. Os valores não mostraram diferenças significativas com p-valor < 0.05.

 Pequena diferenciação genética

 Moderada diferenciação genética

 Grande diferenciação genética

 Extensa diferenciação genética

No programa Structure, os resultados, com base na estatística de Evanno et al. (2005), nos mostra um ΔK ótimo = 2 (Figura 1). Originando, também, duas grandes populações, representada pelas populaçoes heterogêneas de Breu Branco (em vermelho) e Ulianópolis (em verde). O distanciamento genético entre os planteis, nos mostra uma alta distância genética entre Breu Branco e Ulianópolis (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.



**Ulianópolis**

**Breu Branco**

 Os resultados detectaram diminuições consideráveis de variabilidade genética, por microssatelites, nos planteis reprodutores de Breu Branco (HE mediana = 0,609) e Ulianópolis (HE mediana = 0,664), 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.

 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. Os níveis de variabilidade genética de uma população natural ou mesmo de um plantel de reprodutores pode ser medido não somente pela heterozigosidade observada (HE), mas também pela sua diversidade alélica (MOREIRA et. al, 2007).

 Para uma espécie muito explorada como o tambaqui, a investigação e descoberta do nível de diversidade genética de planteis cultivados são fundamentais, visto que poucos estudos com marcadores confiáveis vêm sendo desenvolvidos (GOMES, 2015).

 O NA para os planteis investigados neste trabalho foram, Breu Branco (NA mediana = 4,5), Ulianópolis (NA mediana = 10). O NA de Breu Branco 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).

 Sendo assim, a situação encontrada nessas duas populações de matrizes pode estar intimamente relacionada à endogamia das matrizes, pois uma das causas é a redução da variabilidade genética,

**CONCLUSÕES**

 Os planteis de matrizes de tambaqui *C. macropomum* em Breu Branco e Ulianópolis, apresentaram redução significativa de variabilidade genética.

 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.

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.

GOMES, P. F. F. Análise da variabilidade genética das pisciculturas de tambaqui (*Colossomamacropomum*, cuvier 1818) do estado do Pará, utilizando marcadores microssatélites. Dissertação (Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais - UFRA), Belém. 2015.

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](http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html.%202002).

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.

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

JACKSON T.R.; MARTIN-ROBICHAUD, D.J.; REITH M.E. Application of DNA markers to the managent of Atlantic halibut (*Hippoglossushippoglossus*) broodstock. Aquaculture 220: 245-259. 2003.

JONES, A.G.; SMALL, C.M.; PACZOLT, K.A.; RATTERMAN, N.L. A practical guide to methods of parentage analysis. Molecular Ecology Resources, 2010.p. 10: 6-30.

LOPES, T.S.; STREIT JUNIOR, D.P.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.;LOPERA BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J.R. Diversidade genética de estoques de reprodutoresde *Colossomamacropomum*. ArquivoBrasileiro de MedicinaVeterinária e Zootecnia, v.61, 2009. p.728‑735.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V. da; SOUZA, V.R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, p.521‑526.2007.

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

SANTOS. C. H. A.; SANTANA, G. X.; SA LEITÃO, C. S.; PAULA-SILVA, M. N.; and ALEIDA-VAL, V. M. F. Loss of genetic diversity in farmed populations of Colossoma macropomum estimated by microsatellites. Stichting International Foundation for Animal Genetics. 2016. p. 373–376.

VARELA, E. S.; ALVES, A. L.; BARROSO, A. S.; TARDIVO, T. F.Parentesco genético emreprodutores de tambaqui(Colossomamacropomum)baseado em marcadoresde DNA: perspectivasde manejo genético naausência de pedigree. Palmas : Embrapa Pesca e Aquicultura, 2015.

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