

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Pseudoplatystoma punctifer* EM BARRAGEM NO RIO TELES PIRES - MT POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Leonardo Willian Gonçalves Ferreira Olímpio¹; Lara Endres da Silva²; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

1. Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: leonardowillianlive@outlook.com
2. Doutoranda do Programa de Biotecnologia; e-mail: lara.endres@gmail.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br

Área de conhecimento: **Genética Animal**

Palavras-chave: STR; Cachara; Fluxo gênico; Conservação genética; Peixes neotropicais.

INTRODUÇÃO

Atualmente as populações de peixes de água doce são fortemente afetadas pelas instalações de usinas hidrelétricas, principais responsáveis pela perda de conectividade entre populações ao longo de um rio e seus tributários (AGOSTINHO *et al.*, 2016). A fim de se mitigar os impactos negativos causados por tais empreendimentos, estratégias visando a manutenção e conservação das espécies afetadas devem ser desenvolvidas. Uma das formas mais eficientes para a conservação de uma determinada população é o conhecimento de sua estrutura genética por meio de parâmetros como diversidade alélica, níveis de endogamia, heterozigiosidade, dentre outros (BERT *et al.*, 2002). Neste cenário os marcadores moleculares se apresentam como uma das técnicas mais eficientes. Dentre os marcadores moleculares, os do tipo microssatélites podem ser facilmente obtidos por meio de *Next-Generation Sequencing*, o que torna sua produção pouco onerosa (KUMAR & KOCOUR, 2017). Além de apresentarem alta reprodutibilidade, estes marcadores são muito vantajosos por serem abundantes no genoma dos eucariotos e fornecerem informações sobre diferenciação genética e fluxo gênico (MEGLÉCZ *et al.*, 2014). Apesar da grande importância econômica que muitas espécies nativas, como a cachara (*Pseudoplatystoma punctifer*), desempenham na região do rio Teles Pires, pouco se sabe sobre os estoques que habitam tal região. A escassez de informações genéticas a respeito da espécie torna-se um agravante ainda maior quando se considera os impactos antrópicos aos quais a mesma está sujeita. No local onde a barragem da usina Teles Pires foi construída havia um conjunto de corredeiras conhecida como Sete Quedas, a qual não se sabia se consistia em uma barreira geográfica que impedia totalmente o contato entre as populações à jusante e à montante da mesma, ou se os indivíduos tinham capacidade de transpô-la e mesclar geneticamente as duas populações. Os esforços para manejo desta espécie dependem primordialmente desta resposta considerando que, caso as duas populações consistam em recursos genéticos distintos, qualquer ação antrópica no sentido de juntá-las pode causar mais efeitos negativos do que a própria construção das barragens. O uso de técnicas moleculares em estudos que visam a orientação de programas de manejo e conservação consiste em um grande avanço para a manutenção da biodiversidade local.

OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo principal gerar informações que sirvam de subsídio para medidas de manejo e conservação de populações de *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) localizadas à jusante e à montante das Usinas Hidrelétricas Teles Pires e São Manoel e reduzir possíveis impactos negativos à biodiversidade local. Tais orientações foram baseadas em dados como a quantificação da divergência genética intra e interpopulacional, identificação dos modelos de estruturação genética das populações e identificação da direção e intensidade do fluxo gênico nas populações, todos obtidos por meio de marcadores microsatélites previamente descritos na literatura para a espécie *Pseudoplatystoma punctifer*.

METODOLOGIA

No presente trabalho foram utilizados tecidos de nadadeira coletados em 13 pontos ao longo do rio Teles Pires – MT, 9 pontos à montante e 4 pontos à jusante dos reservatórios das usinas. As usinas hidrelétricas se responsabilizaram pela coleta e envio do material para análises laboratoriais. Para a extração de DNA foi utilizado o método salino descrito por Aljanabi e Martinez (1997). No total foram utilizados 65 indivíduos, 27 coletados à jusante e 39 coletados à montante do reservatório. A pureza a pureza (260 nm/280 nm) e a concentração (em ng.µL⁻¹) do DNA foram determinadas por densidade óptica via espectrofotometria de microvolume (NANOVUE DNA da GE Healthcare®). Os 15 primers foram descritos por Saulo-Machado *et al.* (2011) e são apresentados na Tabela 1. As reações de PCR foram padronizadas quanto à quantidade de MgCl₂ e quanto à temperatura de anelamento dos primers. Os amplicons foram então analisados em gel de agarose 2 % para visualização do DNA e determinação das melhores condições da reação. Em seguida os *loci* microsatélites foram testados nos 65 indivíduos coletados e analisados em gel de poliácridamida. A determinação dos genótipos para cada *locus* foi realizada com auxílio do equipamento DNA Analyzer 4300 (Li-Cor® Inc.) e do software SAGA GT (Li-Cor® Inc.). O desequilíbrio de ligação e número de migrantes por geração foram avaliados por meio do GENEPOP v. 4.0; para averiguar a existência de alelos nulos foi usado o Micro-Checker; o software HW-Quickcheck foi utilizado para avaliar o desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg; a análise discriminante de componentes principais (DAPC) no software R foi usada para verificar presença de estruturação genética nas populações. Pelo programa Cervus v. 3.0 foi determinado o conteúdo de informação polimórfico (PIC); a heterozigosidade observada e esperada, bem como riqueza alélica e índices de diferenciação genética, foram estimados por meio do software FSTAT 2.9.3.2; a probabilidade de um indivíduo atribuído a uma população ser, originalmente, de outra população foi calculada pelo software GeneClass. Migrate-n foi utilizado para averiguar a direção do fluxo gênico entre as populações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA extraído mostrou alto grau de pureza e concentrações satisfatórias. Dos 15 loci microsatélites testados, 12 puderam ser amplificados com eficiência. O *locus* Ppu6 teve baixa eficiência nas amplificações, o *locus* Ppu10 não pôde ser amplificado em nenhum indivíduos e o *locus* Ppu15 apresentou um tamanho de pares de base maior do que o marcador de pares de base utilizado no genotipador, de modo que foram descartados das análises. Os genótipos foram eficientemente determinados por meio de gel de poliácridamida em sequenciador semiautomático. O programa HW-Quickcheck mostrou que a maioria dos *loci* se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e também mostrou que a

heterozigotidade observada está menor que o esperado. Por meio do MicroChecker foi possível constatar a possibilidade de existência de alelos nulos em quase todos os *loci*, o que pode ser devido ao excesso de homozigotos. Segundo o programa CERVUS, 8 dos 15 *loci* utilizados são altamente informativos, três são moderadamente informativos e apenas um é pouco informativo, o que indica que os marcadores não estão fornecendo informações redundantes. Os dados obtidos pelo FSTAT (Tabela 1) evidenciaram uma alta diferenciação genética entre as populações de cachara, de modo que as populações à jusante e à montante dos reservatórios consistem em populações distintas e, conseqüentemente, em recursos genéticos diferentes. Além disso observou-se alto índice de endogamia, que pode ser ocasionado pelo cruzamento de indivíduos aparentados dentro das populações. Este é um fator desvantajoso uma vez que pode gerar a fixação de alelos deletérios (FREEMAN & HERRON, 2009).

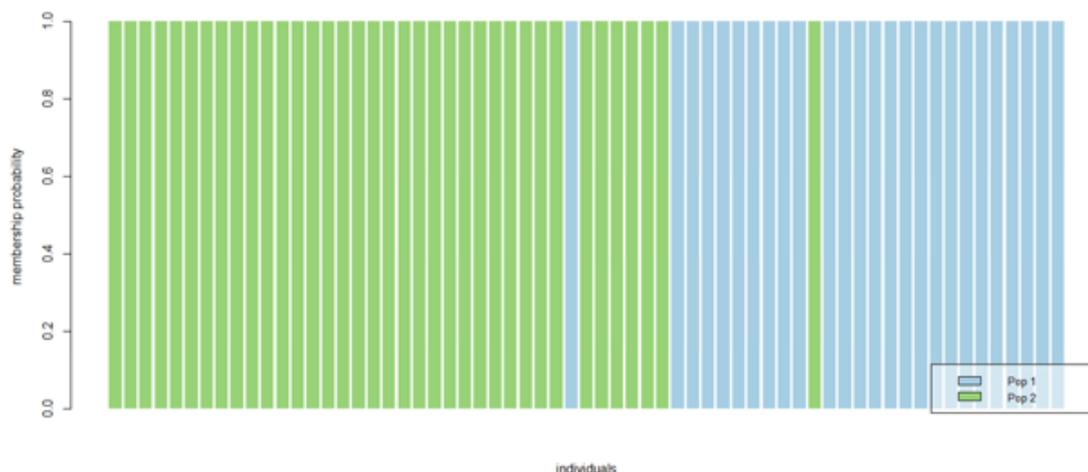
Tabela 1. Valores do índice de endogamia e de diferenciação genética em populações de *P. punctifer* coletadas à montante e à jusante dos reservatórios da UHE Teles Pires e São Manoel.

Espécie	F _{IS}	F _{ST}
<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	0,581	0,182*

*Significativo para 95% de confiabilidade ($p < 0,05$)

A Figura 1 corresponde ao resultado obtido pelo DAPC no software R (Figura 1), que mostra claramente a estruturação das populações analisadas e caracterizam as corredeiras Sete Quedas como barreira semipermeável.

Figura 1. Estruturação genética entre populações de *Pseudoplatystoma punctifer* coletadas à jusante e à montante dos reservatórios da UHE Teles Pires e São Manoel.



Verde: Montante; Azul: Jusante.

Tais informações foram corroboradas pelos programas GeneClass, Genepop e Migrate-n, pois os mesmos indicam baixos números de migrantes por geração (0,4) e mesma intensidade de fluxo gênico em ambas as direções. Estes resultados demonstram que as corredeiras Sete Quedas consistiam em uma barreira natural semipermeável, embora o fluxo gênico entre as duas populações não fosse frequente.

CONCLUSÃO

As análises genéticas atenderam os objetivos especificados. A estruturação das populações de *Pseudoplatystoma punctifer* foi evidenciada, de modo que as populações à jusante e à montante dos reservatórios consistem em recursos genéticos distintos e devem ser manejados separadamente. Essas informações devem ser levadas em conta para futuros programas de manejo da cachara, que devem preservar as particularidades genéticas de cada população. O índice de endogamia encontrado ressalta a necessidade de monitoramento a longo prazo desta espécie.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SANTOS, N. C. L.; ORTEGA, J. C. G.; PELICICE, F. M. Fish assemblages in Neotropical reservoirs: Colonization patterns, impacts and management. **Fisheries Research**, v. 173, p. 26-36, 2016.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- BERT, T. M.; SEYOUM, S.; TRINGALI, M. D.; McMILLEN-JACKSON, A. Methodologies for conservation assessments of genetic biodiversity of aquatic macro-organisms. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 3, p. 387-408, 2002.
- FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Análise Evolutiva**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- HILSDORF, A. W. S. **Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil**. 2013. 159 f. Tese (Livre Docência) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.
- KUMAR, G.; KOCUOR, M. Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review. **Fisheries research**, v. 186, p. 11-22, 2017.
- MEGLÉCZ, E.; PECH, N.; GILLES, A.; DUBUT, V.; HINGAMP, P.; TRILLES, A.; GRENIER, R.; MARTIN, J. QDD version 3.1: a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. **Molecular ecology resources**, v. 14, n. 6., p. 1302-1313, 2014.
- SAULO-MACHADO, A. C.; FORMIGA, K. M.; ORTIZ, M. F.; SOUSA, A. C. B.; ALVES-GOMES, J. A.; BATISTA, J. S. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: pimelodidae). **Conservation Genet Resour**, v. 3, n. 2, p. 307-310, 2011.