



I SIMPÓSIO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SÃO FRANCISCO
Integrando conhecimentos científicos em defesa do Velho Chico.

ANÁLISE PRELIMINAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA INTRA E INTERPOPULACIONAL EM *Prochilodus costatus* (VALENCIENNES, 1850)

Aparecida Jayane Sampaio Miranda^{1*}; *Keyla Vitória Xavier*¹; *Liliane Gallindo Dantas de Oliveira*²; *Patrícia Avelo Nicola Pereira*³ & *Kyria Cilene de Andrade Bortoleti*³

Resumo – *Prochilodus costatus* é uma espécie endêmica do rio São Francisco que apresenta hábitos bentopelágicos e detritívoros, destacando-se na atividade pesqueira de subsistência e comercial. Tais características ressaltam a importância ecológica e econômica desta espécie, cujas populações estão sendo impactadas pelas atividades antrópicas, a exemplo da implementação das obras da transposição do rio São Francisco, o que pode modificar a estrutura e diversidade genética destas populações. Diante deste cenário, este estudo apresenta uma análise preliminar da variabilidade genética em populações de *P. costatus* mediante o uso de marcadores do tipo microssatélites a fim de gerar informações eficazes para programas de conservação. O número de 79 indivíduos foi coletado em quatro Sub-bacias, descritas como pontos de monitoramento do PISF, sendo analisados para um *locus* microssatélite (Pcos14), descrito na literatura para a espécie. Os resultados encontrados revelaram consideráveis níveis de diversidade alélica intrapopulacional para a espécie *P. costatus*, indicando que o *locus* Pcos14 será útil em estudos de estrutura genética populacional de *P. costatus* nos recursos hídricos envolvidos no PISF.

Palavras-Chave – Curimatã; Diversidade genética; Programas de Conservação.

¹ Estudante de Ciências Biológicas; Bolsista do CEMAFUNA; UNIVASF, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº - C1, CEP 56.300-990; *jayane_miranda@hotmail.com.

² Professor; Colegiado de Ciências da Natureza; UNIVASF, Av. Tomaz Guimarães, s/nº, Santos Dumont, Senhor do Bonfim – BA, CEP 48.970-000.

³ Professor; Colegiado de Ciências Biológicas; UNIVASF.



I SIMPÓSIO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SÃO FRANCISCO

Integrando conhecimentos científicos em defesa do Velho Chico.

INTRODUÇÃO

Considerada uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco e migradora de longa distância, *Prochilodus costatus* (Prochilodontidae/Characiforme), conhecido na popularmente como Curimatã-pioa, Curimatã ou Curimatá (Castro e Vari, 2003; Carvalho-Costa *et al.*, 2006), destaca-se na atividade pesqueira de subsistência e comercial (Barbosa e Soares; 2009; Melo *et al.*, 2013). Concomitantemente, apresenta um relevante papel ecológico devido aos seus hábitos bentopelágicos e detritívoros, desenvolvendo um papel fundamental na ciclagem de matéria orgânica em ecossistemas límnicos, enfatizando assim a sua importante participação em programas de conservação (Barroca, 2012).

As condições naturais dos rios têm sido constantemente alteradas por intervenções antrópicas, a exemplo dos barramentos relacionados às construções de hidrelétricas, o desmatamento da mata ciliar e a introdução de espécies de outras regiões [Relatório de Impacto Ambiental – RIMA (2004)], podendo ocasionar alterações na composição da ictiofauna, inclusive do curimatã. Nesta vertente, a implementação do PISF (Projeto de Integração do Rio São Francisco com Bacias Hidrográficas do Nordeste Setentrional), empreendimento de infraestrutura hídrica que visa à transposição das águas do rio São Francisco dos reservatórios de Sobradinho e Itaparica para bacias receptoras distribuídas em Pernambuco, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte (Kosminsky e Zuffo, 2009), pode gerar impactos diretos e indiretos sobre a ictiofauna local, estimada em 250 a 300 espécies (Alves, 2005), sendo 214 e 76 nativas e endêmicas da bacia do rio São Francisco, respectivamente (Barbosa e Soares, 2009). Aliada à intensa pesca, tais intervenções prejudicam a manutenção dos estoques naturais em toda a bacia podendo contribuir para a diminuição da abundância de certas espécies de peixes ou mesmo a extinção de algumas delas (Barroca, 2012).

Espécies com hábitos migratórios, como o *P. costatus*, são afetados pelas barreiras estabelecidas pelas ações antrópicas, uma vez que estas alteram as características químicas e físicas dos rios e, conseqüentemente, modificam o habitat natural desses peixes. Além de promover a alteração do sistema e modificar a estrutura das comunidades aquáticas, estas interferem no comportamento e na composição da ictiofauna induzindo novos regimes de seleção às populações (Barbosa e Soares, 2009), bem como levar à conexão de populações anteriormente isoladas. Por conseqüência, modificações na estrutura e diversidade genética da ictiofauna local podem ocorrer; tornando imprescindível o conhecimento prévio da variabilidade genética dessas populações.

Os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequences Repeats; Repetições de Sequências Únicas*) têm sido um importante marcador molecular em estudos voltados à genética de populações e biologia da conservação, principalmente por apresentarem um alto grau de polimorfismo, natureza codominante, herança mendeliana e distribuição aleatória nos genomas (Boris *et al.*, 2011; Nagpure *et al.*, 2013). Em peixes, a análise de dinâmica e estrutura genética-populacional mediante o uso dos microssatélites permite avaliar a variabilidade genética intra e interpopulacional, estimar níveis de fluxo gênico, bem como inferir sobre o tempo de isolamento entre as populações naturais (Moreira *et al.*, 2007) resultantes de alterações ambientais.

O presente trabalho apresenta uma análise preliminar da diversidade genética em populações da citada espécie, mediante a empregabilidade de um *locus* previamente descrito para *P. costatus*, ocorrentes em Sub-bacias doadoras (Moxotó, Brígida, Terra Nova e Pajeú) e receptora (Apodi) de águas para a transposição do rio São Francisco.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 79 indivíduos de *P. costatus* foram coletados em quatro pontos de monitoramento do PISF: PM 11- Riacho do Mel (Arcoverde-PE), Sub-bacia do rio Moxotó (33 indivíduos); PM 16 - Riacho Brígida (Parnamirim-PE), Sub-bacia do rio Brígida (13 indivíduos); PM 17- Açude Terra Nova (Terra Nova-PE), Sub-bacia do rio Terra Nova (cinco indivíduos); PM 22- Açude Santa Cruz (Apodi-RN), Sub-bacia do rio Apodi (26 indivíduos). O DNA genômico foi extraído a partir de tecido muscular usando o método de fenol-clorofórmio (Pearson e Stirling, 2003). A quantidade de DNA foi determinada usando o espectrofotômetro (FEMTO Cirrus 80 MB), enquanto que a qualidade foi visualizada em gel de agarose 1%.

As PCRs foram realizadas em termociclador (Amplitherm Thermal Cyclers Tx 96 Plus) para verificar a temperatura de anelamento dos *primers* (Pcos14; Carvalho-Costa *et al.*, 2006). Posteriormente, as PCRs foram preparadas para um volume final de 10 uL, contendo 100 ng de DNA genômico, 1X Buffer Green, 1,5 mM MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 10 pmol/ uL de cada *primer* e 1U de GoTaq polimerase (Promega). O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos constituídos de 30s a 94°C, 30s a 48,5°C, 30s a 72 °C e extensão final a 72° C por 20 min. Os produtos de amplificação foram inicialmente analisados em géis de agarose 1,5% em tampão 0,5 X TBE corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador.

A genotipagem dos indivíduos foi realizada em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% em 1 x TBE corado com nitrato de prata (Creste *et al.*, 2001), enquanto que o tamanho dos fragmentos foi determinado com auxílio do ladder 10 pb (Invitrogen). O número de alelos, as heterozigosidades observada e esperada e índice de diferenciação populacional foram obtidos mediante o programa Arlequin (v. 3.5.2.2) (Excoffier e Lincher, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises indicaram que o *locus* Pcos14 apresenta-se altamente polimórfico, sendo encontrados 26 alelos entre as populações, cujos tamanhos de fragmentos e frequências variaram entre 120 - 250 pb (Tabela 1) e 0,006 - 0,14 (Tabela 2), respectivamente.

Tabela 1: *Locus*, seqüências dos *primers*, motivo de repetição, temperatura de anelamento do *primer* (Ta), tamanho dos fragmentos gerados (TF), número de alelos observados (N) para um *locus* de microssatélite em *Prochilodus costatus*.

<i>Locus</i>	Seqüência dos <i>primers</i>	<i>Motif</i>	Ta (°C)	TF (pb)	N
Pcos14	F: CGTGAATGTGCTTTATATGC R: AATGCCATTTCTGATTAAGG	(TC) ₄₉	48,5	120-250	26

Legenda: pb (pares de bases)

Tabela 2: Frequência de cada alelo microssatélite em indivíduos de *P. costatus*.

Alelos (pb)												
120	136	166	176	178	180	182	184	186	188	190	192	194



I SIMPÓSIO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SÃO FRANCISCO
Integrando conhecimentos científicos em defesa do Velho Chico.

Frequência alélica	0,006	0,006	0,032	0,006	0,032	0,032	0,025	0,006	0,044	0,089	0,05	0,083	0,032
	196	198	200	202	204	206	208	210	212	216	218	222	250
Frequência alélica	0,044	0,14	0,083	0,006	0,064	0,044	0,064	0,013	0,025	0,006	0,006	0,013	0,019

Os dados estatísticos mostraram que as populações dos PMs 22, 11, 16 e 17 apresentam alta heteroziguidade alélica a nível intrapopulacional, ressaltando assim a presença de diversidade genética (Tabela 3). Os altos valores para o *pool* de indivíduos analisados assemelham-se aos descritos por Carvalho-Costa *et al.* (2006) para uma amostragem da bacia do rio São Francisco (21 alelos em uma amostragem de 47 indivíduos, H_o e H_e igual a 0,89 e 0,92, respectivamente).

Tabela 3: Índices de Heteroziguidade observada (H_o) e esperada (H_e) para as populações de *P. costatus* com número amostral consistente.

Ponto de monitoramento do PISF	H_o	H_e
PM 22	0,884	0,924
PM 11	0,878	0,849
PM 16	1	0,852
PM 17	1	0,8

Estes autores sugerem alta variabilidade genética para a espécie, possivelmente associada a um longo isolamento das populações. Este fato não pode ser confirmado para as populações analisadas no presente trabalho; uma vez que o índice de diferenciação populacional (F_{st}) foi igual a 0.009 sugerindo que estas populações estão conectadas. No entanto, vale ressaltar que apenas um *locus* foi utilizado para esse estudo, tornando necessário a análise comparativa de vários *loci* para resultados mais precisos e robustos sobre diferenciação populacional.

CONCLUSÃO

O *locus* Pcos14 indicou natureza polimórfica para as populações analisadas de *P. costatus*, tornando-o útil em estudos populacionais. Por outro lado, o presente estudo não revelou diferenciação interpopulacional mediante o *locus* avaliado, tornando necessária a inclusão de outros *loci* microssatélites para gerar informações mais robustas a serem utilizadas em programas de monitoramento e conservação da espécie em questão.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. B. M. (2005). Transposição do São Francisco: as incoerências e os peixes. *Jornal do biólogo- Informativo do Conselho Regional de Biologia*, 4ª região, Belo Horizonte, pp. 6-7.



I SIMPÓSIO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SÃO FRANCISCO
Integrando conhecimentos científicos em defesa do Velho Chico.

- BARBOSA, J.M.; SOARES, E.C. (2009). Perfil da ictiofauna da bacia do São Francisco: Estudo preliminar. *Rev Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 4, pp. 155-172.
- BARROCA, T. M. (2012) Análise da variabilidade genética de *Prochilodus* spp. (Prochilodontidae) das bacias dos rios Paraopeba, Pará e Grande, utilizando marcador de complexas repetições hipervariáveis. 150 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte.
- BORIS B.; XENIA C. O.; MARCEL S. V. (2011) Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using Microsatellite genetic Markers. *MVZ Córdoba*, v.16, pp. 2491-2498.
- CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI, P. M. (2006). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Molecular Ecology Notes*, v. 6 (3), pp. 818-819.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. (2003). Family Prochilodontidae. In FERRARIS JR., C.J. *Check List of the Freshwaters of South and Central America*. Org. REIS, R. E.; KULLANDER, S. O., Edipucrs, Porto Alegre –RS, pp. 65-70.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. (2001) Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, pp. 299-306.
- KOSMINSKY, L.; ZUFFO, A.C. (2009) O Nordeste seco e a transposição do rio São Francisco. *Rev Integração*, ano XV (57), pp. 167-175.
- MOREIRA, A. A., HILSDORF, A. W. S., SILVA, J. V., SOUZA, V. R. (2007) Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília –DF, v. 42, (4), pp. 521-526.
- NAGPURE, N. S. et al. (2013) FishMicrosat: a microsatellite database of commercially important fishes and sellfishes of the Indian subcontinent. *Bio Med Central Genomic*, v. 14, (630), pp. 2-10
- RIMA. Relatório de Impacto Ambiental. (2004). *Projeto de Integração do rio São Francisco com bacias hidrográficas do Nordeste Setentrional*. Ministério da Integração Nacional. Coord. SOUSA, I. S. T. et al.
- PEARSON, H.; STIRLING, D. (2003). DNA Extraction from tissue. In *Methods in Molecular Biology*. Org. BARTLETT, J. M. S; STIRLING, D., Humana Press Inc, ed. 2 (226), pp. 33-34.