

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE *Hoplias malabaricus* NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

FARIAS, Douglas Lemos¹; SANTOS, Jackes Douglas Manke²
Universidade Católica de Pelotas; Universidade Federal de Pelotas

¹ Acadêmico da Ecologia-UCPEL doug.ecologo@hotmail.com

² Mestrando do PPGZ/FAEM-UFPEL – Bolsista CAPES jackesdouglas@hotmail.com

CRUZ, José Antônio Weykamp; PRÁ, Daniel
Universidade Católica de Pelotas – cruzjaw@email.com

1 INTRODUÇÃO

O meio ambiente não ocorre de forma uniforme no território, e a diversidade de situações ambientalmente distintas – a heterogeneidade ambiental – é fator determinante da grande maioria dos fenômenos e processos de importância ecológica. Entre esses fenômenos, destacam-se os relacionados à biodiversidade, tanto aqueles que respondem pela riqueza e abundância da espécies, quanto, inclusive, os que determinam a própria variabilidade genética das populações.

Nos últimos anos, entre as várias técnicas para análise da variabilidade genética, especial suporte tem sido dado pela biotecnologia. Técnicas moleculares além de permitirem a identificação de efeitos da fragmentação sobre o comprimento genético das populações remanescentes, também têm sido úteis em programas de manejo para conservação genética de populações (SCHNEIDER *et al.*, 2003).

Em peixes, RAPD tem sido utilizado com sucesso para completar estudos sistemáticos e filogenéticos (BARMAN *et al.* 2003), na análise da estrutura da população (DERGAM *et al.* 1998; HATANAKA & GALETTI JR., 2003) na gestão da pesca e conservação genética das populações selvagens (HATANAKA & GALETTI JR., 2003).

A pesca artesanal no Estado do Rio Grande do Sul assume uma importância fundamental para as populações humanas em contato com os diversos corpos d'água, onde tal atividade fornece proteína animal para as populações de baixa renda (GARCEZ & BOTERO, 2001).

O presente estudo aborda a variabilidade genética de *Hoplias malabaricus* em duas localidades distintas do sistema lagunar Patos-Mirim, no sul do Rio Grande do Sul. Seu principal objetivo consiste em avaliar a variabilidade genética de amostras populacionais, e testar a hipótese de uma população única neste sistema lagunar, para o que se utiliza de levantamentos de campo seguidos de análise laboratorial baseada em técnicas moleculares.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O levantamento realizado no presente estudo incidiu sobre a região sul do Rio Grande do Sul, mais precisamente na porção sul do complexo hidrográfico Patos-Mirim. A amostragem realizada neste trabalho foi conduzida em dois pontos: um localizado na foz do Rio Jaguarão junto à Lagoa Mirim (ponto "A"), e

outro localizado na Lagoa dos Patos, nas imediações da Lagoa Pequena e foz do Arroio Turuçu (ponto “B”).

Especificamente para este trabalho foram utilizadas duas amostras de *Hoplias malabaricus*, correspondentes aos pontos amostrais “A” e “B” já citados, cada uma totalizando 15 indivíduos. Todos os indivíduos utilizados haviam sido pescados recentemente, e foram transportados, como espécimes íntegros, em caixa térmica (isopor) com gelo, diretamente ao laboratório. Manuseando cada espécime individualmente, procedeu-se a evisceração, após o que reservou-se o fígado, armazenado em álcool 70%, em frascos também individuais. As amostras, devidamente identificadas, foram armazenadas em freezer, à temperatura de -4°C.

Para a extração do DNA, utilizou-se um protocolo adaptado de Salazar *et al.* (1998), para extração salina de amostras de sangue humano coagulado.

PCR e eletroforese: O PCR-RAPD foi feito com 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2 mM MgCl₂, 100 M de cada dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 5 pmol de 10 pares de base de primer OPP-7 5'GTCCATGCCA3' (Bioneer) e 0.5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e 25 ng de DNA genômico num volume final de 25 uL. A amplificação foi feita em um termociclador Eppendorf, modelo Mastercycler, programado para uma etapa de desnaturação inicial de 4 min a 92 ° C, seguido por 46 ciclos de 1 min a 92 ° C, 1 min a 36 ° C e 2 min a 72 ° C. O programa foi concluído com um adicional de 3 min a 72 ° C antes da etapa de resfriamento a 4 °C. Após concluído o PCR, foi preparado o gel com 1,5 g agarose / 100ml TBE 1x / 10 ul de Gel Red. Os marcadores continham individualmente: 1ul de marcador; 1,7 ul tampão; 7,5 ul água, totalizando 10,2 ul de marcador. Cada amostra continha individualmente: 8,5 de amostra do indivíduo; 1,7 ul tampão, totalizando 10,2 ul. A programação da eletroforese foi iniciada com o tempo de 20 minutos, com baixa voltagem 30v e logo após continuamos com o tempo de 1 hora e 50 minutos, à 75 v, 86 ma e 15w.

Quanto à análise de dados, os padrões de RAPD dos indivíduos foram comparados entre os locais de coleta. O índice de similaridade de Jaccard foi aplicado para os fragmentos de banda e para os indivíduos das duas populações,

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi apresentado o padrão de bandas de RAPD para o primer OPP-7 para as duas amostras de *Hoplias malabaricus* estudadas, os tamanhos dos fragmentos foram estimados em 445 pb (1), 305 pb (2), 255 pb (3), 210 pb (4) e 150 pb (5).

Com base nos dados da tabela de presença ou ausência de fragmentos por indivíduos, foi gerado o gráfico de agrupamento dos indivíduos. As duas amostras exibem, com base no índice de similaridade de Jaccard, cinco agrupamentos contendo indivíduos das duas populações em todos os grupos.

Com base na análise de agrupamentos, é possível inferir que os dois locais de coleta “A” e “B”, possuem indivíduos de uma mesma população. O valor do índice de similaridade para os indivíduos dos cinco grupos é de (1,00), significando alta similaridade entre estes.

4 CONCLUSÕES

Conforme os dados de comparação da frequência dos fragmentos entre as populações e análise de similaridade de jaccard, não é possível detectar diferenças entre as amostras com o primer OPP7, que apresentou cinco fragmentos de DNA entre 150 e 445 pb. MARIA (2007) encontrou fragmentos de DNA de 506 à 2036 pb, utilizando 3 primers, detectando de 5 à 11 fragmentos por população, para a mesma espécie em estudo.

Com relação à hipótese de uma população única capaz de se dispersar através dos ambientes interpostos, são argumentos plausíveis a existência de cinco grupos com uma alta similaridade ($j=1,00$). Dentro dos cinco grupos ocorre a presença de indivíduos das duas populações o que possibilitaria interpretar a existência de uma população com características genotípicas semelhantes, ou seja, com uma baixa variabilidade genética entre os indivíduos. HATANAKA & GALETTI JR. (2003) mostraram num estudo com a espécie migratória *Prochilodus marggravii*, baixos valores para os coeficientes de similaridade de Jaccard dentro e entre os locais de amostragem: 0,442 para a região “C”, e 0,636 e 0,604 para as regiões “A” e “B”, respectivamente, demonstrando uma variação genética nos indivíduos da região “C”.

MARIA (2007) mostrou um agrupamento da população da Bacia hidrográfica da Lagoa dos Patos, onde foi verificada a formação de dois grupos, não sendo possível separar os indivíduos por local de coleta. Na Bacia Hidrográfica Lagoa dos Quadros também foi observada a formação de dois grandes grupos, porém não se sobrepondo aos locais de coleta, uma vez que os padrões genéticos se repetiram em diferentes pontos de coleta, indicando distribuição aleatória.

Mesmo não apresentando adaptações morfológicas, *H. malabaricus* pode sobreviver em ambientes pouco oxigenados, o que explica sua grande capacidade de dispersão e adaptações MARIA (2007). Nesse cenário, o canal São Gonçalo, mesmo com os baixos níveis de oxigênio em alguns trechos, devido ao recebimento de efluente cloacal, não seria uma barreira ou filtro para a dispersão de *hoplias malabaricus*.

Devemos considerar que a eclusa, como potencial barreira à dispersão de *H. malabaricus*, iniciou suas operações em 1977, e talvez o tempo de sua existência não seja suficiente para a diferenciação do genótipo de grupos possivelmente isolados. Ainda quanto à eclusa, devemos considerar que seu fechamento é temporário, geralmente restringindo-se à época de salga da lagoa. Deve-se ter cautela na utilização dos resultados deste trabalho, pois seus dados foram obtidos a partir de um único gel com um marcador. até o momento,

Recomenda-se a realização de novos estudos, com a utilização de mais primers, no sentido de qualificar resultados relacionados ao tema abordado.

5 REFERÊNCIAS

- SCHNEIDER M. P. C.. Genética de Populações Naturais. *In*: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Fragmentação de Ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília – DF, 2003. Cap. 4, p. 297- 312.
- SALAZAR L. A.; HIRATA M. H.; CAVALLI S. A.; MACHADO M. O.; HIRATA R. D. C. **Optimized Procedure for DNA Isolation from Fresh and Cryopreserved Clotted Human Blood Useful in Clinical Molecular Testing**. *Clinical Chemistry* 44: 1748-1750, 1998; 1998 American Association for Clinical Chemistry, Inc.
- GARCEZ , Danielle Sequeira & BOTERO J. I. S. **Comunidades de pescadores artesanais no estado do rio grande do sul, brasil**. Programa RS Rural Pesca Artesanal. 2001.
- HATANAKA T. & GALETTI Jr. P. M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, 26, 1, 19-25 (2003).
- MARIA, Luciane. **Diversidade genética de Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) (ostariophysi, characiformes, erythrinidae) no Rio Grande do Sul**. 2007. Tese de Doutorado em Biociências- Zoologia. Faculdade de Biociências, PUC-RS, Porto Alegre-RS, TESE, 2007.
- DERGAM Jorge A., SUZUKI Harumi Irene, SHIBATTA Oscar A., DUBOC Luiz F., JÚLIO JR. Horácio F., GIULIANO-CAETANO Lúcia e BLACK William C. Molecular Biogeography of the Neotropical Fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae:Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná Rivers. **Genetic Molecular Biology**. 21:493-496. 1998.
- BARMAN H. K., BARAT A., YADAV B. M., BANERJEE S., MEHER P. M., REDDY P. V.G. K. and JANA R. K. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. **Aquaculture** 217:115-123. (2003).