

IDENTIFICAÇÃO DE EVENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO EM *Piaractus*, UTILIZANDO O MARCADOR MOLECULAR DLX2

Eloisa de Páris Paz (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Laura Ivana Ramos (Coorientadora), Alessandra Valéria de Oliveira (Orientadora). E-mail: avoliveira@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Genética Molecular e de Microrganismos

Palavras-chave: Heterozigotos; Impacto ecológico; Introgressão genética.

RESUMO

A produção de híbridos de *Piaractus* é uma prática bastante comum na aquicultura, entretanto, geradora de graves problemas ambientais, já que os escapes de híbridos de tanques de criação representam uma grande causa de sua introdução em ambientes naturais. O presente trabalho teve por objetivo identificar a presença de híbridos de *Piaractus* na bacia do alto rio Paraná, utilizando marcadores moleculares. Os marcadores *DLX2* e *RAG2* foram amplificados e sequenciados. A análise com o *DLX2* não foi bem-sucedida devido ao tamanho das sequências obtidas no sequenciamento. Com o marcador *RAG2*, foi feita a análise visual das sequências em busca de sítios polimórficos entre os espécimes analisados e aqueles presentes em bancos de dados. Dois sítios polimórficos foram encontrados, com potencial de serem usados para diferenciar as espécies puras e seus híbridos.

INTRODUÇÃO

Serrasalminidae, pertencente a rios da América do Sul, é uma família popular por sua grande importância econômica na aquicultura brasileira, tendo como exemplares pacus, piranhas e tambaquis. Dentro dessa família, *Piaractus* é frequentemente utilizado para a produção de híbridos, justificada pela tentativa reduzir os impactos da pesca comercial nas produções naturais e atender as demandas do mercado, produzindo animais que satisfaçam melhor os desejos do consumidor (Hashimoto *et al.*, 2011). Entretanto, essas práticas geram um cenário com graves problemas ambientais, já que os escapes de híbridos de tanques de criação representam uma grande causa de sua introdução em ambientes naturais (Agostinho e Ferreira, 1996).

Considerando eventos de hibridização existem duas possibilidades: (1) o nascimento de híbridos estéreis ou inviáveis, que não apresentam risco genético,

mas que trazem graves problemas ecológicos, já que podem ser competidores eficazes e ocasionar a destruição de locais de desova (Fitzpatrick, 2015); e (2) a geração de híbridos férteis, como no caso de *Piaractus*, que além de oferecerem impactos ecológicos, são capazes de ocasionar eventos de introgressão genética nas populações selvagens e, em casos extremos, levar à sua extinção (Fitzpatrick, 2015).

Análises morfológicas são utilizadas para a identificação de animais híbridos, contudo, o seu uso isolado não é confiável. Por outro lado, os métodos moleculares fornecem uma identificação precisa de híbridos, podendo complementar dados de morfologia (Hashimoto *et al.*, 2011). O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de híbridos de *Piaractus* na bacia do alto rio Paraná utilizando os marcadores moleculares *DLX2* e *RAG2*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Onze espécimes foram coletados na planície de inundação do alto rio Paraná e identificados previamente, através de análise PCR-Multiplex com os marcadores nuclear *TROP* e mitocondrial *COI*, como *Piaractus mesopotamicus* (pacu) (Holmberg, 1887), *P. brachypomus* (pirapitinga) (Cuvier, 1818) e híbridos de primeira geração destas espécies (F_1). O acesso ao patrimônio genético dos espécimes foi concedido pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN, registro A1C1E26).

O DNA das amostras de tecido muscular foi extraído utilizando o kit de extração Promega Wizard® Genomics. A amplificação dos marcadores nucleares *DLX2* (primers F760 e R2) e *RAG2* (primers *RAG2* R e *RAG2* F) foi realizada, os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos obtidos foi estimado com base no marcador padrão Ladder 100pb. Os produtos das PCRs foram purificados seguindo protocolo de Rosenthal *et al.* (1993) e o sequenciamento foi realizado em empresa privada.

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando os programas BioEdit 7 e MEGA 7, respectivamente. O algoritmo de alinhamento utilizado foi o *ClustalW*. Sequências de *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*, depositadas por Hashimoto e colaboradores (2011), foram utilizadas para comparação. A análise das sequências foi feita de forma visual a fim de encontrar diferentes alelos entre os espécimes e foi construída uma tabela de comparação dos sítios polimórficos entre as espécies de *P. mesopotamicus*, *P. brachypomus* e seus híbridos F_1 .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise com o marcador *DLX2* não foi bem-sucedida, visto que as sequências obtidas apresentaram 183 pares de base (pb), o que não corresponde

ao tamanho total do gene, inviabilizando a realização das análises propostas. Desse modo, apenas sequências do marcador nuclear *RAG2* foram utilizadas no estudo.

Dois polimorfismos espécie-específicos foram observados quando comparados os espécimes de *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*, analisados por Hashimoto e colaboradores (2011), sendo eles nos sítios 188 e 656 (Tabela 1). Ao observar as sequências de indivíduos puros geradas neste trabalho foi possível encontrar os mesmos polimorfismos observados no estudo de Hashimoto e colaboradores (2011), entretanto, no sítio 188, o indivíduo P10 (*P. brachypomus*) apresentou picos sobrepostos de G e A, assim como todos os híbridos F₁. Já no sítio polimórfico 656, os híbridos apresentaram picos sobrepostos de T e C, bases nitrogenadas encontradas, respectivamente, em *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*.

A presença de alelos espécie-específicos nos indivíduos híbridos torna a região *RAG2* útil para a identificação de eventos de hibridização em ambientes naturais e artificiais. O monitoramento genético sobre pisciculturas e ambientes naturais, é imprescindível para proteger o meio ambiente dos riscos aliados à produção de híbridos, de forma que a busca por alternativas de marcadores moleculares eficazes para a identificação desses indivíduos é extremamente importante e deve ser continuada (Hashimoto, 2012).

Tabela 1 - Amostras, espécies e regiões variáveis do marcador nuclear *RAG2*.

Amostra	Espécie	Sítios	
		188	656
CEPTA001 (HQ420863)	<i>P. mesopotamicus</i>	G	T
CEPTA002 (HQ420864)	<i>P. mesopotamicus</i>	G	T
CEPTA003 (HQ420865)	<i>P. mesopotamicus</i>	G	T
CEPTA004 (HQ420866)	<i>P. mesopotamicus</i>	G	T
CEPTA005 (HQ420867)	<i>P. mesopotamicus</i>	G	T
CEPTA007 (HQ420868)	<i>P. brachypomus</i>	A	C
CEPTA008 (HQ420869)	<i>P. brachypomus</i>	A	C
CEPTA009 (HQ420870)	<i>P. brachypomus</i>	A	C
CEPTA012 (HQ420871)	<i>P. brachypomus</i>	A	C
CEPTA014 (HQ420872)	<i>P. brachypomus</i>	A	C
P6	<i>P. mesopotamicus</i>	G	T
P43	<i>P. mesopotamicus</i>	G	T
P47	<i>P. mesopotamicus</i>	G	T
P8	<i>P. brachypomus</i>	A	C
P38	<i>P. brachypomus</i>	A	C
P39	<i>P. brachypomus</i>	R	C
P10	F1	R	Y
P12	F1	R	Y
P24	F1	R	Y
P26	F1	R	Y
P46	F1	R	Y

*R=sobreposição de bases G e A. *Y=sobreposição das bases T e C.

CONCLUSÕES

O marcador molecular RAG2 foi útil para a avaliação de eventos de hibridização em *Piaractus*, uma vez que foram encontrados sítios polimórficos espécie-específicos e a presença dos diferentes alelos nos indivíduos híbridos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá - UEM pela bolsa concedida e ao laboratório de Genética Molecular do Nupélia pela contribuição na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A.; FERREIRA, J., J., H. Peixes de outras águas: Ameaça ecológica. **Ciência Hoje**, v. 21, n.124, p. 36-44, 1996. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/5251>. Acesso em 20 agosto 2024.

FITZPATRICK, B. M. et al. Hybridization and the species problem in conservation. **Current Zoology**, v. 61, n. 1, p. 206-216, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279321221_Hybridization_and_the_species_problem_in_conservation. Acesso em 20 agosto 2024.

HASHIMOTO, D. T. et al. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. **Aquaculture**, v. 321, p. 49-53, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848611006429>. Acesso em 20 agosto 2024.

HASHIMOTO, D. T. et al. Detection of post-F1 fish hybrids in brood stock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 1, p. 1-9, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2012.03092.x>. Acesso em 20 agosto 2024.