

## GENÔMICA COMO FERRAMENTA PARA GESTÃO PESQUEIRA

DAIANE MACHADO SOUZA<sup>1</sup>; SUZANE FONSECA FREITAS<sup>2</sup>; PAULO LEONARDO SILVA OLIVEIRA<sup>3</sup>; RODRIGO RIBEIRO BEZERRA DE OLIVEIRA<sup>4</sup>; FERNANDA BRUNNER HAMMES<sup>5</sup>; SÉRGIO RENATO NOGUEZ PIEDRAS<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – dsdaianesouza@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – suzane.ff@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – leonardooliveira\_92@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – rodrigorbo19@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – nanda5517@hotmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – oceanopiedras@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Diversas populações ao redor do mundo dependem da pesca em diferentes níveis, seja como fonte de emprego na indústria pesqueira ou mesmo praticando-a como forma de subsistência. O extrativismo pode ser considerado uma lente pela qual se pode observar a estreita relação entre o homem e os recursos hídricos (HILSDORF et al. 2006).

Apesar da diversidade de peixes e da sua grande importância econômica para o homem, ainda pouco se conhece sobre suas características biológicas, ecológicas e genéticas. A falta de conhecimento das espécies e consequentemente a falta de manejo destas, além das altas taxas de pesca são os principais responsáveis da perda de diversidade e reduções drásticas nas populações (NASCIMENTO et al. 2001; ALBUQUERQUE et al. 2002; PETRERE et al. 2004). Por isso torna-se necessário conhecer a fundo nossa biodiversidade, especialmente quando se trata de espécies nativas, e espécies que possuem um grande potencial econômico.

A percepção de que a sobre-pesca, de alguma forma vem afetando a disponibilidade dos estoques de peixes, tem sido um consenso entre os cientistas pesqueiros. Na lagoa Mirim-RS como também na Lagoa Mangueira-RS, os pescadores artesanais reclamam que o tamanho médio dos peixes estão diminuindo ao longo do tempo (PIEDRAS et al. 2012) Esta realidade, verificada nas estatísticas pesqueiras, parece estar relacionada à seletividade das redes de captura que retiram os animais maiores.

CONOVER; MUNCH (2002) constataram que a retirada constante de animais maiores ao longo do tempo afeta a composição genética do estoque, eliminando os genes relacionados ao crescimento rápido e diminuindo o tamanho médio dos indivíduos remanescentes, esta observação sugere que este fenômeno pode estar ocorrendo com alguns estoques de peixes de interesse comercial. Esses estudos são de grande importância no que diz respeito a elaboração de projetos visando a conservação de recursos naturais, em especial ao papel desempenhado pelas variações ao nível do genoma em resposta às mudanças ambientais e de sobre-pesca.

Acredita-se que com o conhecimento da genética populacional das espécies de importância econômica para os pescadores artesanais locais, se possa definir uma legislação de pesca eficiente. Em diversas partes do mundo se tenta fazer a avaliação dos estoques pesqueiros, objetivando orientar a legislação de pesca.

Essa área de estudo tem como objetivo determinar: qual, quanto, onde e quando utilizar de maneira sustentável os recursos naturais existentes (ANNIBAL, 1983).

## 2. METODOLOGIA

O material biológico coletado para análise genética consiste em uma amostra de músculo e nadadeira caudal (aproximadamente 200–300mg), armazenados em etanol 95% e preservados a -20°C. O DNA genômico total é extraído usando separação orgânica pelo protocolo de Cloreto de Sódio (BARRERO et al. 2008), que consiste:

- Maceração do tecido muscular, objetivando a ruptura da parede e membranas celulares, promovendo assim a liberação da molécula de DNA;
- Adição de 600 µL de solução tampão TNE1 (5 ml de tris HCl 1 Molar, pH 8.0, 10 ml de EDTA, 1ml de NaCl, 84 ml de água Milli-Q), tendo por finalidade promover a lise das células, porém preservando sua estrutura, acidez e osmolaridade;
- Adição de 330 µL de TNE2 (5ml tris HCl 1 Molar pH 8,0; 10 ml EDTA, 1ml NaCl; 10 ml SDS 20%), como solução detergente para solubilização das membranas e auxiliando na inativação de enzimas;
- 4 µL de proteinase K para a desnaturação proteica e incubação imediata à 50°C por 12 horas;
- Após a incubação, para precipitação de proteínas e restos celulares serão adicionados 340 µL de NaCl 5M;
- O material será centrifugado a 12000 rpm e transferido o sobrenadante para novos microtubos, onde serão acrescidos 900µL de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA;
- Posteriormente, será realizada a lavagem do material com 200 µL de etanol 70%.
- Por fim, o DNA será ressuspendido com 100 µL de tampão TE buffer (10 mM de Tris ph 8.0 e 1 mM de EDTA).

Para checagem da integridade do DNA obtido, as amostras são submetidas a eletroforese horizontal com gel de agarose 1% e tampão TBE1X durante 20 minutos a 80 volts. Para tal, será usada uma alíquota de 7 µL de DNA sendo o mesmo corado com 3 µL de Blue Green Loading Dye<sup>TM</sup> (LGC Biotecnologia, São Paulo-BR) e 5 µL de DNA Ladder 100pb (Ludwig Biotec) posteriormente visualizados em transiluminador.

Os marcadores microssatélites são amplificados através da técnica de reação de PCR, cujo o volume final será 25µL, contendo 1µL de DNA genômico, 0,5µL de cada primer (10pmol), 2,5µL de 1X buffer de PCR(10mM Tris HCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> e 50mM KCl), 1,5µL MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5µL de dNTP(100µM), 0,2µL de Taq DNA polimerase<sup>®</sup> (Fermentas Life Sciences) e 18,3µL de água livre de nuclease. O controle negativo (reação sem a presença de DNA) é utilizado em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação.

As reações são realizadas em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient<sup>®</sup> (Eppendorf), cuja amplificação consiste em: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento conforme a temperatura específica de cada primer por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, terminando com uma extensão final de 8 minutos a 72°C. A posterior checagem da amplificação do produto de PCR é realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,6% tingido com corante GelGreen<sup>TM</sup>. Após a eletroforese, os produtos são analisados em transiluminador sob luz UV e registrados digitalmente. Os alelos dos loci são

discriminados através de observação direta no gel, baseando-se na presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo locus).

A diversidade genética dentro das populações estudadas é caracterizada pelas frequências alélicas, heterozigosidade observada, diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, número de alelos por locus, porcentagem de loci polimórficos e índice de fixação de Wright, estimativas obtidas pelo uso do programa Genepop 4.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para implantação de políticas de cota de pesca, é fundamental a identificação de “estoques” e/ou populações de acordo com o conceito genético de estoque, ou seja, como uma unidade reprodutivamente isolada que é geneticamente diferente de outros estoques (OVEDEN, 1990). Programas de manejo e conservação em espécies sujeitas à fragmentação por impacto do homem só serão realmente eficazes considerando os fatores genéticos (FRANKHAM et al. 2002). A estrutura genética de uma população é a informação mais importante para uma espécie que necessita de manejo (HILLIS, 1996), pois a determinação da variabilidade genética é importante tanto para populações naturais quanto para manejo e comercialização de peixes cultivados. A variabilidade ou diversidade genética é a variedade de alelos e genótipos presente no grupo sob estudo, e constitui a força que dá às populações capacidade de suportar pressões ambientais, diminuindo o risco de extinção. Quanto maior o repertório de alelos diferentes em uma população maior será as chances dos indivíduos dessa população sobreviverem a variações ambientais.

As quantidades relativas de variações dentro e entre populações mudam de espécie para espécie, dependendo da história evolutiva e do ambiente (GRIFFITHS et al. 2001). Para que haja evolução adaptativa, a variação genética torna-se uma condição fundamental entre as populações e entre espécies.

Estimativas confiáveis da diferenciação populacional são primordiais na biologia da conservação na qual se considera a necessidade continuada de entender se as populações são geneticamente isoladas ou se constituem uma única população. As contínuas intervenções do homem sobre os ambientes aquáticos continentais tornam cada vez mais urgentes a necessidade de se investigar a situação presente da distribuição genética das populações de peixes, dentro e entre lagoas, bem como as possíveis relações entre destruição ambiental e perda de variabilidade genética e subdivisão de estoques.

### 4. CONCLUSÕES

Os resultados que serão gerados a partir destes estudos, certamente contribuirão para uma melhor elucidação a respeito da estruturação genético-populacional de espécies, e assim gerar subsídios para o desenvolvimento de projetos de conservação e manejo, além de auxiliar na administração e legislação de pesca, pois levam a geração de critérios de manejo das unidades de estoques que visam a conservação em longo prazo dos recursos pesqueiros naturais.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, S.P.; CAMPOS, F.L.R.; CATELLA, A.C. **Sistema de Controle da Pesca de Mato Grosso do Sul SCPECA/MS – 9**. Boletim 31 de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Pantanal, Corumbá, 2002.

ANNIBAL, S.R.P. **Avaliação bio-ecológica e pesca das “pescadas” (*Plagioscion squamosissimus* HECKEL, 1840 e *Plagioscion monteí* SOARES, 1978) no “Sistema Lago do Rei” – Ilha do Careiro – AM – Brasil.** Master thesis, PPG-BTRN, INPA: Manaus, AM, Brasil, 1983.

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES T.S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v.35, n. 1, p.65-74, 2008.

CONOVER, D.O.; MUNCH, S.B. Sustaining fisheries yields over evolutionary time scales. **Science**, v.297, p. 94-96, 2002.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.R.; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press. Cambridge, England, 2002.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. **Genética Moderna**. Editora Guanabara Koogan S.A, 2001.

HILLIS, D.M.; MORTIZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Inc. E.U.A, 1996.

HILSDORF, A.W.S.; RESENDE, E.K.; MARQUES, D.K.S. **Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006.

NASCIMENTO, F.L.; CATELLA, A.C.; MORAES, A.S. **Distribuição Espacial do Tucunaré, *Cichla* sp. (Pisces, Cichlidae), peixe amazônico introduzido no Pantanal, Brasil**. Boletim 24 de Pesquisa e Desenvolvimento. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2001.

OVEDEN, J.R. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v.41, p.835-853, 1990.

PETREIRE JR., M.; BARTHEM, R.B.; CÓRDOBA, E.A.; GÓMEZ, B.C. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). In: HART, P. J. B.; PICHER, T. J. (eds.). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.14, p.403-414, 2004.

PIEDRAS, S.R.N.; SANTOS, J.D.; FERNANDES, J.M.; TAVARES, R.A.; SOUZA, D.M.; POUEY, J.L.O.F. Characterization of fishing activity in Lagoa Mirim, Rio Grande do Sul – Brasil. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.18, n.2-4, p.107-116, abr-jun, 2012.