

BIOLOGIA MOLECULAR NA CONSERVAÇÃO DE PEIXES

FERRAMENTAS MOLECULARES E CONSERVAÇÃO GENÉTICA

Os ecossistemas aquáticos estão entre aqueles cuja diversidade de vida se expressa de maneira extraordinariamente intensa. Estima-se que cerca de 23.000 espécies de peixes existam; destas, 8.000 vivendo em águas continentais e 15.000 em ambientes marinhos. Esta diversidade tem sido, de alguma forma, utilizada pela humanidade ao longo de sua existência.

A pesca e a aquicultura são atividades há muito desenvolvidas pelo homem. Nas últimas décadas estes setores têm contribuído significativamente para o aumento da oferta de alimentos em escala mundial. Estimativas da FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) mostram que em 1996 cerca de 30 milhões de pescadores e piscicultores produziram 116 milhões de toneladas de peixes.

Em simpósio sobre a conservação dos recursos genéticos de peixes realizado em 1981 (FAO/UNEP), os países participantes concluíram que esforços conjuntos devem ser realizados para identificar e conhecer a diversidade genética dentro e entre espécies de peixes. Estas medidas, entre outras, são importantes para manutenção a longo prazo dos estoques exploráveis e da variabilidade necessária para o melhoramento genético de espécies em cativeiro.

As condições climáticas e hídricas do Brasil possibilitaram a evolução de uma expressiva quantidade de espécies de peixes que estão espalhadas nas diversas bacias hidrográficas e ao longo de nossa costa marítima. Muitas dessas es-

pécies contribuem de forma significativa para produção de alimentos e manutenção da indústria pesqueira.

Mantendo a diversidade genética

Os ecossistemas aquáticos estão entre aqueles que mais têm sofrido agressões no processo de desenvolvimento econômico das sociedades modernas. Diversas têm sido as intervenções humanas que de uma forma ou de outra têm causado modificações profundas na di-

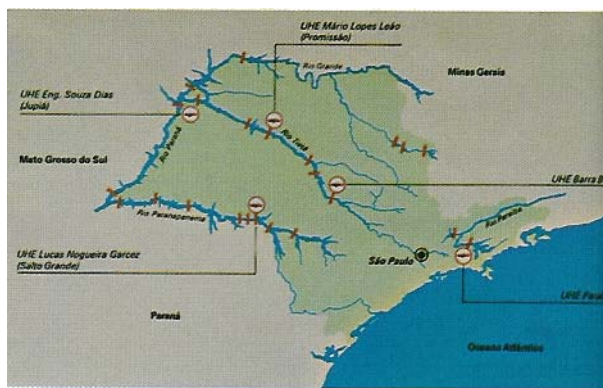


Figura 1: Localização das estações de hidrobiologia e piscicultura da CESP no Estado de São Paulo. Foto: CESP

nâmica dos ambientes aquáticos. Pesca predatória, introdução de espécies exóticas, destruição de matas ciliares, poluição, assoreamento de rios e implantação de hidrelétricas são algumas que podem ser citadas, e que vêm colocando em risco a rica diversidade de peixes em todo o planeta.

De todas as intervenções humanas, pela magnitude com que tem sido estabelecida, a construção de barragens, para geração de energia elétrica, tem se transformado em um dos processos de maior impacto sobre o ambiente aquáti-

Alexandre Hilsdorf, MSc.
Professor colaborador adjunto
Universidade de Taubaté
Departamento de Ciências Agrárias e Laboratório de
Biologia Molecular do Instituto do Coração.
expbilsdorf@incor4.incor.usp.br

José Eduardo Krieger
Professor associado da Faculdade de Medicina da USP
Departamento de Clínica Médica
Chefe do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto
do Coração.

Fotos cedidas pelos autores.

co. O fechamento das barragens e formação dos reservatórios leva a uma modificação profunda em todo o ecossistema. Os peixes sofrem, então, uma alteração em seu ciclo de vida que muitas vezes leva os mesmos ao desaparecimento. No Brasil, a portaria 0001, de 04/01/77, da SUDEPE - Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (incorporada pelo IBAMA), que regulamentou o artigo 36 do Decreto-lei 221, de 28/02/67, conhecido com "Lei da Pesca", exige que qualquer entidade que sob qualquer condição esteja envolvida na construção de barragens, e que implique uma alteração de cursos d'água, deverá adotar medidas de proteção dos recursos biológicos aquáticos. O desafio maior das empresas geradoras de energia é, portanto, conciliar as crescentes necessidades por energia e a conservação dos ecossistemas.

A CESP - Companhia Energética de São Paulo - é a empresa responsável por 95% da energia elétrica gerada no Estado de São Paulo e 20% de toda produção brasileira. Toda esta energia é proveniente da construção de 20 reservatórios, que ao todo inundam uma área de 7.500km². Várias medidas podem ser tomadas para mitigar os impactos sobre a vida aquática, causados pela construção de barragens. Construção de escadas, elevadores e a instalação de centrais de reprodução de peixes para posterior repovoamento. Os trabalhos desenvolvidos pelas estações de reprodução das companhias hidrelétricas, como a CESP, vêm cumprindo um papel importante, que, somado à recuperação dos estoques de peixes na natureza, possibilita um melhor conhecimento biológico das espécies presentes na região, permitindo um manejo mais racional dos estoques e a sustentação de uma exploração pesqueira não-predatória.

Uma das questões mais importantes em um programa de repovoamento de peixes diz respeito à capacidade de sobrevivência a longo prazo dos indivíduos reintroduzidos. Um programa de repovoamento tem que ter como base a preservação da variabilidade genética no ambiente natural, aumentando, assim, o sucesso reprodutivo e adaptativo da espécie dentro de um ambiente com contínuas alterações. A opção pelo repovoamento deve, portanto, levar em consideração a variação genética existente dentro e en-



tre populações distribuídas na bacia de influência do reservatório. Esta etapa é fundamental para o estabelecimento e a manutenção dos estoques fundadores na estação de reprodução, que deverão representar a distribuição da variabilidade genética da espécie na região (Toledo-Filho, et al., 1991).

Marcadores moleculares no estudo genético populacional de peixes

Desde a década de 60 marcadores morfológicos e protéicos têm sido usados no estudo da variabilidade populacional em peixes (Park & Moran, 1994). Com o desenvolvimento das técnicas da biologia molecular, diversos marcadores vêm sendo localizados em regiões do genoma nuclear e mitocondrial. Desta forma, os marcadores



Figura 3: Alevinos de pirapitinga-do-sul para repovoamento.
Foto: CESP

Figura 2: Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Paraibuna.
Foto: Autor

moleculares têm-se transformado em ferramentas importantes no estudo e avaliação genética de populações de peixes selvagens e em cativeiro, podendo ser usados para:

- * Identificação de espécies e híbridos;
- * Estabelecimento da filogenia da espécie e da população;
- * Determinação da estrutura populacional de uma espécie;
- * Identificação de linhagens;
- * Contribuição individual de uma população em um estoque que está sendo explorado;
- * Variação genética em populações selvagens e cultivadas;

- * Determinação do impacto genético da introdução de peixes cultivados em populações naturais;
- * Determinação de estratégias de cruzamento para fins de criação e repovoamento;
- * Localização de marcadores ligados a genes envolvidos com caracteres de interesse econômico.

Diversas técnicas são hoje utilizadas na identificação de marcadores de DNA, entre elas podemos citar: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) e VNTRs (Variable Number Tandem Repeat Loci).

DNA mitocondrial em populações da pirapitinga-do-sul

QUADRO COMPARATIVO DOS PRINCIPAIS MARCADORES MOLECULARES NA ANÁLISE DE POPULAÇÕES

Variável	RFLP	RAPD	VRNT	AFLP
Modo de observação do polimorfismo molecular	Fragmento de restrição de DNA detectado por hibridação com sondas	Segmentos de DNA amplificados arbitrariamente	Amplificação específica de região contendo sequência repetitiva	Segmento amplificado via PCR após digestão de DNA com enzima
Expressão genética	Co-dominante	Dominante	Co-dominante	Dominante
Número de alelos/loco	Multialélico	Dois alelos	Altamente multialélico	Dois alelos
Disponibilidade de marcadores de genoma	Praticamente ilimitada	Praticamente ilimitada	Praticamente ilimitada	Praticamente ilimitada
Identificação de genótipo	Alta	Muito alta	Muito alta	Muito alta
Mapeamento genético	Alta	Alta	Muito alta	Alta
Análise filogenética	Muito alta	Média	Alta	Média

(Fonte: Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A bacia do Paraíba do Sul, compreendida no eixo Rio-São Paulo, é uma destas regiões profundamente afetadas por uma série de impactos ambientais. Na década de cinquenta, a bacia do Paraíba comportava uma das mais importantes áreas de pesca continental do Estado de São Paulo. O declínio desta atividade na região acompanhou o processo de deterioração dos rios e tributários do Paraíba, com o quase desaparecimento de diversas espécies economicamente importantes.

Na Estação de Hidrobiologia e Piscicultura da CESP em Paraibuna, várias espécies da bacia do Paraíba do Sul têm sido mantidas em cativeiro. Entre algumas, podemos citar: piabanha (*Brycon insignis*), surubim-do-vale (), curimbatá

(*Prochilodus lineatus*), piava-bicuda (*Leporinus conirostris*), piau-palhaço (*Leporinus copelandii*) e a pirapitinga-do-sul (*Brycon cf. reinhardt*).

Os estudos sobre a diversidade genético-populacional de espécies da bacia do Paraíba teve início em 1996. A pirapitinga-do-sul foi a espécie eleita para se iniciar os trabalhos. Esta espécie pertence ao gênero *Brycon*, o qual possui diversas espécies de valor econômico e pode ser encontrado em quase todas as bacias hidrográficas brasileiras. A pirapitinga-do-sul é um peixe endêmico da bacia do Paraíba, estando presente em rios de águas mais frias, nas regiões serranas do Vale.



Figura 4: Exemplar adulto de pirapitinga-do-sul.

Foto: Autor

mento de técnicas de biopsia de tecido muscular, para extração de DNA, sem o sacrifício dos animais.

A compreensão das diferenças genéticas entre as diversas populações nativas, bem como a composição das mesmas em cativeiro, é uma etapa fundamental para a manutenção de estoques e possibilita um manejo genético a longo prazo de espécies de peixes em programas de repovoamento. Desta forma, a utilização das novas técnicas de genética molecular pode contribuir de forma significativa para a preservação e o desenvolvimento sustentado dos recursos genéticos aquáticos.

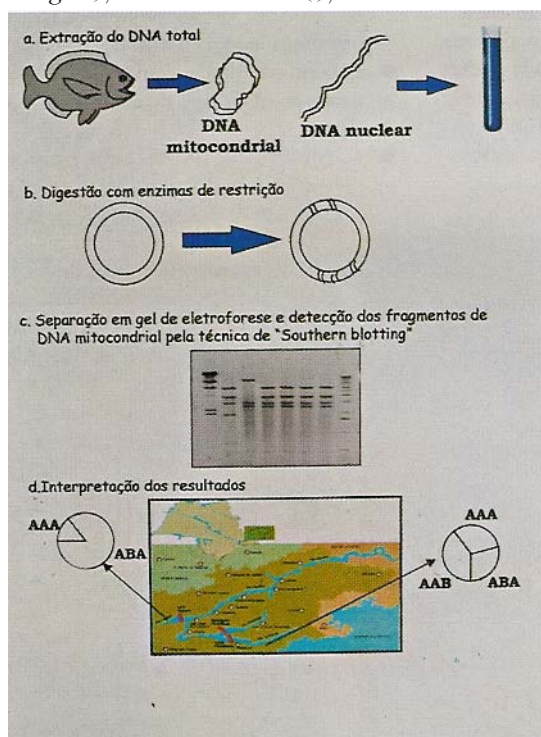


Figura 5: Metodologia para análise genético-populacional de peixes por RFLP baseado no polimorfismo do DNA mitocondrial.

Foto: Autor

Os estudos genético-populacionais da pirapitinga-do-sul na bacia do Paraíba têm sido baseados no polimorfismo apresentado pelo DNA mitocondrial. Esta molécula reúne algumas características, tais como: alta taxa mutacional, pequeno tamanho (16.000pb), sensível aos processos de deriva genética e herança materna (Avice et al., 1987), que permitem uma avaliação inicial da estrutura genético-populacional da espécie na natureza.

O trabalho tem tido a importante contribuição da equipe de técnicos da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Paraibuna na localização, captura e manutenção das populações selvagens da pirapitinga-do-sul. As pesquisas, em andamento, já possibilitaram a clonagem e a produção de sondas a partir do DNA mitocondrial da espécie em estudo, que possivelmente poderão ser utilizadas com outras espécies importantes do gênero *Brycon*, tais como: matrinhã, piracanjuba, piraputanga e piabanha; assim como o desenvolvi-

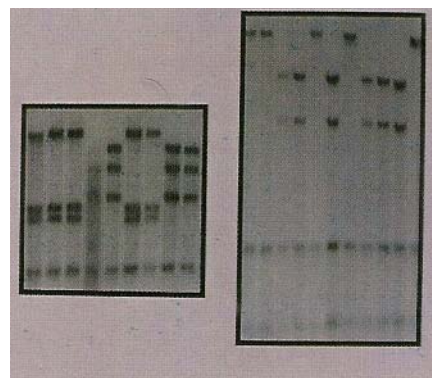


Figura 6: Polimorfismo de duas enzimas de restrição do DNA mitocondrial da pirapitinga-do-sul usadas como marcadores.

Foto: Autor