

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESTOQUES DE JUNDIÁ
DA AMAZÔNIA (*Leiarius marmoratus*)**

Autor: Laís Santana Celestino Mantovani

Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ

Estado do Paraná

fevereiro - 2018

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESTOQUES DE JUNDIÁ
DA AMAZÔNIA (*Leiarius marmoratus*)**

Autor: Laís Santana Celestino Mantovani

Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção de título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ

Estado do Paraná

fevereiro – 2018

À pequena Livia, razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por terem me incentivado e investido em minha formação, sempre dispondo do amor e dedicação que possuíam. Amo vocês.

Ao meu irmão, Renan Santana Celestino, a qual amo imensamente e desejo muito sucesso: obrigada por todo o apoio e reconhecimento ao decorrer de toda a minha história.

Ao meu esposo Luís Eduardo Mantovani, por ser minha fortaleza nas horas difíceis e minhas asas nos momentos de felicidade. Sem você, não conseguiria. Obrigada pela parceria, pelo amor, pelo altruísmo. Eu te amo.

As minhas amigas Letícia Biassoti, Melissa Leandro e Raquel Zaramella, por dividirem comigo momentos especiais e marcantes, agradeço a força e amizade.

A todos os colegas do Peixegen, sem a qual nenhum trabalho poderia ser feito. Em especial, agradeço à Vanessa Lewandowski, Jaísa Casetta e Eric Campos, amigos muito queridos que conquistei na pós graduação e que levarei pra vida, obrigada pela força, vocês tem uma grande parte desta conquista.

Ao Pedro Luiz de Castro, pela introdução às técnicas de laboratório, amizade e auxílio durante os desafios.

Ao colega Felipe Pinheiro de Souza, integrante do PeixeGen e mestrando da UEL, por todo apoio e auxílio durante todo esse período. Obrigada Felipe, você foi parte fundamental para o acontecimento deste trabalho.

As amigas da qual não posso esquecer: Bruna Bronharo e Tainara Euzebio. Obrigada pelas visitas que aliviaram as semanas difíceis, pelas conversas e confidências. Por todo o apoio. Vocês moram no meu coração.

Meu agradecimento a CAPES, por ter cedido a bolsa a qual manteve os estudos.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, pela oportunidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pela orientação, compreensão, por ser exemplo e também pela amizade no decorrer dessa jornada. Muito obrigada.

Ao Grupo Bom Futuro, por apoiar este projeto.

A todos os professores envolvidos na construção do meu conhecimento.

BIOGRAFIA

LAÍS SANTANA CELESTINO MANTOVANI, filha de Rubens Celestino e Marta Cristina Santana Celestino, nasceu na cidade de São Paulo, capital estado de São Paulo em 2 de fevereiro de 1991.

Em 2015, graduou-se em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, campus de Maringá.

No ano de 2016, ingressou no Programa de Pós Graduação em Zootecnia, em nível Mestrado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos envolvendo aquicultura e biologia molecular.

INDÍCE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
I - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Taxonomia e características do Jundiá da Amazônia (<i>Leirarius marmoratus</i>)	3
1.2 Variabilidade genética e marcadores moleculares	4
1.3 Marcadores microssatélites	5
1.4 Transferibilidade de primers microssatélites.....	6
1.5 Referências	7
II - DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESTOQUES DE JUNDIÁ DA AMAZÔNIA (<i>Leirarius marmoratus</i>)	9
Resumo	9
Abstract	10
Introdução	11
Materiais e Métodos	11
Resultados	14
Discussão	19
Conclusão	20

Informação de geolocalização	20
Agradecimentos	21
Referências	21

RESUMO

A piscicultura brasileira em ascensão revela a necessidade de inserir espécies nativas no cultivo intensivo, demandando pacotes tecnológicos eficientes. Parte desse processo se dá com o melhoramento genético das espécies, etapa essa que necessita de estudos de variabilidade genética para se efetivar. Um dos peixes nativos candidatos a iniciar um futuro programa de melhoramento é o Jundiá da Amazônia (*Leiarius marmoratus*). Com rápido crescimento e rusticidade, além de boas características organolépticas em sua carne, se torna um peixe notável para cultivo. Para o sucesso reprodutivo e qualidade de produção, é necessário o monitoramento da variabilidade genética dos estoques comerciais, a fim de evitar perdas ocasionadas por acasalamentos endogâmicos ou aparentados. Este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética em três estoques de Jundiá da Amazônia da região de Campo Verde –MT. Foram avaliados 143 animais provindos das pisciculturas de Filadélfia (FI), Nova Mutum (NM) e Júina (JU). Utilizando protocolo de extração de DNA com NaCl e técnica de PCR aliado a marcadores moleculares microssatélites, obteve-se pequena diferença entre os estoques, onde o maior valor foi encontrado entre os estoques FI x JU ($F_{st}=0,049$). A análise de distância genética de Nei também se revelou baixa entre os três estoques, com o maior índice entre os estoques FI x NM (0,014). As análises fatorial de correspondência (AFC) e bayesiana indicaram que os indivíduos dos três estoques são muito semelhantes geneticamente, concordando com os níveis altos de F_{is} e baixos níveis de H_o . Os resultados indicaram que os estoques em questão possuem baixa variabilidade e

necessitam da introdução de novo material genético no plantel reprodutivo, a fim de enriquecer o pool genético e evitar possíveis perdas produtivas por alta endogamia.

Palavras chave: DNA, marcadores moleculares, variabilidade genética, piscicultura, siluriformes.

ABSTRACT

The Brazilian fishery on the rise reveals the need to insert native species in intensive cultivation, demanding efficient technological packages. Parties that make the genetic improvement of the species, a stage that is necessary for studies of genetic variability to be effective. One of the objectives may be a future improvement program for the Amazonian Jundiá (*Leiarius marmoratus*). With rapid growth and rusticity, in addition to good organoleptic characteristics in its meat, it becomes a remarkable fish for cultivation. For reproductive success and quality of production, it is necessary to monitor the genetic variability of commercial stocks in order to capture losses from inbred or related mating. This work had as objective the genetic variability of three stages of Jundiá of the Amazon of the region of Campo Verde - MT. A total of 143 animals from Philadelphia (FI), Nova Mutum (NM) and Júina (JU) were evaluated. Using the DNA extraction protocol with NaCl and the PCR technique allied to micro-satellite flies, a difference between the stocks was obtained, where the highest value is found between the stocks FI x JU ($F_{st}=0.049$). The genetic distance analysis of Nei is also present among the three stocks, with the highest index among the stocks FI x NM (0.014). Factorial matching (AFC) and Bayesian rates indicated that the first three stocks are much more genetically, agreeing with the high F_{is} values and the low H_o levels. The results are comparable with the inventories in question, with low variability and with the addition of new genetic data in the establishment, with the objective of increasing the production capacity of genotypes for high inbreeding.

Key words: DNA, molecular markers, genetic variability, pisciculture, siluriformes.

INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado tem crescido a uma taxa média anual de 3,2% nas últimas décadas. Com o aumento populacional de 1,6% no mesmo período, o consumo per capita aparente de pescado progrediu de 9,9 kg/ano na década de 1960 para 19,2 kg/ano em 2012. Esses números foram ocasionados por diversos fatores, como o aumento da renda média da população, surgimento de cooperativas envolvidas na aquicultura, conseqüentemente o surgimento de canais de distribuição mais efetivos, a concentração populacional em grandes centros e, especialmente pela ascensão da aquicultura e piscicultura no cenário mundial (FAO, 2014). De acordo com as Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2016), o Brasil alcançará um aumento de 104% em sua produção na pesca e aquicultura no ano de 2025. Segundo dados mundiais da pesca e aquicultura (SOFIA) da FAO (2016), o Brasil produzindo 562,5 mil toneladas ocupa o 14º lugar na aquicultura, que é hoje o maior segmento de produção de origem animal em crescimento, chegando perto de 101 milhões de toneladas em 2014, e um faturamento aproximado a 166 bilhões de dólares.

Apesar da produtividade de espécies nativas não ter superado espécies exóticas já consolidadas no mercado nacional, os peixes da ordem *Siluriformes*, também conhecidos como bagres vem ganhando espaço no mercado sul americano. Possuem alto valor comercial pelas características de sua carne de coloração clara, sabor suave e presença de poucos espinhos (Inoue et al., 2009). Além de apresentarem elevada aceitação, esse pescado tem uma textura de carne favorável para a indústria de beneficiamento, para ser mecanicamente processada, beneficiada em postas, filé ou mesmo o pescado inteiro.

Dados do Brasil (2013) apontam que a produção de bagres provenientes de piscicultura atingiu o patamar de 15,8 toneladas em 2011. Esse dado envolve espécies em destaque como o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma reticulaum*) e jundiá (*Rhamdia quelen*). Dentre os bagres nativos com potencial produtivo, está o Jundiá da Amazônia (*Leiarius marmoratus*), que se mostra altamente prolífero, rústico e, principalmente possui rápido desenvolvimento, revelando-se um excelente candidato ao cultivo intensivo, além de ser utilizado como reprodutor em acasalamentos híbridos com *P. reticulatum*, dando origem aos animais popularmente conhecidos como pintado amazônico ou simplesmente surubim, comercializados de forma maciça por restaurantes, frigoríficos e pesque-pague (Benites, 2008).

O crescimento econômico em torno da aquicultura nos leva a buscar alternativas para que a produção se mantenha, e também que possibilite a sua expansão. Aumentar opções de cultivo diversificando as espécies seria oportuno para incentivar a piscicultura em todo o país, de modo que cada região acabaria por acolher as espécies que mais se adaptarem as suas condições. No entanto, há uma depreciação dos estoques naturais das espécies nativas por diversos aspectos, dentre eles a poluição das águas, implantação de hidrelétricas, escapes de híbridos e outros fatores, como a pesca predatória (Batista et. al, 2012; Vaini et. al, 2016). Para este elemento em específico, a inclusão de espécies nativas, como por exemplo, o Jundiá da Amazônia, ao leque de peixes cultivados no Brasil, reduziria os índices de pesca extrativista, além de se mostrar como uma alternativa viável tanto comercialmente quanto ambientalmente, promovendo a produção continuada destes animais.

Para que se estabeleça a produção de qualquer espécie em cativeiro, é necessário definir diretrizes responsáveis por atingir o desempenho desejado destes animais. Além de dispor de nutrição adequada e manejo assertivo, deve-se ter preocupação com as questões acerca da variabilidade genética nos estoques. Por meio das avaliações de variabilidade genética, podemos identificar gargalos e possivelmente evitar o aumento de endogamia e o estreitamento da variabilidade nos estoques, diminuindo as chances de uma perda genética por excesso de homozigotos e genes deletérios (Resende et. al, 2010). Godinho (2007) evidenciou que, pelo fato dos peixes possuírem alta taxa de fecundidade, produzindo milhares de alevinos com poucos reprodutores, os esquemas de reprodução utilizados pelos piscicultores acrescentam de 3 a 5% de endogamia por geração. Portanto, quando se pensa em um futuro programa de melhoramento

envolvendo esses animais, é real a necessidade de se atentar a variabilidade dentro de estoques mantidos em cativeiro, buscando reduzir ao máximo a endogamia.

Taxonomia e características do Jundiá da Amazônia (Leiarus marmoratus)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Gênero: *Leiarus*

Espécie: *Leiarus marmoratus* (Gill, 1870)



Figura 1. *Leiarus marmoratus* (Fonte: FishBase)

O *Leiarus marmoratus*, conhecido popularmente como Jundiá da Amazônia, pode atingir 50 cm de comprimento e pesar de 4 a 7 kg na idade adulta. Encontrado em boa parte da América do Sul, distribuindo-se principalmente nas bacias dos rios Orinoco e Amazonas (Ramirez & Martinez, 1997). Este bagre apresenta maior número de raios ramificados na nadadeira dorsal e um padrão de coloração distinto em todo o corpo e nadadeiras, consistindo em manchas escuras sobre um fundo marrom – amarelado (Caúper, 2006). Essa tonalidade faz com que em alguns locais, seja conhecido também por peixe onça. Encontrado principalmente em baixas profundidades em reservatórios

de água doce, onde o pH varia de 5,8 a 7,2 e a temperatura média é de 25°C. Em seu habitat natural, o Jundiá da Amazônia apresenta hábito piscívoro (Layman et. al, 2005).

L. marmoratus possui alta adaptabilidade ao consumo de dietas secas e ao ambiente de confinamento. Também apresenta bons resultados quanto ao desempenho no primeiro estágio de vida, quando adaptados com dietas úmidas (Cruz-Casallas et. al, 2008). Por possuir tendência ao hábito alimentar onívoro quando confinado, é amplamente utilizado como parental na hibridização junto a peixes carnívoros, obtendo híbridos com menor taxa de canibalismo nas fases larvais (Ramirez & Martinez, 1997; Campos et. al, 2006) e mais versáteis nutricionalmente, como o Pintado Amazônico (*L. marmoratus* x *P. reticulatum*).

Variabilidade genética e marcadores moleculares

Para compreender melhor a dinâmica de espécies nativas e obter dados que contribuam com planos de manejo e conservação, os estudos de variabilidade genética têm se mostrado de suma importância para o potencial produtivo. O manejo reprodutivo feito a partir de um pequeno número de reprodutores resulta em perda de variabilidade genética, que é um dos principais problemas enfrentados na conservação das espécies naturais e na manutenção da população em cativeiro. Essa perda de variabilidade contribui para o aumento da endogamia e, conseqüentemente, reduz as taxas reprodutivas e o desempenho quanto ao ganho em peso, rusticidade e outras características relacionadas à produção (Allendorf et al., 2001; Ribeiro e Legat, 2009).

Através da manutenção da variabilidade genética, as espécies mantêm a vitalidade reprodutiva, a capacidade para se adaptar a mudanças ambientais e resistência a doenças (Resende et al., 2010).

Acompanhada da descoberta técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), veio à revolução nos estudos envolvendo análises genéticas, possibilitando o uso de um grande número de indivíduos por pesquisa. Essa técnica consiste em sintetizar *in-vitro* milhões de cópias de um determinado segmento do DNA, através da enzima DNA Polimerase, o que permite a quantificação e a análise da variabilidade genética dentro e entre populações. As análises são feitas a partir da semelhança e diferença entre as sequências de bases do DNA dos indivíduos (Ribolli, 2007).

Como consequência do sucesso da PCR, foram desenvolvidos diversos marcadores moleculares. Marcadores moleculares são segmentos cromossômicos que visam identificar polimorfismos em indivíduos ou em uma população, utilizados

frequentemente para estudo populacional, identificação de características de produção e a construção de mapas genéticos abrangentes em programas de melhoramento (Guerin et al., 2003). Se tratando de uma espécie relativamente nova no cultivo intensivo, o Jundiá da Amazônia demanda pesquisas de caráter genético, a qual facilite a seleção dos animais mais aptos à produção a partir de seu potencial produtivo. Este tipo de pesquisa lança mão de uma ferramenta muito abrangente, que são os marcadores moleculares microssatélites.

Marcadores microssatélites

Uma categoria de marcadores moleculares conhecida por apresentar sequências simples repetidas no DNA, recebe a denominação *Sequências Simples em Repetição* (SSR), *Short Tandem Repeats* (STR), ou mais comumente chamados de marcadores microssatélites (Litt e Luty, 1989). São altamente polimórficos e consistem em pequenas sequências de um a oito nucleotídeos que se repetem em série, ou seja, em *tandem*. Estes marcadores possuem características ideais para estudos de variabilidade genética em peixes por se apresentarem imparciais em relação a efeitos fenotípicos, pelo seu alto grau de polimorfismo e por serem codominantes. (Abdul-Muneer, 2014). Essa característica permite inclusive a observação do comprimento dos alelos herdados, possibilitando a identificação de homozigotos e heterozigotos, desse modo, os dados obtidos através dos marcadores são analisados pelos modelos estatísticos clássicos utilizados na genética populacional (Okazaki et al., 2017).

A obtenção desses marcadores é promovida através de amplificação dos microssatélites por PCR, utilizando *primers* específicos para as regiões do DNA que flanqueiam os microssatélites. Então, é possível obter a amplificação das sequências específicas que contém a repetição, e o polimorfismo será resultante da quantidade de repetições. Com a grande quantidade de informações provindas da utilização dos marcadores microssatélites, adquire-se conhecimento sobre a identidade genética, diversidade e frequência gênica da população ou indivíduos estudados (Allendorf, 2017). Esses dados servirão de base para as tomadas de decisão junto às técnicas de reprodução e manejo, a fim de recuperar populações naturais, conservar a diversidade genética de peixes ou mesmo aprimorar a produção da piscicultura, evitando consequentemente, perdas econômicas (Faleiro et al., 2007; Abdul-Muneer, 2014). Logo, a utilização dos marcadores, sobretudo os microssatélites se torna uma ferramenta

importante no auxílio à escolha dos reprodutores, e da variabilidade genética dentro e entre populações (Lopes et al., 2009).

Transferibilidade de primers microssatélite

Ainda que a utilização dos marcadores microssatélites seja muito eficiente e represente grande avanço nos protocolos de análises genéticas, quando o DNA da espécie em estudo ainda não está sequenciado, como a maioria dos peixes nativos, depara-se com um problema de execução, pois muitas vezes os *primers* espécie-específicos não existem. Com a descoberta da conservação de sítios nos genomas de espécies relacionadas, surgiram meios de se transferir marcadores entre espécies ou gêneros, observando maior afinidade de *loci* quanto mais perto taxonomicamente forem os indivíduos. Assim, podem-se estudar espécies ainda não sequenciadas, amenizando os fatores negativos, como géis de baixa resolução e bandas inespecíficas, que dificultam a análise dos polimorfismos (Faleiro et. al, 2003; Mia, 2005).

Alguns autores já comprovaram a eficiência da transferibilidade de microssatélites entre espécies. Lopera-Barrero e colaboradores (2016) realizaram com sucesso um estudo de transferibilidade de primers de diversas espécies para o jundiá (*Rhamdia quelen*) e piapara (*Leporinus elongatus*), tendo 4 *locus* apresentado resultados positivos na amplificação. Lima et al. (2008) testaram 52 *locus* microssatélites de espécies diferentes para o tambaqui (*Colossoma macropomum*), destes, 16 *locus* apresentaram boa amplificação. Em estudo com *Brycon orbignyanus*, Castro et. al (2017) obtiveram sucesso com nove primers em amplificação cruzada.

Referências

- Abdul-Muneer PM. 2014. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*, v.2014, p.1-11.
- Allendorf FW. 2017. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular Ecology*, 26(2), 420-430.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in ecology & evolution*, 16(11), 613-622.
- Benites, C. 2008. Caracterização genética do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares tipo microssatélite. 90p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Campos P, Martino RC, Trugo LC. 2006. Amin acid composition of Braziliam surubim fish (*Pseudoplatystoma corucans*) fed diets with different levels and sources of fat. *Food Chemistry*, v96, n.1, p. 126-130.
- Castro PLD, Ribeiro RP, Santos SCAD, Goes ESDR, Souza FPD, Poveda-Parra AR, Lopera-Barrero NM. 2017. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. *Ciência Rural*, 47(12).
- Cáuper GCB. 2006. Biodiversidade Amazônica – Flora Amazônica. Centro cultural dos povos da Amazônia – CCPA. Manaus, AM. v. 2.
- Cruz-Casallas NE, Díaz-Olarte JJ, Marciales-Caro LJ, Pabón-Peña FJ, Medina-Robles V M, Cruz-Casallas PE. 2008. Acondicionamiento a dieta seca de larvas de yaque (*Leiarius marmoratus*) obtenidas por reproducción artificial. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 21, 482.
- Faleiro FG. 2007. Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 102p.
- Faleiro FG, Faleiro ASG, Cordeiro MCR, Karia CT. 2003. Metodologia para operacionalizar a extracao de DNA de especies nativas do cerrado visando a análises moleculares. Embrapa Cerrados-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2016. The State Of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Rome: FAO yearbook.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. Fishery and aquaculture statistics 2012. Roma: FAO yearbook.
- Godinho HP. 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, MG, v. 31, n. 3, p. 351-360.
- Guérin G, Bailey E, Bernoco D, Anderson I, Antczak DF, Bell K, Caetano AR. 2003. The second generation of the International Equine Gene Mapping Workshop half-sibling linkage map. *Animal genetics*, 34 (3): 161-168.
- Inoue LAKA, Hisano H, Ishikawa MM, Rotta MA, Senhorini J. 2009. Princípios básicos para produção de alevinos de surubins (Pintado e Cachara). Embrapa Pantanal-Documents (INFOTECA-E).
- Layman CA, Winemiller K, Arrington AA, Jepsen DB. 2005. Body size and trophic position in a diverse tropical food web. *Ecology*, 86 (9): 2530-2535.
- Lima JS, Telles MPC, Resende LV, Gouveia FO, Boni TA. 2008. Amplificação cruzada e padronização de marcadores microssatélites em *Colossoma macropomum* (tambaqui). *Revista Biologia Neotropical*, v.5, p.41-49.

- Litt M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, v. 44, n. 3, p. 397.
- Lopes TS, Junior DPS, Povh JA, Lopera-Barrero NM. 2009. Análise da diversidade genética de dois estoques de *Collossoma Macropomum*. UEM.
- Lopera-Barrero NM, Tanamati F, Rodriguez-Rodriguez MDP, Povh JA, Poveda-Parra AR, Arellano Otonel RA, Ribeiro RP. 2016. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in *Rhamdia quelen* and *Leporinus elongatus*. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(1).
- Mia MY. 2005. Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. *Aquaculture*, v.247, p.267-273.
- Okazaki TI, Hallerman EM, Resende EK, Hilsdorf AWS. 2017. Genetic characterization of *Brycon hilarii* (Characiformes) populations within the Pantanal: Aspects of their conservation within a globally important Neotropical wetland. *Journal of Ichthyology*, 57(3), 434-444.
- Ramírez HG, Martínez RA. 1997. Aspectos preliminares de la biología pesquera del Yaque, *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) (Pisces: Siluriformes: Pimelodidae) en la parte alta del río Meta (Orinoquia Colombiana). *Boletín científico INPA*. 5:75-87.
- Resende EK, Oliveira CAL, Legat AP, Ribeiro RP. 2010. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In Embrapa Meio-Norte-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010, Maringá. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica: palestras. Maringá: SBMA, 2010.
- Ribeiro RP, Legat AP. 2008. Delineamento de programas de melhoramento genético de espécies aquícolas no Brasil. Teresina:Embrapa Meio-Norte. 25p.
- Ribolli J. Contribuição individual de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*) em fertilizações com pool de sêmen. 2007. p.42. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Vaini JO, Amaral CB, Dos Santos Silva DB, Benites C, Russo MR, Grisolia AB. 2016. Genetic variability of pure *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* individuals in the Paraná and Paraguay River basins. *Fisheries Science*, v. 82, n. 4, p.605-611.

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESTOQUES DE JUNDIÁ DA AMAZÔNIA (*Leirarius marmoratus*)

Resumo

Com a ascensão da piscicultura mundial, o cenário nacional tem a iniciativa de candidatar alguns peixes nativos para cultivo intensivo. Entre os bagres, o Jundiá da Amazônia (*Leirarius marmoratus*) se mostra um candidato robusto, de fácil cultivo e com boas características organolépticas em sua carne. Para o sucesso produtivo em cativeiro, se faz necessário considerar alguns fatores acerca da espécie, como a variabilidade genética, que deve possuir um nível aceitável num plantel de reprodutores, para que se mantenha uma boa diversidade, reduzindo as perdas por endogamia e baixa diversidade. Neste estudo, objetivou-se caracterizar a variabilidade genética de estoques comerciais de *L. marmoratus* do estado do Mato Grosso através de marcadores moleculares microssatélites. Foram analisados 143 indivíduos provindos de três estoques. A heterozigosidade observada média e o coeficiente de endogamia foram de 0.060; 0.084; 0.141; e 0.539; 0.562; 0.514, respectivamente para os estoques de Filadélfia (FI), Juína (JU) e Nova Mutum (NM). Observou-se o desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria dos *loci* nas três populações. Considerando a diferenciação genética, conclui-se que as três populações são muito próximas geneticamente, o que demanda um manejo reprodutivo que vise introduzir novo material genético os estoques a fim de enriquecê-los geneticamente para um posterior programa reprodutivo.

Palavras chave: DNA, marcadores moleculares, variabilidade genética, piscicultura, siluriformes.

Abstract

With the rise of world fish farming, the national scenario has the initiative to apply for some native fish for intensive farming. Among the catfish, the Amazonian Jundiá (*Leiarius marmoratus*) is a robust candidate, easy to grow and with good organoleptic characteristics in his flesh. For productive success in captivity, it is necessary to consider some questions about the species, such as genetic variability, which must have an acceptable level in a breeding stock, in order to maintain a good diversity, reducing losses due to inbreeding and low diversity. The objective of this study was to characterize the genetic variability of commercial stocks of *L. marmoratus* from the State of Mato Grosso through microsatellite molecular markers. We analyzed 143 individuals from three stocks. The mean observed heterozygosity and the inbreeding coefficient were 0.060; 0.084; 0.141; and 0.539; 0.562; 0.514, respectively for the inventories of Philadelphia (FI), Juína (JU) and Nova Mutum (NM). The Deviation in the Hardy-Weinberg equilibrium was observed in most of the loci in the three populations. Considering the genetic differentiation, it is concluded that the three populations are very close genetically, which requires a reproductive management that aims at introducing new genetic material the stocks in order to enrich them genetically for a later reproductive program.

Key words: DNA, molecular markers, genetic variability, fish culture, siluriformes

Introdução

O Brasil tem como atividade em crescimento a piscicultura (FAO, 2016), e entre as espécies com grande potencial produtivo está o jundiá da Amazônia (*Leiarius marmoratus*). O jundiá é um peixe migrador, semelhante a outros grandes bagres amazônicos (Layman et al., 2005). Devido à carne branca, características organolépticas muito favoráveis e possuir o hábito alimentar onívoro, o jundiá se apresenta excelente candidato para cultivo extensivo entre as espécies nativas da América do Sul (Mora, 2003). A produção, manejo e comercialização desses animais são realizados muitas vezes sem controle reprodutivo nem monitoramento de variabilidade genética, o que é desvantajoso não só para indústria piscícola, como também representa um risco biológico para as populações naturais, uma vez que pode haver aumento significativo de endogamia resultando em gargalos genéticos e consequente perda de variabilidade das espécies parentais nas populações nativas (Hashimoto, 2011).

Uma ferramenta amplamente utilizada atualmente na manutenção da variabilidade genética são os marcadores moleculares, que se mostram eficientes na definição de estratégias em programas de melhoramento genético. Os marcadores microssatélites vem sendo largamente utilizados em estudos de populações, para estimar o tamanho efetivo das populações em questão, obter a variabilidade desta população e também na identificação de híbridos, identificação da população-chave para a conservação de recursos genéticos e construção de mapas genéticos (Chistiakov et al., 2006). Assim, o emprego de metodologias, como os marcadores moleculares microssatélites, torna-se fundamental para o reconhecimento e caracterização genética de estoque. Diante disso, o presente estudo teve por objetivo analisar a variabilidade genética de estoques comerciais de jundiá da Amazônia no estado do Mato Grosso.

Materiais e Métodos

Obtenção das amostras

As amostras foram obtidas de estoques comerciais de reprodutores de jundiá da Amazônia (*Leiarius marmoratus*), da região de Campo Verde-MT (15°34'0''S, 55°10'8''W). Os parentais dos três estoques são oriundos de captura no rio Teles Pires, estado de Mato Grosso. Foram colhidas amostras de nadadeira caudal (0,5 cm²) de cada indivíduo, coletadas de 143 indivíduos pertencentes às pisciculturas da Fazenda

Filadélfia – grupo Bom Futuro (59 amostras), Juína (60 amostras) e de Nova Mutum (24 amostras). As amostras foram acondicionadas em tubos contendo álcool 70%.

Extração de DNA e amplificação

O DNA foi extraído utilizando-se o protocolo de extração com NaCl descrito por Lopera-Barrero et al. (2008). A concentração do DNA foi medida através do uso de espectrofotômetro PICODROP® (Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom) e as amostras foram padronizadas para uma concentração final de 10ng/μL. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), com a eletroforese conduzida em tampão TBE 0,5X (250mM Tris-HCl, 30mM ácido bórico e 41,5mM EDTA) por uma hora a 70V. O gel foi visualizado em aparelho transluminador com luz ultravioleta, e a imagem fotografada com a utilização do programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

A amplificação foi realizada para um volume final de reação de 15μL, utilizando-se 1X do tampão Tris-KCl, 2,0mM de MgCl₂, 0,8μM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 0,4mM de cada dNTP, uma unidade de Platinum *Taq* DNA Polimerase e 20ng de DNA. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida realizou-se 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C; 30 segundos de anelamento (temperatura variável para cada *primer*); e um minuto de extensão a 72°C; por fim realizou-se uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Foram avaliados em amplificação cruzada, 49 *loci* microssatélites: cinco descritos por Sanches & Galleti Jr. (2006) para *Brycon hilarii* (Bh5, Bh6, Bh8, Bh13, e Bh16); oito descritos por Batista (2010) para *Brachyplatystoma rosseauixii* (BR37, BR38, BR44, BR47, BR49, BR51 e BR61); nove descritos por Lee & Kocher (1996) para *Oreochromis niloticus* (UNH 104, UNH140, UNH 160, UNH169, UNH162, UNH190, UNH231, UNH159 e UNH163); quatro primers descritos por Calcagnotto et al. (2001) para *Piaractus mesopotamicus* (Pme2, Pme4, Pme5 e Pme28); dez descritos por Ríos et. al, 2013 para *Rhamdia quelen* (Rhq2, Rhq7, Rhq8, Rhq13, Rhq15, Rhq16, Rhq20, Rhq26, Rhq28 e Rhq29); dois para *Pseudoplatystoma punctifer* (Ppu01 e Ppu02) descritos por Saulo-Machado et al. (2011); dois primers descritos por Santos et al. (2009) pra *Colossoma macropomum* (Cm1A8, Cm1A11); cinco descritos por Farias et al. (2003) para *Arapaima gigas* (CTm2, CTm5, CTm7, CTm13 e CTm15) e quatro primers

descritos por Barbosa et al. (2006) para *Prochilodus lineatus* (Par12, Par14, Par15 e Par21). Os primers amplificados com sucesso na espécie *Leiarius marmoratus*, acompanhando suas respectivas unidades repetitivas e temperaturas de anelamento (°C) estão apresentados na Tabela 1. As reações foram realizadas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Austin, TX, USA).

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (acrilamida : bisacrilamida – 29 : 1) desnaturante (6 M de uréia), e conduzida em tampão TBE 0,5X com 180 V e 250 mA por sete horas. Para a visualização dos alelos microssatélites foi utilizada a coloração com nitrato de prata. O gel foi submetido a uma solução de fixação (10% de etanol e 0,5% de ácido acético) por 20 minutos; em seguida impregnado por solução 6mM de nitrato de prata por 30 minutos; revelado em solução de 0,75M de NaOH e 0,22% de formol-40% e fotografado com câmera Nikon CoolPix 5200 para análises posteriores. O tamanho dos alelos foi calculado pelo programa Kodak EDAS-290, utilizando-se DNA ladder (Invitrogen) de 10, 50 e 100 pb.

Análise estatística

O número de alelos por loco, o número efetivo de alelos por loco, índice de Shannon, frequências alélicas e distância genética de Nei (1973) foram calculados utilizando o programa GenAlex versão 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Para a heterozigosidade observada e esperada, equilíbrio de Hardy Weinberg, utilizou-se o programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005), que também foi utilizado para valores de diferenciação genética (F_{st}). O coeficiente de endogamia (F_{is}) e riqueza alélica (R_a) foi calculado para cada *locus* utilizando o programa Fstat 2.9.3 (Goudet, 2005). Foi utilizada a definição de Wright (1978), onde valores entre 0,00 a 0,05; 0,051 a 0,15; 0,151 a 0,25 e >0,25 indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética, respectivamente. A AMOVA foi obtida com o programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005), enquanto o teste de médias foi realizado pelo programa estatístico R (R Foundation for Statistical Computing, 2011) utilizando-se Tukey a 5% de significância. Utilizando-se a análise UPGMA, foi construído um dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978), por meio do programa MEGA, versão 6.0 (Tamura et al., 2013). A análise fatorial de correspondência (AFC) foi obtida pelo programa Genetix (Belkhir et al., 2004) utilizando a função “AFC 3D sur populations”.

STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para identificar a formação de grupos (K) de populações geneticamente similares, seguindo o modelo misto de clusters com período de comprimento de 10000 e 100000 repetições e o número de clusters. As estimativas de K (número de clusters) foram obtidas a partir de simulações realizadas com K variando de um a cinco (K = 1-5), reproduzindo 20 corridas para cada valor hipotético de K de acordo com Evanno et al. (2005).

Resultados

Dos 49 primers testados em transferibilidade para *L.marmoratus*, se obteve a boa amplificação de nove primers. Esses primers reproduziram um total de 18 alelos no estoque FI, 16 no estoque JU e 15 alelos em NM. Para os três estoques, o BR47 se mostrou monomórfico (mesmo padrão alélico para todos os indivíduos analisados), ao mesmo tempo em que os outros locus se mostraram polimórficos, apresentando de 2 a 3 alelos cada. O tamanho dos alelos variou de 136 (BR47) a 273 pb (pares de base) (BR61), como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos primers microssatélites utilizados para a análise de variabilidade do *Leiraius marmoratus*.

Locus	GenBank	Seqüências	TA (°C)	Tamanho (pb)	Referência
BR47	KC117543	F' TCAGTGTGTGTGTGACTGTTG R' GCTCCTCTTGTTTCACTTTC	59	136-150	Batista, 2010
BR51	KC117543	F' GTTACACATGGTCGCTGGTG R' GTTCATTCTCTTCGGCTTCG	60	252-257	Batista, 2010
BR61	KC117543	F'CTGTGCGAAAACATGAGGCAG R' GACATCAGAGCGAAGCACAC	65	268-273	Batista, 2010
PPU01	HQ317844	F' CAGCATCAGCGGAAAAGTTG R' CAGTGGCGCATTCTGTAATC	58	205-212	Saulo-Machado et al., 2011
PPU02	HQ317845	F' CAGAACCAGATCCAACGTCA R'CTCCCTAGACTTCCCATTTC	62	215-238	Saulo-Machado et al., 2011
BH8	DQ408244	F' CCATGGCTCAACACAGATAT R' TGTACGAATCCTGAAATGCT	56	182-193	Sanches & Galetti, 2006
RHQ2	KC117543	F' CCTCTTTCCTTCCCGTTT R' GCACTTGTTCTGTCTGTCC	58	215-235	Ríos et al., 2013

A heterozigosidade esperada variou de 0,033 (RHQ2) a 0,477(BR61), enquanto a heterozigosidade observada apresentou valores de 0,000 (RHQ2) a 0,250 (BH8). O locus BH8 se destacou na maior parte parâmetros avaliados, mostrando ser o mais polimórfico entre todos os *locus* utilizados. Foi verificado desvio no equilíbrio de Hard-Weinberg ($p>0,05$) em todos os *locus* analisados, exceto o locus BR51 nos estoques FI e JU, locus RHQ2 no estoque NM e PPU01 em JU.

A variável Fis, que se refere ao coeficiente de consanguinidade, mostrou uma notável variação de -0,009 (BR51) a 1,000 (RHQ2), sendo verificados valores negativos apenas no locus BR51. Em relação às médias nos três estoques, o estoque JU apresentou o maior índice (0,562), mostrando-se mais endogâmico. Já os estoques FI e NM apresentaram valores de 0,539 e 0,514, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Medidas de variação genética em oito locos microssatélites aplicados em três populações de *Leiarius marmoratus*.

Estoque	Locus	Na	Ne	Ra	Ho	He	Fis	Hw
Filadélfia (FI)	BR47	3	1,071	1,931	0,017	0,066	0,747	0,000*
	BR51	2	1,070	1,749	0,068	0,065	-0,027	0,788
	BR61	3	1,554	2,288	0,085	0,357	0,766	0,000*
	PPU01	2	1,295	1,998	0,024	0,228	0,898	0,000*
	PPU02	3	1,091	2,153	0,052	0,083	0,387	0,000*
	BH8	3	1,302	2,738	0,155	0,232	0,338	0,000*
	RHQ2	2	1,053	1,651	0,017	0,050	0,663	0,000*
	Mean	2,571	1,205	2,073	0,060	0,154	0,539	0,113
Juína (JU)	BR47	1	1,000	1,000	-	-	-	-
	BR51	2	1,034	1,488	0,033	0,033	-0,009	0,896
	BR61	3	1,684	2,958	0,102	0,406	0,753	0,000*
	PPU01	2	1,180	1,988	0,100	0,153	0,360	0,058
	PPU02	3	1,144	2,359	0,033	0,126	0,740	0,000*
	BH8	3	1,942	2,871	0,233	0,485	0,525	0,000*
	RHQ2	2	1,034	1,488	0,000	0,033	1,000	0,000*
	Mean	2,286	1,288	2,022	0,084	0,206	0,562	0,159
Nova Mutum (NM)	BR47	1	1,000	1,000	-	-	-	-
	BR51	2	1,280	2,000	0,083	0,219	0,632	0,002*
	BR61	3	1,910	3,000	0,125	0,477	0,747	0,000*
	PPU01	2	1,637	2,000	0,176	0,389	0,568	0,024*
	PPU02	2	1,280	2,000	0,083	0,219	0,632	0,002*
	BH8	3	1,405	2,919	0,250	0,288	0,153	0,000*
	RHQ2	2	1,229	1,999	0,125	0,187	0,349	0,106
	Mean	2,143	1,392	2,131	0,141	0,296	0,514	0,022

Na: número de alelos por locos; Ne: número efetivos de alelos por locos; Ra: riqueza alélica; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; Fis: coeficiente de endogamia; Hw: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. (* $P < 0,05$)

A AMOVA (Tabela 3) indicou que a maior variação está dentro de cada estoque para todas as combinações (53,36%, 53,10% e 58,24% para FI x JU, FI x NM e JU x NM, respectivamente). Os índices de fixação (F_{st}) variaram de 0,0142 a 0,049 (Tabela 3), manifestando uma pequena (0.00 a 0.05) diferenciação genética entre as populações, segundo a definição de Wright (1978). Os valores de distância genética demonstraram alta similaridade entre as três populações, o que foi corroborado com os valores de F_{st} , que demonstraram pequena diferenciação (Tabela 3) e também com o Dendrograma (Figura 3) construído a partir da distância genética, que mostra FI e NM agrupados num primeiro nó a distância de 0,003, havendo a inclusão dos três estoques no segundo nó a distância de 0,006, indicando que há baixa diferenciação.

Figura 2. Dendrograma baseado na Distância genética de Nei entre os indivíduos de *L. marmoratus*.

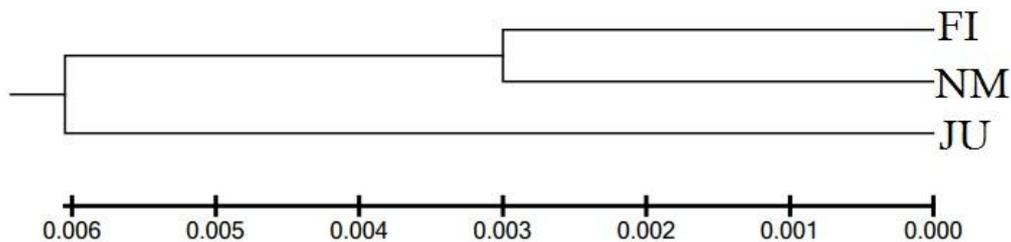


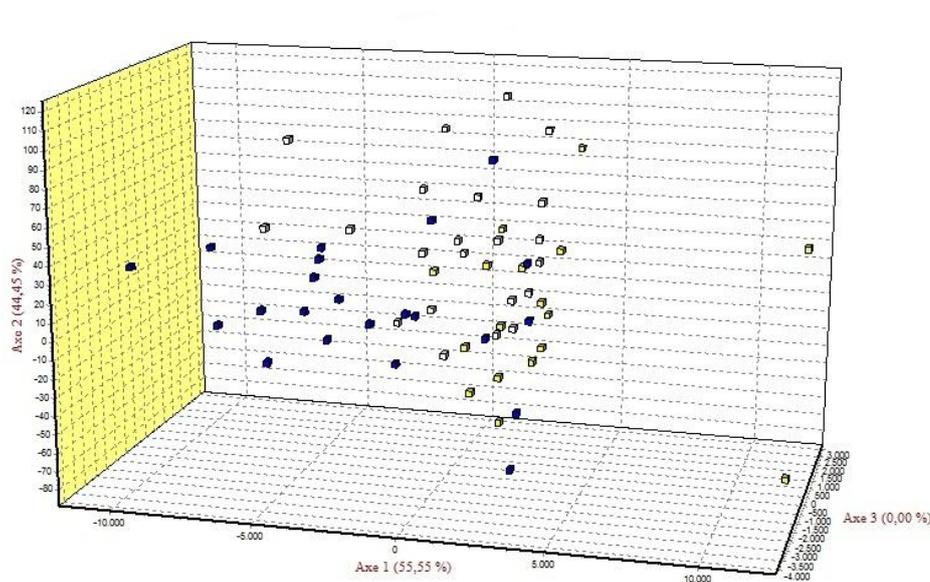
Tabela 3. Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) e Identidade genética de Nei em três estoques de *Leiarius marmoratus*.

		Soma dos quadrados	Componentes da Variância	Percentagem da variação	F_{ST}	Distância genética de Nei
FI x JU	Between stocks	3,740	0,0249	4,89	0,049*	0,006
	Within stocks	90,311	0,2872	56,36		
	Within individuals	23,500	0,1975	38,75		
Total		117,551	0,5096	100		
		Soma dos quadrados	Componentes da Variância	Percentagem da variação	F_{ST}	Distância genética de Nei
FI x NM	Between stocks	1,284	0,0073	1,42	0,0142	0,010
	Within stocks	63,469	0,2743	53,10		
	Within individuals	19,500	0,2349	45,48		
Total		84,253	0,5165	100		
		Soma dos quadrados	Componentes da Variância	Percentagem da variação	F_{ST}	Distância genética de Nei
JU x NM	Between stocks	2,004	0,0154	2,54	0,0254	0,013
	Within stocks	77,508	0,3536	58,24		
	Within individuals	20,000	23,810	39,22		
Total		99,512	0,6071	100		

* Significativo $P < 0,05$

A análise fatorial de correspondência (AFC) nos mostra a distribuição da variabilidade genética dentro de um plano cartesiano (Figura 3), ou seja, apresenta a distribuição de variabilidade genética de forma espacial. Observa-se na figura que não houve a formação de *clusters* (grupos homogêneos e separados), e sim, a sobreposição de vários indivíduos de populações distintas, o que indica que os indivíduos estão mais relacionados geneticamente, corroborando os resultados obtidos na AMOVA. Estes resultados são compatíveis com o Dendrograma de similaridade genética (Figura 2), onde, de forma geral não houve distância que evidenciasse grande diferença genética entre os estoques.

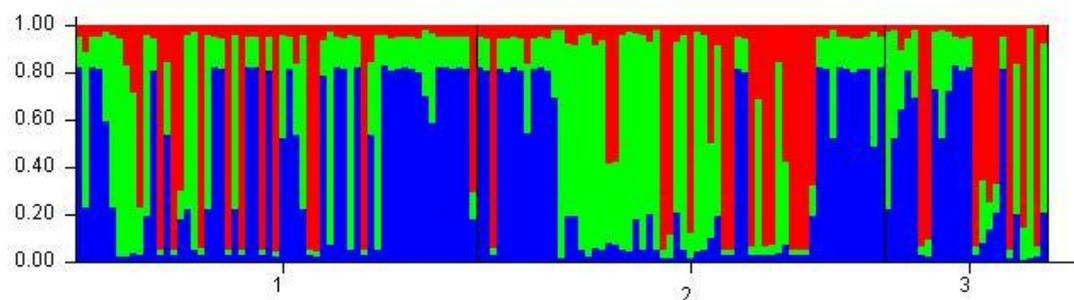
Figura 3. Análise fatorial de correspondência (AFC) de três estoques de *Leiarius marmoratus*.



Em amarelo: estoque 1 (FI); Em azul: estoque 2 (JU); Em branco: estoque 3 (NM).

O gráfico de atribuição de indivíduos (Figura 4) possibilitou identificar os indivíduos que possuem maior probabilidade de pertencerem a um único grupamento genético, ao mesmo passo que se observa que indivíduos representados por diferentes cores têm maior probabilidade de possuir dois ou mais grupamentos genéticos definidos pela análise bayesiana, o que ocorreu na maioria dos indivíduos.

Figura 4. Atribuição de indivíduos através dos resultados do agrupamento para K=3 de *L. marmoratus* obtidos através do programa Structure.



Os indivíduos são representados como colunas e as linhas pretas delimitam os estoques. Números laterais indicam a proporção genética pertencente a cada agrupamento. 1=FI 2=NM e 3=JU.

Discussão

O maior valor de heterozigosidade observada neste trabalho foi de 0,250 para o estoque NM, similares a valores obtidos (0,203) por Ribeiro et al. (2015) para *Piaractus mesopotamicus*, utilizados em programas de repovoamento e inferior às médias obtidas com *Rhamdia quelen* (0,537; 0,500; 0,482) em trabalho conduzido por Goes (2017) utilizando o *locus* RHQ2 . Sabendo que a análise de heretozigosidade é essencial para a avaliação de variabilidade nos estoques, segundo Moreira et al. (2007), quanto maior o índice observado, maior a diferenciação entre os indivíduos da população em questão. A população que apresentou maior número de alelos foi a população FI, porém a média de heterozigosidade observada foi a menor (0,060), o que indica que a maioria dos alelos apresentados em seu genótipo seriam homozigotos. Os resultados do coeficiente de endogamia (Fis) se mostraram significativos em praticamente todos os loci nos três estoques, o que implica a um alto nível de consanguinidade, com médias de 0,539, 0,562 e 0,514 em FI, JU e NM, respectivamente, contrário a estudos com *Leiarius marmoratus* realizados por Marciano (2016), utilizando outros *locus*, dentre eles, o maior índice foi de 0,28, que já é um nível considerável de consanguinidade.

A AMOVA teve como intuito identificar se a variação era maior entre grupos do que dentro de grupos e os resultados apontam que a variação foi maior dentro dos estoques do que entre eles, chegando a 58,24% na JU x NM. Esse valor ratifica a AFC, onde se vê claramente a sobreposição dos grupos, ao mesmo passo que indivíduos de

uma mesma população estão dispersos, indicando assim a proximidade genética entre os grupos. Provavelmente isso ocorreu devido aos parentais dos três estoques serem advindos do mesmo rio, pressupondo de que teriam origem em comum antes dos acasalamentos que originaram os animais amostrados neste estudo. A domesticação das espécies selvagens e a cultura em cativeiro, onde possivelmente foram utilizados poucos exemplares para a formação reprodutiva dos planteis, favoreceram acasalamentos consanguíneos devido ao uso restrito dos mesmos progenitores (Benzie, 2009). Isso já é menos provável em indivíduos na natureza, onde os acasalamentos são feitos ao acaso e o equilíbrio de Hardy-Weinberg tende a ser respeitado, gerando um maior grau de polimorfismo e diminuição da consanguinidade (Resende et al., 2010). Portanto, é de grande importância que se realize estudo de variabilidade nos estoques naturais do rio Tele Pires (MT), de onde se originam os parentais dos estoques analisados neste estudo, para a certificação dos níveis de heterozigosidade, endogamia e equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A análise bayesiana indicou que a maioria dos indivíduos possui a “mistura” dos grupamentos genéticos, como consequência de cruzamentos de indivíduos advindos de um mesmo local. Os resultados corroboram com a análise UPGMA apresentada em dendrograma.

Conclusão

Neste estudo identificou-se que as populações de *Leiarius marmoratus* em cativeiro dessa região estão muito próximas geneticamente, apresentando uma baixa variabilidade e desfavorecendo o uso desses animais para iniciar um processo de seleção e melhoramento. Assim, se torna imprescindível um manejo reprodutivo que vise introduzir novo material genético nos estoques para enriquecer geneticamente os animais destinados ao plantel de reprodutores comerciais.

Informação de geolocalização

Universidade Estadual de Maringá (-23.404717”S -51.9399913”W) localizada na cidade de Maringá, estado do Paraná, Brasil.

Agradecimentos

O autor agradece ao Grupo Bom Futuro pelos animais envolvidos nesta pesquisa, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Grupo PeixeGen, do Departamento de Zootecnia, UEM, PR.

Referências

- Batista JS. 2010. Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo. 148 f. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.
- Barbosa ACDR, Corrêa TC, Galzerani F, Galetti Jr. PM, Hatanaka T. 2006. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Molecular Ecology Notes*. (6): 936-938.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi IL, Raufaste N, Bonhomme F. 2004. GNETIX 4.05. Logiciel sous windows tm pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, cnrs umr 5000. [Acessado em: 30 ago. 2017]. <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>.
- Benzie JAH. 2009. Use and exchange of genetic resources of penaeid shrimps for food and aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1: 232–250.
- Calcagnotto D, Russello M, DeSalle R. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Resources*, 1(4), 245-247.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FA. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255(1-4), 1-29.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*. 1:47–50.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620.
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2016. The State Of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Rome: FAO yearbook.
- Farias IP, Hrbek T, Brinkmann H, Sampaio I, Meyer A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, 3: 128-130.
- Goes MD, Goes ESR, Ribeiro RP, Lopera-Barrero NM, Castro PL, Bignotto TS, Bombardelli RA. 2017. Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: Reproductive parameters and genetic variability of offspring. *Theriogenology*. (88): 254-263.
- Goudet J. FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3.2). 2005. [Accessed: Set. 09, 2017]. <http://www.unil.ch/izea/software/FSTat.html>.

- Hashimoto DT. 2011. Aplicação de marcadores moleculares no monitoramento genético de programas de hibridação interespecífica em pisciculturas brasileiras. Tese – doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brasil.
- Layman CA, Winemiller KO, Arrington DA, Jepsen DB. 2005. Body size and trophic position in a diverse tropical food web. *Ecology*, 86(9), 2530-2535.
- Lee WJ, Kocher TD. 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Biol.* 49(1):169-171.
- Lopera-Barrero NM, Povh JA, Ribeiro RP, Gomes PC, Jacometo CB, Lopes TS. 2008. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e Investigación Agraria*, v. 35, p. 65-74.
- Marciano CMM. 2016. Utilização de marcadores microsatélites na caracterização de peixes da espécie Jundiá (*Leiarius marmoratus*). Pg 38 2016. Trabalho de Curso (Bacharel em Zootecnia) – Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário de Rondonópolis, Rondonópolis.
- Mora JA. 2003. Avances y perspectivas de la producción comercial de bagres en Venezuela. *El Acuicultor*, 5, 9-14.
- Moreira AA, Hilsdorf AWS, Silva JV, Souza VR. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 42, 521–526. doi:10.1590/S0100-204X2007000400010
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 70, n. 12, p. 3321-3323.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, v.28, p.2537-2539. [Accessed: Dec. 08, 2017]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3463245/>>.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- R Foundation for Statistical Computing, Vienna AI 3-900051-07-0. 2011. R Development Core Team. *R A Lang. Environ. Stat. Comput.* 55:275–286.
- Resende EK, Oliveira CAL, Legat AP, Ribeiro RP. 2010. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In Embrapa Meio-Norte-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010, Maringá. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica: palestras. Maringá: SBMA, 2010.
- Ribeiro RP, Lopera-Barrero NM, Santos SCA, Rodriguez-Rodriguez MDP, Oliveira SN, Vargas L, Poveda-Parra AR. 2015. Genetic diversity of pacu for restocking programs in the Tietê and Grande rivers, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(6).
- Ríos N, Bouza C, Pardo BG, Guerra-Varela J, Gutierrez V, Martinez P, García G. 2013. Pyrosequencing for microsatellite discovery and validation of markers for population analysis in the non-model Neotropical catfish *Rhamdia quelen*. *Molecular Ecology Resources* 13, 546-549
- Sanches A, Galetti Jr PM. 2006. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes*, v.6, p.1045-1046.
- Santos MD, Hrbek T, Farias IP. 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplains. *Mol Ecol Resour* 9 (3), 874-876.
- Saulo-Machado AC, Formiga KM, Ortiz MF, Sousa ACB, Alves-Gomes JA, Batista JS. 2011. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish

Pseudoplatystoma punctifer (Siluriformes: Pimelodidae). Conservation Genetics Resources, 3(2), 307-310.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 30:2725–2729.

Wright S. Evolution and genetics of populations. 1978. Chicago: University of Chicago Press. 511p.