

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do  
pacu, *Piaractus mesopotamicus***

**Autor: Jayme Aparecido Povh  
Orientador: Dr. Ricardo Pereira Ribeiro**

**MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro – 2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do  
pacu, *Piaractus mesopotamicus***

**Autor: Jayme Aparecido Povh  
Orientador: Dr. Ricardo Pereira Ribeiro**

**Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal.**

**MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro – 2007**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P879a Povh, Jayme Aparecido, 1977-  
Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* / Jayme Aparecido Povh. -- Maringá : [s.n.], 2007.  
75 f., il. [algumas color]

Orientador : Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 2007.

1. Aqüicultura. 2. *Piaractus mesopotamicus*.  
3. Variabilidade genética. 4. Conservação genética. 5. Impacto genético. 6. Repovoamento de peixes. 7. RAPD.  
8. Microssatélite. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Zootecnia.

Cdd 21.ed. 639.37248



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DO  
MANEJO REPRODUTIVO EM PACU, *Piaractus  
mesopotamicus*.**

Autor: Jayme Aparecido Povh  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 13 de fevereiro de 2007.

Prof. Dr. Danilo Pedro  
Streit Junior

Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho

Prof. Dr. Alberto José Prioli

Dr. Rodolfo Nardez Sirol

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
(Orientador)

“De fato, não fracassei ao tentar, cerca de 10.000 vezes,  
desenvolver um acumulador. Simplesmente, encontrei 10.000  
maneiras que não funcionam.”

**Thomas A. Edison**

## **COM AMOR, DEDICO...**

Aos meus pais, José Povh e Jesulina da Silva Povh, pelo amor e carinho dispensados em todos estes anos, e por não terem medido esforços para me darem tudo o que precisei. Obrigado, pela educação, apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

À minha irmã, Juliana Aparecida Povh, pela ajuda, amizade, incentivo.

Ao meu sobrinho Lucas Povh Cavali, pelos grandes momentos de alegria.

À minha namorada, Taís da Silva Lopes, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que aqui chegasse, guiando-me em vários momentos difíceis no decorrer desta tese.

Aos meus pais, José Povh e Jesulina da Silva Povh, por terem me ensinado o fundamental para viver com dignidade, respeito e fé.

À minha irmã, Juliana Aparecida Povh, uma pessoa que admiro muito, devo a ela o fato de eu ter vindo estudar em Maringá.

À minha namorada, Taís da Silva Lopes, pelo grande apoio e amor que me deu durante estes anos de doutorado.

Ao meu Orientador, Professor Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pela confiança que depositou em mim nestes 10 anos em que convivemos, pela amizade, pelos ensinamentos, enfim, por ter sido uma das pessoas mais importantes durante essa minha “caminhada”.

À Professora Dra. Claudete Aparecida Mangolin do Departamento de Biologia, minha segunda orientadora. Sou muito grato a ela, ajudou-me muito ao enfrentar o desafio que foi trabalhar com o marcador microsatélite.

Ao Professor Dr. Héden Luiz Marques Moreira da UFPeL, pela ajuda na implementação do marcador microsatélite e na contribuição na discussão dos resultados obtidos por esta técnica.

Aos amigos do laboratório Patrícia Gomes, Carol, Sheila, Karla, Thiago e Dany que direta ou indiretamente contribuíram muito para este trabalho.

Aos amigos Nelson Mauricio Lopera-Barrero e Angela Rocio Poveda Parra, pelos vários momentos que passamos juntos, são pessoas que ficaram marcadas para sempre na minha vida.

Ao amigo Danilo Pedro Streit Jr., com quem convivi e aprendi muito, uma pessoa que sempre admirei pela sua determinação.

A todos meus amigos e colegas de curso, especialmente ao Nelson Fukumoto.

À Zeni, técnica do laboratório, uma extraordinária companhia, que mesmo sem entender de Biologia Molecular, ajudou-me muito.

Aos Funcionários da Duke Energy Sandro Britto, Norberto Vianna, Mauro Jardim, João Carlos e Edmilson Pelisar, e especialmente ao Rodolfo Sirol, um dos mentores do presente projeto.

À Ligia e ao Eduardo (Jacaré), pelo convívio e pela grande ajuda na parte de experimento realizado na Duke Energy.

Aos funcionários da PPZ e do DZO e do laboratório de nutrição.

Aos amigos de república Arcélio, Marco, Nelson e Leonardo

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), na qual já estou há 10 anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ).

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida durante o mestrado.

À Duke Energy Internacional por ter apoiado o projeto.

E enfim, a todos que contribuíram para mais esta jornada da minha vida.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Jayme Aparecido Povh, filho de José Povh e Jesulina da Silva Povh, nasceu em Mamborê, Estado do Paraná, no dia 05 de Julho de 1977.

Formou-se em Zootecnia, pela Universidade Estadual de Maringá, em 2001.

Em 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos na área de piscicultura e biologia molecular, que no dia 27 de fevereiro de 2004, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

Em 2004, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos na área de piscicultura e biologia molecular.

No dia 13 de fevereiro de 2007, submeteu-se à banca para defesa da tese.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
FIGURAS DO APÊNDICE .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
I - INTRODUÇÃO GERAL .....	01
1.1. <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	01
1.2. Rio Paranapanema .....	02
1.3. Repovoamento .....	03
1.4. Monitoramento genético por marcadores moleculares .....	06
1.4.1. Populações nativas .....	07
1.4.2. Estoques cultivados .....	08
1.4.3. Ferramentas para o monitoramento genético .....	10
1.4.3.1. Marcador RAPD .....	10
1.4.3.2. Marcador microssatélite .....	12
1.4.3.3. Marcador RAPD x marcador microssatélite .....	14
1.4.4. Manejo reprodutivo .....	15
1.4.4.1. Auxílio dos marcadores moleculares .....	17
1.5. Referências .....	18
II - OBJETIVOS GERAIS .....	24
III - COMPARAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES NATIVA E CULTIVADA DE PACU ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) .....	25
RESUMO .....	26

ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	32
AGRADECIMENTOS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
IV - COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS PROGÊNIES DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> OBTIDAS POR DIFERENTES SISTEMAS REPRODUTIVOS.....	39
RESUMO.....	40
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÃO.....	45
ABSTRACT.....	48
AGRADECIMENTOS.....	48
REFERÊNCIAS.....	48
V - AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> NO SISTEMA SEMINATURAL.....	52
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	53
INTRODUÇÃO.....	54
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
RESULTADOS.....	59
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	66
VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
VII - APÊNDICES.....	73

## LISTA DE TABELAS

	Página
III - COMPARAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES NATIVA E CULTIVADA DE PACU ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ).....	25
TABELA 1 - Seqüências de nucleotídeos dos <i>primers</i> , número e tamanho dos fragmentos amplificados obtidos para a população e o estoque de <i>P. mesopotamicus</i> .....	31
TABELA 2 - Índice de diversidade genética de Shannon e porcentagem de fragmentos polimórficos para obtidos para a população e o estoque de <i>P. mesopotamicus</i> .....	32
TABELA 3 - Diversidade genética ( <i>Gst</i> ) e o número de migrantes por geração ( <i>Nm</i> ) obtidos entre a população e o estoque de <i>P. mesopotamicus</i> .....	32
IV - COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS PROGÊNIES DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> OBTIDAS POR DIFERENTES SISTEMAS REPRODUTIVOS .....	39
TABELA 1 - Seqüências de nucleotídeos dos <i>primers</i> , número de fragmentos e tamanho dos fragmentos amplificados obtidos para <i>P. mesopotamicus</i> dos dois sistemas reprodutivos. ....	44
TABELA 2 - Número de fêmeas que desovaram, mortalidade, índice de diversidade genética de Shannon, polimorfismo e similaridade genética obtida os reprodutores de <i>P. mesopotamicus</i> utilizados pelos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural.....	45
TABELA 3 - Índice de diversidade genética de Shannon, polimorfismo e similaridade genética obtida pelas progênies dos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural de <i>P. mesopotamicus</i> . ....	45
V - AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> NO SISTEMA SEMINATURAL .....	52
TABELA 1 - Número de acesso, seqüência de repetição, temperatura de anelamento e seqüência dos <i>primers</i> dos oito <i>loci</i> microssatélite descrito para <i>P. mesopotamicus</i> .....	58

TABELA 2 - Frequência de alelos para os oito <i>loci</i> microssatélite encontrado para os reprodutores e para a progênie de <i>P. mesopotamicus</i> .....	60
TABELA 3 - Número de alelos (A), heterozigose observada (Ho), heterozigose esperada (He), coeficiente de endogamia (Fis) e teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P(HW)) .....	61

## LISTA DE FIGURAS

	Página
I - INTRODUÇÃO GERAL .....	01
FIGURA 1 - Tanques de reprodução seminatural... ..	16
FIGURA 2 - Detelhes do tanque de reprodução seminatural... ..	17
FIGURA 3 - Incubadora.. ..	17
III - COMPARAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES NATIVA E CULTIVADA DE PACU ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ).....	25
FIGURA 1 - Mapa do rio Paranapanema detalhando os locais de captura de <i>P. mesopotamicus</i> e da localização do estoque de reprodutores em Salto Grande-SP... ..	28
V - AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DA DIVERSIDADE GENÉICA DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> NO SISTEMA SEMINATURAL .....	52
FIGURA 1 - Participação dos reprodutores de <i>P. mesopotamicus</i> na comoposição da progênie pelo sistema reprodutivo seminatural. As figuras <b>a</b> e <b>b</b> mostra a contribuição dos machos e das fêmeas, respectivamente .....	62
FIGURA.2 - Contribuição das famílias de <i>P. mesopotamicus</i> obtidas pelo sistema siminatural.....	63

## FIGURAS DO APÊNDICE

	Página
VII - APÊNDICES.....	73
FIGURA 1A - Alelos de microssatélite analisados em gel de poliacrilamida desnaturante (10%) corado com nitrato de prata.....	74
FIGURA 2A - Análise dos fragmentos RAPD do <i>primer</i> W3 em gel de agarose 1,7%. “L” corresponde ao ladder de 100 pb.....	75

## RESUMO

Em muitos rios brasileiros têm-se constatado diminuição e até mesmo o desaparecimento de muitas espécies de peixes por fatores como poluição, construção de barragem e sobrepesca. Entre estas espécies, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) atualmente é raramente encontrado em alguns rios, por exemplo, no rio Paranapanema. Como forma de contornar os impactos sobre as populações, o repovoamento tem sido muito empregado no Brasil. Contudo, esta prática tem sido realizada, em geral, sem nenhum respaldo científico. Frente a este cenário, qualquer ação que vise à recuperação do ambiente deve buscar o monitoramento por meios científicos e não à base de suposições. Entre as metodologias para este objetivo, os marcadores moleculares são ferramentas que podem ser utilizados para o reconhecimento e caracterização genética de estoques (nativo e de reprodutores) e dos peixes que serão soltos no ambiente. Desta forma, os trabalhos aqui apresentados avaliaram a diversidade genética de uma população de *Piaractus mesopotamicus* coletada do médio rio Paranapanema, de um estoque de reprodutores de uma piscicultura com propósito de repovoamento, e também as progênie obtidas pelos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural. Para estas avaliações foram utilizados os marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélite, ambos baseados na PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Os resultados mostraram uma menor variabilidade genética do estoque em relação à população, promovido pelo efeito fundador deste estoque e/ou devido a diferente origem dos peixes que formaram o estoque. Contudo, a moderada diferenciação genética e o alto Nm obtidos, indicam que as populações e o estoque apresentaram um *pool* genético semelhante. Quanto aos sistemas reprodutivos, observou-se uma grande redução da variabilidade genética na progênie do sistema de

reprodução por extrusão em relação ao sistema seminatural. Embora este último sistema tenha apresentado dominância de alguns reprodutores, devendo-se a existência de paternidade múltipla, houve a manutenção da variabilidade genética da progênie em relação aos reprodutores.

**Palavras-chave:** Conservação genética, Manejo reprodutivo, Marcador microssatélite, Marcador RAPD, Peixe, Variabilidade genética.

## ABSTRACT

In many Brazilian Rivers it has been observed a decrease and even a disappearance of many fish species caused by factors as pollution, building dams and over fishing. Among these species, the pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nowadays is barely found in some rivers, for example, in the Paranapanema River. As a form to outline the impacts on fish's populations, the restocking technique has been very used in Brazil. However, this practice has been realized, in general, without any scientific support. Facing this scenery, any action that seeks the environment recovery should look for the monitoring by scientific ways not basing in suppositions. Among methodologies for this aim, the molecular markers are tools that can be used to recognition and genetic characterization of stocks (native and broodstocks) and fish that will be get free in the environment. So, the works presented here evaluated the genetic diversity of *Piaractus mesopotamicus* collected in the middle of Paranapanema River, of fish farming broodstocks with restocking purpose, and also offspring's obtained by extrusion and semi-natural reproductive systems. For these evaluations the molecular markers RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and microsatellite were using, both based on PCR (Polymerase Chain Reaction). The results showed a lower genetic variability of stock in relation to population, promoted by founder effect of this stock and/or due to different origin of fish that formed the stock. However, the moderate genetic differentiation and high Nm obtained indicate that populations and stock presented a similar genetic pool. As for the reproductive systems, a great genetic variability reduction was observed in the offspring from extrusion reproduction system in relation to the semi-natural system. Although this last system has presented dominance of some reproducers, due multiple

paternities existence, there was a genetic variability maintenance of offspring in relation to reproducers.

**Key words:** Genetic conservation, Reproductive management, Microsatellite marker, RAPD marker, Genetic variability

## I. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. *Piaractus mesopotamicus*

O *Piaractus mesopotamicus*, conhecido como pacu, caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu, pertence a ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Myleinae (Nakatani *et al.*, 2001). Esta espécie é originária das Bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Urbinati e Gonçalves, 2005).

O período reprodutivo do *P. mesopotamicus* estende-se de novembro a janeiro, caracterizando-se por apresentar desova total, fecundação externa e por necessitar realizar migrações reprodutivas a fim de liberar seus gametas (Romagosa *et al.*, 1988). Por ser uma espécie de piracema, em ambiente confinado depende da indução hormonal para obter sucesso na sua reprodução (Castagnolli e Donaldson, 1981; Lima *et al.*, 1991). Ainda, apresenta fecundação externa e sem cuidado parental (Britto *et al.*, 2003).

No rio Paranapanema, o *P. mesopotamicus* é uma espécie raramente encontrada, ocorrendo especialmente no médio curso deste rio. Este peixe apresenta corpo alto e arredondado; coloração parda sendo mais escura no dorso e pálida no ventre; nadadeiras escuras; nadadeira adiposa arredondada; escama pequena e em grande número na linha lateral; boca pequena e terminal, portando dentes molariformes; ventre levemente comprido; e hábito alimentar herbívoro (Britto *et al.*, 2003).

Devido ao elevado valor comercial, adaptação à alimentação artificial e também pela facilidade de obtenção de larvas através de reprodução induzida (Furuya, 2001), o *P. mesopotamicus* tem sido muito utilizado nas pisciculturas tanto para o cultivo quanto para o repovoamento dos rios.

## 1.2. Rio Paranapanema

O rio Paranapanema, um dos mais importantes afluentes da margem esquerda do rio Paraná, nasce na vertente ocidental da serra da Paranapiacaba (48°15'W 24°16'S), no município de Capão Bonito, Estado de São Paulo, e está inserido na bacia do Alto Paraná. Este rio possui uma extensão de aproximadamente 600 km, dos quais cerca de 330 km forma a divisa natural entre os Estados de São Paulo e Paraná a partir da foz do rio Itararé na parte superior do seu curso (Britto *et al.*, 2003).

Ao longo da extensão, com orientação leste-oeste, o rio Paranapanema possui um desnível aproximadamente de 500 metros. Por causa disso, além de outros fatores, o rio Paranapanema começou a ser aproveitado para geração de energia hidroelétrica. Tudo começou em 1958 com a construção da usina de Salto Grande, no médio Paranapanema (Britto *et al.*, 2003). Atualmente, este rio conta com 10 usinas em operação, o que transformou seu curso original em uma sucessão de reservatórios justapostos (UHE Jurumirim, UHE Piraju, UHE Paranapanema, UHE Chavantes, UHE Salto Grande, UHE Canoas 2, UHE Canoas 1, UHE Capivara, UHE Taquaruçu e UHE Rosana) (Leuzzi *et al.*, 2004).

A fauna dos peixes do rio Paranapanema é composta por nove grandes Ordens (Characiformes, Gymnotiformes, Siluriformes, Cypriniformes, Perciformes, Cyprinodontiformes, Synbranchiformes, Pleuronectiformes, Rajiformes) e um total de 155 espécies indentificadas. Entre estas, algumas podem ser facilmente encontradas (*Astyanax altiparanae*, *Metynnis maculatus*, *Mileus tiete*, *Leporinus friderici*, *Pimelodus maculatus*, etc.), outras pouco encontradas (*Astyanax scabripinnis*, *A. fasciatus*, *Leporinus elongatus*, *L. lacustris*, *L. obtusidens*, *L. paranensis*, *Prochilodus lineatus*, *Pimelodus absconditus*, *P. paranensis*, etc.) e ainda raramente encontradas (*Brycon orbignyanus*, *Salminus maxillosus*, *S. hilarii*, *Piaractus mesopotamicus*, *Paulicéia luetkeni*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Steindachneridion scripta*, etc.) (Britto *et al.*, 2003).

Estudando os riachos do rio Paranapanema, Castro *et al.* (2003) enfatizam que a diversidade deste rio ainda é bastante desconhecida. Das 52 espécies coletadas, os autores encontraram oito que são seguramente novas, cinco possuem *status* taxonômico ainda indefinido, enquanto outras três são espécies introduzidas.

A maioria das espécies exóticas introduzidas no rio Paranapanema é pouco ou raramente encontra (*Cichla monoculus*, *Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus*, *Tilapia*

*rendalli*, *Clarias gariepinus*). Contudo, *Plagioscion squamosissimus* é uma das espécies introduzidas neste rio que apresenta alta ocorrência (Britto *et al.*, 2003).

### 1.3. Repovoamento

Os peixes neotropicais representam 13% da biodiversidade total de vertebrados, embora ocorram somente em 0,003% dos ecossistemas aquáticos do mundo. Cerca de 400 novas espécies de peixes são descritas a cada década em águas continentais e, considerando um eventual aumento de 50% na riqueza de peixes do mundo, estimasse-se que existam aproximadamente 33.000 espécies, sendo que 8.000 consiste de peixes neotropicais, 2.122 destes catalogados somente Brasil (Buckup e Menezes, 2003; Agostinho *et al.*, 2005).

Mesmo com 15,0% de toda proteína animal consumida no mundo ser proveniente dos peixes (FAO, 2004), pouco se conhece sobre sua diversidade. Ainda, estima-se que 20% da ictiofauna continental do mundo esteja extinto ou ameaçado de extinção. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2007), em torno de 134 espécies de peixes de água doce estão em risco de extinção no Brasil.

Em geral, dos fatores que levaram a redução ou desaparecimento de muitas espécies de peixes, podem-se destacar a poluição e eutrofização, o assoreamento, a construção de barragens e controle de cheias, a sobrepesca e a introdução de espécies (Vrijenhoek, 1998; Agostinho *et al.*, 2003; Hatanaka *et al.*, 2006).

Entre estes fatores, a pesca industrial tem uma forte contribuição na redução dos estoques de peixes devendo-se a sobrepesca (Hauser *et al.*, 2002; Bartron e Scribner, 2004; Ayllon *et al.*, 2006). Contudo, esta ocorre em maior parte em águas marinhas, sendo que os recursos pesqueiros em águas continentais são geralmente explorados por comunidades que vivem ao longo de rios, lagos e reservatórios, em muitas regiões a única fonte de proteína disponível (Hilsdorf *et al.*, 2006). Mesmo assim, em muitos rios brasileiros tem-se constado uma diminuição e até mesmo o desaparecimento de muitas espécies de peixes, antes comumente capturadas pelos pescadores.

Outro fator que pode promover a redução da diversidade de espécies nos rios é a barragem das usinas hidroelétricas, que atualmente já são mais de 600 no Brasil. Estas interrompem os movimentos de peixes potamódromos, interferem no ciclo de vida dos organismos aquáticos, e produzem alterações importantes nos ecossistemas (Agostinho *et al.*, 2003).

Segundo o IBAMA, qualquer entidade envolvida com o meio ambiente, como a construção de barragem hidroelétrica, deve adotar métodos de proteção e conservação dos recursos biológicos aquáticos.

Entre as ações de manejo realizadas para reduzir os impactos da ação do homem sobre os estoques de peixes, pode-se destacar: período de defeso durante o período reprodutivo; controle da pesca (época, local, tamanho mínimo de captura e malha); proibição do uso de determinados equipamentos de pesca; cotas de pesca; estocagem ou repovoamentos; e a construção de mecanismos de transposição de peixes (escadas e elevadores) (Hilsdorf *et al.*, 2006; Agostinho *et al.*, 2006). No entanto, muitas destas estratégias e ações para a melhoria dos recursos naturais têm sido realizadas, em geral, sem respaldo científico (Agostinho *et al.*, 2005).

As três décadas de programas de estocagem de peixes no Brasil, em geral realizadas sem nenhum respaldo científico (Agostinho *et al.*, 2005), vêm se tornando cada vez mais comum. No passado, a introdução de espécies exóticas era vista com interesse para o aumento da pesca comercial, porém, hoje é consenso que tal prática é desaconselhável e pode ter contribuído para a redução e até o desaparecimento de espécies locais (Hilsdorf *et al.*, 2006). No entanto, para espécies nativas a soltura de peixes tem sido cada vez maior no Brasil.

Em vários Estados do Brasil, as hidroelétricas e também algumas pisciculturas comerciais estimuladas por órgãos governamentais, como no caso do Paraná, vem realizando soltura de peixes no ambiente com objetivo de povoar ou repovoar os rios.

No Paraná, mais de 9,8 milhões de peixes juvenis já foram soltos nos rios do Estado pelo programa de Reposição Pesqueira dos Rios Paranaenses desenvolvido pela Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. Este programa visa, segundo a secretaria, recuperar o meio ambiente por meio da reposição dos estoques de peixes e tem como meta a soltura de aproximadamente 20 milhões de alevinos até o final de 2007. Ainda, a secretaria destaca que até o momento já foram investidos no programa R\$ 2,7 milhões. Entre as últimas solturas de peixe nos rios do Paraná, pode-se destacar: 230 mil peixes juvenis (100 mil *P. mesopotamicus*, 70 mil *P. lineatus* e 60 mil *L. elongatus*) no rio Paranapanema; 180 mil peixes juvenis (*P. mesopotamicus* e *P. lineatus*) nas margens da Ilha de Ponciano, na Represa de Xavantes; e 200 mil peixes juvenis (*P. mesopotamicus* e *P. lineatus*) no rio Paranapanema (Agência Estadual de Notícias, 2007).

A soltura de peixes também tem sido realizada pela Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura da Duke Energy International, geração Paranapanema, localizada na usina Salto Grande, São Paulo, como forma de mitigar e compensar os impactos resultantes da construção dos reservatórios. Segundo a empresa, somente em 2002 foram soltos mais de um milhão e meio de alevinos de peixes nativos das espécies *P. mesopotamicus* e *L. elongatus* em pontos estratégicos (lugares mais propícios à sobrevivência dos peixes) do rio Paranapanema (Duke Energy, 2007).

Como se pode observar, a introdução de peixes nos rios é uma prática muito comum no Brasil. No entanto, estes peixes normalmente são provenientes de poucos casais devido a alta prolificidade dos peixes, o que promove um gargalo genético (efeito *bottleneck*), levando a uma redução da variabilidade genética (Povh et al., 2006). Dessa forma, introduções de peixes de forma irracional, mesmo feitas com as melhores intenções, podem proporcionar uma redução da variabilidade genética e, conseqüentemente, levar a perda de resistência a doenças e da capacidade de se adaptar em um novo ambiente (Allendorf e Phelps, 1980; Taniguchi, 2003).

Mesmo a reprodução de um grande número de peixes não garante que a progênie apresentará alta variabilidade. É comum que na forma reprodutores a utilização de peixes da própria piscicultura e, portanto, pode favorecer o acasalamento entre reprodutores mais aparentados geneticamente (Povh et al., 2006), conduzindo a um aumento da homozigose e, conseqüentemente, da variabilidade genética (Moreira, 2003).

A redução da variabilidade genética, além de promover uma maior sensibilidade às mudanças ambientais, a qual pode inclusive levar uma espécie à extinção (Guttman e Berg, 1998; Oliveira *et al.*, 2002), também pode afetar o crescimento (Moreira, 2001) e a reprodução (Porta *et al.*, 2006b). Desta forma, a manutenção da variabilidade genética é de grande importância para a conservação das espécies (Barroso *et al.*, 2005), e necessária para os indivíduos enfrentarem as mudanças ambientais e se desenvolverem (Falconer, 1987; Ryman *et al.*, 1995).

Ainda, segundo Vasemägi *et al.* (2005) e Sønstebo *et al.* (2007), a mistura (cruzamento) de peixes da população nativa com peixes liberados no ambiente pode promover a perda de genes importantes para a adaptação local. Isso porque cada população de uma determinada espécie possui um *pool* de genes diferentes para a adaptação local e, desta forma, quando um local é reabastecido com indivíduos criados em cativeiro que não se originaram do hábitat da população nativa, genes importantes

para sobrevivência naquele hábitat podem ser reduzidos ou mesmo perdidos (Almeida *et al.*, 2003; Leuzzi *et al.*, 2004). Desta forma, qualquer tentativa para reabilitar populações reduzidas depende de manter tão íntimo quanto possível a variabilidade genética da população selvagem com os peixes que serão liberados no ambiente (Allendorf *et al.*, 1987).

É evidente que o impacto potencial que as espécies nativas têm sofrido, os estoques de reprodutores podem ser uma alternativa para a recuperação da diversidade genética, promovendo a manutenção dos recursos genéticos, principalmente quando existe risco de extinção (Koljonen *et al.*, 2002; Barroso *et al.*, 2005). No entanto, a meta final da conservação de recursos genéticos deveria ser o repovoamento, ou seja, a reprodução naturalmente das populações, em que as pisciculturas deveriam oferecer não mais que meios temporários para preservar os recursos genéticos (Koljonen *et al.*, 2002) e não o simples povoamento dos rios.

Frente a este cenário, qualquer ação que vise a recuperação do ambiente deve buscar o monitoramento por meios científicos e não à base de suposições. Dentre as metodologias, os marcadores moleculares são ferramentas que podem ser utilizados para o reconhecimento e caracterização genética de estoques (nativos e cultivados), para evidenciar populações chaves para conservação, identificar espécies crípticas, entender a ação das mudanças ambientais sobre a variabilidade genética de uma espécie, entre outros (Ryman e Utter, 1987).

#### **1.4. Monitoramento genético por marcadores moleculares**

O ideal para um programa de reprodução com finalidade de conservação genética, como no caso do repovoamento, é a integração com o monitoramento genético. Para isso, os marcadores moleculares podem ser eficientemente utilizados.

Metodologias que utilizam marcadores moleculares podem assegurar as respostas, por exemplo, da manutenção da variabilidade genética da progênie após o processo reprodutivo.

O monitorando da variabilidade genética e da endogamia nas Estações de pisciculturas são necessários para a manutenção da capacidade adaptativa de uma espécie (Saura *et al.*, 2006). Segundo Wang *et al.* (2002), 10% de aumento na endogamia podem resultar em uma redução em aptidão de cerca de 3% a 15%. Isto foi constatado por Shikano e Taniguchi (2002ab), os quais observaram uma correlação

negativa entre a endogamia e a sobrevivência e também com a tolerância a salinidade em *Poecilia reticulada*, e por Cena *et al.* (2006), os quais constataram uma correlação negativa entre a endogamia e o crescimento em *Sander vitreus*.

#### 1.4.1. Populações nativas

Segundo Sofia *et al.* (2006), a alta variabilidade genética encontrada nas populações de *Astyanax scabripinnis* coletadas do rio Cambé, em Londrina (Paraná), com valores de 63,5% a 64,8%, obtido através do marcador RAPD, pode explicar a tolerância desta espécie para as atuais condições físico-químicas do rio, considerado bastante poluído.

Em geral, a variabilidade genética encontrada para muitas espécies é bastante variável, dependendo da espécie, do rio, da localização no rio e das pressões existentes em cada ambiente.

Após analisarem com o marcador RAPD a variabilidade genética de populações de *Pimelodus maculatus* dos rios Tietê e do Paranapanema, Almeida *et al.* (2003) constataram valores variáveis de polimorfismo entre as populações (51,94 a 61,51%). Trabalhando com o mesmo marcador, Leuzzi *et al.* (2004) encontraram valor bastante inferior de variabilidade genética na população localizada na parte inferior (42,64%) em relação às populações da parte média e alta do rio Paranapanema (75,0%).

Além da variabilidade genética, outro aspecto importante destacado por Almeida *et al.* (2003) e por Leuzzi *et al.* (2004), é a diferenciação genética existente entre as populações de um rio. Caso existe uma alta diferenciação genética entre os peixes que forem soltos no ambiente e os peixes nativos, genes importantes, como para a adaptação as condições ambientais locais, podem ser perdidos com o repovoamento.

A definição do grau de diferenciação genética foi definida por Wright (1978). Este autor classificou a diversidade genética entre populações ( $F_{st}$  - correspondente ao  $G_{st}$  de Nei's) em quatro níveis: baixa diferenciação genética ( $F_{st} = 0,00$  a  $0,05$ ), moderada diferenciação genética ( $F_{st} = 0,05$  a  $0,15$ ), alta diferenciação genética ( $F_{st} = 0,15$  a  $0,25$ ) e elevada diferenciação genética ( $F_{st} > 0,25$ ).

Com base nas definições a cima, Leuzzi *et al.* (2004) constataram moderada a alta diferenciação genética entre populações de *Astyanax altiparanae* do rio Paranapanema (0,0895 a 0,2813). Foi uma surpresa para os autores o alto número de migrantes por geração ( $N_m = 2,54$ ) entre as populações do reservatório de Capivara (médio

Paranapanema) e Jurumirim (alto Paranapanema), pois antes mesmo da primeira hidroelétrica ser construída, já existia uma barreira geográfica natural, a cachoeira de Salto Grande e, portanto, possivelmente os dois reservatórios tenham sido reabastecidos com alevinos de *A. altiparanae*.

Também com base em Wright (1978), Almeida *et al.* (2003) encontraram média diferenciação genética entre as populações do rio Tietê ( $G_{st} = 0,0716$  a  $0,1007$ ) e alta entre as populações do rio Paranapanema ( $G_{st} = 0,1870$  a  $0,2103$ ), provavelmente deve-se a um maior fluxo gênico entre as populações do primeiro rio ( $N_m =$  número de migrantes por geração =  $4,333$  a  $6,481$ ) em relação ao segundo ( $N_m = (1,878$  a  $2,173)$ ).

São vários os fatores que podem estar estabelecendo um maior ou menor fluxo genético entre as populações. Além da interferência do homem no ambiente, como a construção de barragens hidroelétricas, as diferenciações genéticas entre populações, promovida pela ausência parcial ou total de fluxo gênico, pode ocorrer devido às barreiras naturais do rio ou ainda diferentes migrações reprodutivas. Um exemplo deste último caso foi observado por Wasko e Galetti Jr. (2002), que constataram, através do marcador RAPD, que os peixes coletados de diferentes localidades do rio São Francisco de *Brycon lundii* apresentavam simpatria, com a existência de pelo menos duas populações distintas, provavelmente, devido migrações reprodutivas diferenciadas. A mesma conclusão chegou Hatanaka e Galetti Jr. (2003) e Hatanaka *et al.* (2006) estudando *Prochilodus marggravii* de diferentes localidades do rio São Francisco, com o marcador RAPD e microssatélite, respectivamente.

Estes estudos populacionais são importantes para o conhecimento da diversidade genética, e podem contribuir para promover a conservação e o aumento dos recursos exploráveis (Ortega-Villaizán Romo *et al.*, 2006).

#### **1.4.2. Estoques cultivados**

A utilização de poucos reprodutores (seis a oito por geração) e o acasalamento entre indivíduos mais aparentados, segundo Wasko *et al.* (2004), foram os responsáveis por promover uma diminuição da variabilidade genética dos estoques de reprodutores de matrinhã (*Brycon cephalus*) do Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais (CEPTA) em relação a uma população nativa do rio Amazonas.

O manejo reprodutivo pode, apenas em uma geração, promover grande perda da variabilidade genética, como pode ser observado no trabalho de Porta *et al.* (2006b).

Estes autores, estudando a espécie *Solea senegalensis*, encontraram uma grande redução da variabilidade genética dos reprodutores da primeira geração em relação as duas gerações de reprodutores seguintes, principalmente com relação ao número de alelos microssatélites que foi reduzido aproximadamente 50%.

Embora alguns autores tenham demonstrado semelhança na variabilidade genética entre estoques nativo e cultivado, como observado por Porta *et al.* (2006) para a espécie *Solea senegalensis*, Saura *et al.* (2006) para *Salmo salar*, Triantafyllidis *et al.* (2002) para *Silurus aristotelis* e Neville *et al.* (2007) para *Oncorhynchus tshawytscha*, vários trabalhos têm observado o contrário. Entre estes, pode-se citar: *Salmo trutta* (Was e Wenne, 2002), *Sparus aurata* (Alarcón *et al.*, 2004), *Haliotis discus hannai* (Li *et al.*, 2004), *Paralichthys olivaceus* (Sekino *et al.*, 2002; Hara e Sekino, 2003, Liu *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2006), *Salvelinus alpinus* (Lundrigan *et al.*, 2005), *Salmo salar* (Norris *et al.*, 1999; Elliott e Reilly, 2003), *Verasper variegatus* (Ortega-Villaizán Romo *et al.*, 2005; Ortega- Villaizán Romo *et al.*, 2006). Como a redução da variabilidade genética nos estoques é irreversível, podendo ser recuperada somente com a introdução de um novo material genético (Yokota *et al.*, 2003; Sekino *et al.*, 2004), é importante a manutenção da variabilidade genética destes.

A seleção não intencional como alimentação, ambiente e interação social podem influenciar a sobrevivência, o crescimento e alterar a composição de cada família, o que, conseqüentemente, pode promover alterações na variabilidade genética antes e após soltura Frost *et al.* (2006). Desta forma, além da análise da variabilidade genética de um estoque de reprodutores, também é importante este monitoramento nos alevinos destinados ao repovoamento e nos peixes após a soltura.

Trabalhando com a espécie *Verasper variegatus*, Ortega-Villaizán Romo *et al.* (2005), constaram que embora a variabilidade genética tenha sido superior na população nativa em relação ao estoque de reprodutores, foi semelhante nas progênes obtidas antes e após as capturas dos peixes no ambiente.

Semelhantemente, Sekino *et al.* (2005) trabalhando com *Paralichthys olivaceus* também verificaram similar composição das famílias antes e após a soltura no ambiente. Contudo, Ortega-Villaizán Romo *et al.* (2006), trabalhando com *V. variegatus*, encontraram diferença na composição das famílias antes e depois da soltura, no entanto, os autores não encontraram diferenças entre as duas recapturas realizadas.

A seleção de animais menores ou maiores e a não utilização de todo o período reprodutivo de uma espécie reofilica, também pode proporcionar grande redução da variabilidade genética (Povh et al., 2006).

Muitas pisciculturas utilizam a seleção por tamanho para reduzir o canibalismo, comum nas espécies carnívoras. No entanto, tal prática pode proporcionar uma redução da variabilidade genética, como observaram Frost *et al.* (2006) na espécie *Lates calcarifer*. Estes autores constataram que a seleção por tamanho para reduzir o canibalismo, proporcionou alteração na composição das famílias, inclusive com alguns machos deixando de contribuir com a progênie.

Além da manutenção da variabilidade genética, fatores como a definição das espécies para o programa de repovoamento, os locais e os períodos de soltura, tamanho de soltura dos peixes e sanidade, são requisitos fundamentais que devem ser considerados no repovoamento (Sirol e Britto, 2006).

### **1.4.3. Ferramentas para o monitoramento genético**

Marcadores genéticos são instrumentos importantes para o estudo de populações e para a compreensão dos mecanismos de herança. O desenvolvimento de metodologias de análise molecular tem permitido a análise do genoma e das variações existentes, tanto em regiões que codificam produtos gênicos, quanto naquelas cuja função permanece desconhecida (Regitano, 2001).

Os marcadores moleculares fornecem uma metodologia mais realística para a pesquisa e monitoramento do *status* genético em estoques nativos e cultivados (Alam e Islam, 2005).

#### **1.4.3.1. Marcador RAPD**

A biologia molecular desenvolveu-se de maneira expressiva após a descoberta da estrutura do DNA, em 1953 por Watson e Crick (Alberts, 1997). Desde então, diversas técnicas de biologia molecular surgiram possibilitando a detecção de polimorfismo em nível de DNA ao invés de apenas o fenótipo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Quando aplicadas com critério, estas técnicas podem ser úteis em estudos de genética de populações, sistemática e ecologia de vários organismos (Rieseberg, 1996).

Uma das mais marcantes contribuições da biologia molecular foi o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Regitano, 2001), que foi desenvolvida por Mullis em 1983 (Mullis, 1990). Esta técnica consiste na replicação do DNA *in vitro* catalisada por uma enzima *Taq* DNA polimerase que faz a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, a partir das extremidades 3' dos oligonucleotídeos sintéticos (*primers*), cada um complementar a uma fita da dupla hélice do DNA. Como os *primers* devem ser complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar, é necessário o conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos ou pelo menos da extremidade desta região (Regitano, 2001).

A alta especificidade e sensibilidade da PCR tornaram esta a principal técnica de diagnóstico molecular e ferramenta essencial para os mais diversos campos da investigação genética (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Entretanto, a aplicação de marcadores moleculares tornou-se mais acessível com o desenvolvimento do marcador *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) por dois grupos independentes, Williams *et al.* (1990) e Welsh e McClelland (1990). A ampla utilização desta técnica deve-se principalmente a sua rapidez, relativa acessibilidade, alto polimorfismo, pequena quantidade de material biológico necessário para a amplificação e a não necessidade do conhecimento prévio do genoma da espécie-alvo (Bártfai, 2003).

A técnica de RAPD permite analisar o DNA a partir de *primers* únicos de seqüência simples e arbitrária, normalmente de 10 bases de comprimento. Um *primer* arbitrário pode dirigir a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando, assim, na visualização de várias bandas no gel (Dinesh *et al.*, 1993), o que permite extrair considerável informação relativa à variabilidade de nucleotídeo no genoma (Borowsky, 2001).

A amplificação de um fragmento RAPD requer duas seqüências complementares, uma em cada fita da dupla hélice, ao *primer* único e arbitrário, sendo que o polimorfismo ocorre devido a diferenças no DNA, como trocas, deleções e inserções de nucleotídeos, nos sítios de anelamento do *primer* ou entre eles, que podem prevenir a amplificação do DNA por falta de complementaridade, ou pela distância demasiadamente grande entre os sítios de amplificação nas duas fitas de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O número de fragmentos obtidos pelo marcador RAPD é ilimitado, uma vez que vários *primers* podem ser utilizados e as seqüências destes fragmentos vão desde

seqüências de cópia única, até altamente repetida, o que dá um aumento na variação genética (Oliveira *et al.*, 2002).

Embora o marcador RAPD seja a de menor custo, etapas e tempo para obtenção dos resultados (Milach, 1998), possui algumas desvantagens: apresenta característica dominante; dificuldade de assumir homologia entre dois fragmentos (Lynch e Milligan, 1994); sensibilidade a pequenas modificações de concentrações dos componentes da reação, podendo produzir alterações no padrão dos marcadores (Barbosa Neto, 1998); e baixo grau de reprodutibilidade (Pérez *et al.*, 1998).

A baixa reprodutibilidade deste marcador é, em geral, afetada pela concentração de magnésio e do DNA (MacPherson *et al.*, 1993), entretanto, a seleção criteriosa dos locos como a seleção apenas dos fragmentos de herança mendeliana ou somente dos locos que apresentar repetibilidade em duas ou mais ampliações independentes com o mesmo *primer*, permite uma maior precisão desta técnica.

O marcador RAPD demonstra uma potencial ferramenta para monitorar a variação genética dos estoques (nativo e cultivado). Ainda, devido sua simplicidade e baixo custo pode ser empregado para auxiliar o manejo reprodutivo de forma a minimizar a perda da variabilidade genética (Moreira *et al.*, 2003).

#### **1.4.3.2. Marcador microsatélite**

Nos genomas dos eucariotos é observada grande quantidade de DNA repetitivo, classificado de acordo com o número de nucleotídeos e sua complexidade (Regitano, 2001). Entre estes tipos de elementos estão as seqüências microsatélites. Seu alto conteúdo polimórfico é uma importante característica para estudo de indivíduos dentro e entre populações, no estudo de parentesco e na construção de mapas genéticos de alta precisão que possibilitam, por exemplo, a identificação de *loci* associados a doenças monogênicas e traços quantitativos (Regitano, 2001b; Yan *et al.*, 2005).

Os microsatélites são seqüências simples repetitivas (SSR – *Simple Sequence Repeats*), compostas por um a quatro nucleotídeos, repetidas em *tandem*. São estruturas muito freqüentes e distribuídas ao acaso, permitindo uma ampla cobertura do genoma eucarioto (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Entretanto, em trabalho recente, Alam e Islam (2005) afirmaram que o número de nucleotídeos das repetições pode variar de um a oito.

Segundo Regitano (2001), esta técnica é de grande utilidade na identificação de indivíduos ou linhagens. Entretanto, a aplicação em estudos de populações pode ser dificultada por uma elevada variação intrapopulacional, dificultando o estabelecimento de um perfil característico, principalmente para aquelas populações que possuem uma ampla base genética.

Cada bloco de repetições é geralmente menor que 100 pares de nucleotídeos. Do mesmo modo que outras regiões repetitivas do genoma, a variação do número de repetições em cada *loci* é, provavelmente, resultante de erros no deslocamento da DNA polimerase durante a replicação do ácido nucléico (Regitano, 2001).

As características deste tipo de marcador o tornam ideal para o mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e em estudos de genética populacional. Sob o ponto de vista da biologia molecular são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo por locus (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Alam e Islam (2005) reiteraram que os marcadores são muito úteis na detecção de altos níveis de polimorfismo e alelos raros.

Como estão localizadas em regiões de cópia única, estas seqüências repetitivas de DNA podem ser analisadas pela técnica de PCR, com o emprego de *primers* complementares às seqüências flanqueadoras (Regitano, 2001b). Ainda, segundo a autora, a separação dos produtos de PCR deve ser realizada por um processo de alta definição, usualmente a eletroforese em gel desnaturante, pois a diferença entre alelos pode ser de apenas dois nucleotídeos.

Uma vez que os oligonucleotídeos são complementares à seqüência de cópia única são obtidos marcadores unilocais, altamente polimórficos e de herança co-dominante. Estes são atributos de grande valor para a construção de mapas genéticos (Regitano, 2001). Ainda, segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), as características do método permitem que toda e qualquer população segregante possa ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético. Desta maneira, a escolha da população para mapeamento não precisa ser feita com base na maximização da distância genética, e sim, visando a população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse.

Alguns *loci* microsatélite tem um número bastante grande de alelos (>20pb/*loci*), o que os torna muito útil para aplicações como identificação de paternidade em populações complexas, enquanto outros têm um número menor de alelos, sendo mais

apropriados para aplicação em estudos de genética populacional e filogenia (Mia *et al.*, 2005).

Em genomas animais, a constatação de que ocorre conservação de sítios em espécies relacionadas, torna possível, em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies ou mesmo gêneros, com o uso de *primers* heterólogos (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Mia *et al.*, 2005).

O desenvolvimento destes marcadores pode ser feito pela análise de seqüências contidas em bancos de dados, através da localização das SSRs e do delineamento de *primers* para a região que flanqueia a repetição. Esta estratégia é limitada pela quantidade de informações catalogadas nos bancos de dados. A seleção de fragmentos contidos em uma biblioteca genômica é outra estratégia bastante empregada. Outra possibilidade é através da clonagem pela hibridização de colônias de microorganismos específicos para esta finalidade (Regitano, 2001).

Nas últimas décadas, as análises por microsatélite emergiram devido a sua grande sensibilidade em detectar variações genéticas intra e entre populações. São sensíveis indicadores da homozigose resultante de cruzamentos consanguíneos, e, deste modo, aplicáveis na distinção de sutis diferenciações populacionais. Diversos estudos demonstram que este tipo de marcador é ideal para o estudo da diversidade genética em organismos aquáticos (Yan *et al.*, 2005).

Como os microsatélites são considerados os marcadores mais eficientes na revelação da variação alélica e altos níveis de variabilidade, eles podem freqüentemente detectar diferenças mesmo entre populações intimamente relacionadas. Ou seja, o polimorfismo obtido por marcadores microsatélite tem se tornado uma poderosa ferramenta no manejo de estoques em aqüicultura (Alam e Islam, 2005), em análises populacionais e na conservação da biodiversidade (Romana-Eguia *et al.*, 2004).

#### **1.4.3.3. Marcador RAPD x Marcador microsatélite**

Analisando duas variedades de *Cyprinus carpio*, Bártfai *et al.* (2003) observaram que o marcador microsatélite forneceu informação mais detalhada sobre a diversidade genética do que o marcador RAPD. Porém, tanto a freqüência das bandas (RAPD), quanto a freqüência de alelos (microsatélite), foram muito similares, e os dendrogramas formados pelas duas metodologias falharam na tentativa de demonstrar o agrupamento das amostras de acordo como o estoque de origem.

Semelhantemente, Yan *et al.* (2005) afirmaram que, de maneira geral, apesar da consistência dos dados gerados pelos ensaios com RAPD e análises por microssatélites, a metodologia por microssatélite revelou informações mais detalhadas da diversidade nas carpas estudadas.

Em análise de três populações de *Oncorhynchus nerka*, Zelenina *et al.* (2006) observaram coerência na variabilidade e na divergência genética obtida com os marcadores RAPD e microssatélite. Entretanto, os autores destacaram que as diferenças encontradas, principalmente com relação ao dendrograma, devem-se a fato que os métodos empregados exploraram partes diferentes do genoma, conseqüentemente, os resultados, embora válidos, podem não ser correspondentes. Desta forma, para aumentar a confiança dos resultados, seria interessante a utilização dos dois métodos de análise.

#### **1.4.4. Manejo reprodutivo**

A reprodução de peixes migradores, os quais necessitam da indução hormonal para desovem em ambientes controlados, foi definida por Zaniboni-Filho e Nuñez (2004) da seguinte forma:

1) Reprodução por extrusão: após a indução hormonal, os óvulos são retirados da fêmea através de pressão abdominal; o mesmo procedimento é realizado para a retirada do sêmen no macho; em seguida ambos os gametas são misturados para fertilização.

2) Reprodução seminatural: após a indução hormonal, os reprodutores são colocados dentro de um tanque, sendo os óvulos fertilizados pelos machos dentro deste.

Atualmente, os laboratórios de reprodução de peixes migradores de água doce do Brasil utilizam, quase na totalidade, a reprodução por extrusão (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004). No entanto, este sistema tem apresentado menor eficiência reprodutiva e maior mortalidade, como se pode observar nos trabalhos de Sirol *et al.* (2007) para na *P. mesopotamicus*, e Reynalte *et al.* (2002) para *Leporinus macrocephalus*. Esta menor eficiência reprodutiva, segundo Harvey e Carolsfeld (1993), pode ser devido ao estresse, pois as condições estressantes no manejo reprodutivo direcionam a energia preferencialmente para o retorno da homeostase.

Devido a menor eficiência reprodutiva, o sistema seminatural pode proporcionar uma seleção não intencional dos reprodutores, por exemplo, favorecer que os indivíduos mais tolerantes ao estresse tenham uma maior chance de se reproduzir. Ainda, tende a

ocasionar uma seleção direcionada dos reprodutores no processo reprodutivo (Sirol e Britto, 2006). Estes dois aspectos podem comprometer a variabilidade genética.

A fim de aumentar a probabilidade de fertilização, muitas pisciculturas utilizam na reprodução por extrusão a mistura de sêmen de vários machos (*pool* de sêmen) para fertilizar os óvulos de uma fêmea. Entretanto, neste procedimento possivelmente exista uma competição dos espermatozóides (Bekkevold *et al.*, 2002; Vladoic *et al.*, 2002), proporcionando que um número desigual de espermatozóides contribua na formação da progênie, o que segundo Ciereszko *et al.* (2000), pode não ser eficiente para a manutenção da variabilidade genética na progênie.

A reprodução seminatural empregada no Brasil apresenta grande mão-de-obra e dificuldade de manejo, pois os ovos deste sistema têm que ser transferidos do tanque para as incubadoras (Harvey e Carolsfeld, 1993; Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004). A fim de reduzir estes entraves, Sirol *et al.* (2007) preconizam que o sistema reprodutivo seminatural apresente as seguintes características:

- 1) Tanque circular e de alvenaria;
- 2) Fluxo de água constante;
- 3) Tubulação na porção central do fundo do tanque ligando este a uma incubadora coletora dos ovos;
- 4) Fluxo de água em sentido contrário em cada raio do tanque para facilitar o escoamento dos ovos do centro do tanque para uma incubadora.

Nas fotos das Figuras 1, 2 e 3 é possível observar os detalhes dos tanques, do sistema entrada de água e detalhes da incubadora coletora.



Figura 1 – Tanques de reprodução seminatural.  
Fonte: Duke Energy Internacional.



Figura 2 – Tanque de reprodução seminatural.  
Fonte: Duke Energy Internacional.



Figura 3 – Incubadora coletora.  
Fonte: Duke Energy.

#### 1.4.4.1. Auxílio dos marcadores moleculares

O monitoramento genético através dos marcadores moleculares pode permitir o controle a endogamia e minimizar a redução da variabilidade genética e, portanto, é uma ferramenta que pode auxiliar no manejo reprodutivo.

Um exemplo de como os marcadores podem auxiliar o manejo reprodutivo, é a utilização destes na reprodução pelo processo de mínimo parentesco (*Minimal Kinship* – MK), o qual pode ser mais eficiente na preservação da variabilidade genética, que o método aleatório, como se pode observar nos trabalhos de Doyle *et al.* (2001) e Sekino *et al.* (2004). Estes autores encontraram maior variabilidade genética por acasalamentos utilizando o processo MK em comparação com acasalamentos aleatórios, para as espécies *Pagurus major* e *Paralichthys olivaceus*, respectivamente. A eficiência da seleção MK

deve-se ao fato de reduzir a possibilidade de acasalamentos entre indivíduos aparentados.

### 1.5. Referências

- Agência Estadual de Notícias. (2007), Disponível em <http://www.agenciadenoticias.pr.gov.br>.
- Agostinho, A.A. and Gomes, L.C. (2006), O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. In: Nogueira, M.G.; Henry, R. and Jorcin, A. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. São Carlos: RiMA. pp. 23-55.
- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C. and Suzuki, H.I. (2003), Migratory fish of upper Paraná river basin, Brazil. In: Carolsfed, J.; Harvey, B.; Baer and A.; Ross, C. (Ed.). *Migratory fishes of South America*. Victoria: Biology Social Importance and Conservation Status. pp. 19-99.
- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Fernandes, D.R. and Suzuki, H.I. (2002), Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. *River Research and Applications*, **18**, 299-306.
- Agostinho, A.A.; Thomaz, S.M. and Gomes, L.C. (2005), Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, **1** : (1), 70-78.
- Alam, M.S. and Islam, M.S. (2005), Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, **246** : (1-4), 151-160.
- Alarcón, J.A.; Magoula, A.; Georgakopoulo, T.; Zouros, E. and Alvarez, M.C. (2004), Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **230**, 65-80.
- Alberts, B.; Johnson, A. and Walter, P. (1997), *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas. 1294 pp.
- Allendorf, F.W. and Phelps, S.R. (1980), Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, **109**, 537-543.
- Allendorf, F.W.; Ryman, N. and Utter, F. (1987), Loss of genetic variation in hatchery stocks. In: Ryman, N. and Utter, F. (Ed.). *Population Genetics and Fisheries Management*. Seattle: University of Washington Press. 420 pp.
- Almeida, F.S.; Sodr e, L.M.K. and Contel, E.P.B. (2003), Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiet e and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, **26** : (3), 301-305.
- Ayllon, F.; Martinez, J.L. and Garcia-Vazquez, E. (2006), Loss of regional population structure in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following stocking. *ICES Journal of Marine Science*, **63**, 1269-1273.
- Barroso, R.M, Hilsdorf, A.W.S; Moreira, H.L.M.; Cabello, P.H. and Traub-Cseko, Y. (2005), Genetic diversity of wild and cultured populations of Brycon opalinus (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. *Aquaculture*, **247**, 51-65.
- B artfai, R.; Egedi, S.; Yue, G.H.; Kov acs, B.; Urb anyi, B.; Tam as, G.; Horv ath, L. and Orb an, L. (2003), Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, **219**, 157-167.
- Bartron, M.L. and Scribner, K.T. (2004), Temporal comparisons of genetic diversity in Lake Michigan steelhead, *Oncorhynchus mykiss*, populations: effects of hatchery supplementation. *Environmental Biology of Fishes*, **69**, 395-407.

- Bekkevold, D.; Hansen, M.M. and Loeschcke, V. (2002), Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua*, L.). *Molecular Ecology*, **11** : (1), 91–102.
- Borowsky, R.L. (2001), Estimating nucleotide diversity from Random Amplified Polymorphic DNA and Amplified Fragment Length Polymorphism data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18** : (1), 143-148.
- Britto, S.G.C.; Sirol, R.N.; Vianna, N.C.; Jardim, S.M.; Santos, J.C. and Pelisari, E. (2003), *Peixes do rio Paranapanema*. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema. 112 pp.
- Buckup, P.A. and Menezes, N.A. (2003), Catálogo dos peixes marinhos e de água doce do Brasil, 2<sup>nd</sup> ed. Disponível em <http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo>.
- Castagnolli, N. and Donaldson, M.E. (1981), Induced ovulation and rearing of the pacu (*Colossoma mitrei*). *Aquaculture*, **25**: (3-4), 275-279.
- Castro, R.M.C.; Casatti, L.; Santos, H.F.; Ferreira, K.M.; Ribeiro, A.C.; Benine, R.C.; Dardis, G.Z.; Melo, A.L.A.; Stopiglia, R.; Abreu, T. X.; Bockmann, F.A.; Carvalho, M.; Gibran, F.Z. and Lima, F.C. (2003), Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio paranapanema, sudeste e sul do brasil. *Biota Neotropica*, **3** : (1), 1-14.
- Cena, C.J.; Morgan, G.E.; Malette, M.D. and Heath, D.D. (2006), Inbreeding, outbreeding and environmental effects on genetic diversity in 46 walleye (*Sander vitreus*) populations. *Molecular Ecology*, **15**, 303-320.
- Ciereszko, A.; Glogowski, J. and Dabrowski, K. (2000), Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. (Ed.). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society. pp. 20-48.
- Dinesh, K.R.; Lim, T.M.; Chua, K.L.; Chan, W.K. and Phang, V.P. (1993), RAPD analysis: an efficient of DNA fingerprinting in fisher. *Zoological Science*, **10**, 849-854.
- Doyle, R.W.; Perez-Enriquez, R.; Takagi, M. and Taniguchi, N. (2001), Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. *Genética*, **111**, 291-304.
- Duke Energy International (2007), *Meio ambiente aquático*. Disponível em <http://www.duke-energy.com.br>.
- Elliott, N.G. and Reilly, A. (2003), Likelihood of bottleneck event in the history of the Australian population of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **215**, 31-44.
- Falconer, D.S. (1987), *Introdução a genética quantitativa*. Viçosa: UFV. pp. 279.
- FAO. (2004), State of World Fisheries and Aquaculture. Roma: FAO Fisheries Department. pp.153.
- Ferreira, M.E. and Grattapaglia, D. (1998), *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3<sup>rd</sup> ed. Brasília: EMBRAPA. pp. 220.
- Frost, L.A.; Evans, B.S. and Jerry, D.R. (2006), Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, **261**, 1056-1064.
- Furuya, W.M. (2001), Espécies nativas. In: Moreira, H.L.M.; Vargas, L.; Ribeiro, R.P. and Zimmermann, S. (Ed.). *Fundamentos da moderna aqüicultura*. Canoas: ULBRA. pp. 83-90.
- Guttman, S.I. and Berg, D. (1998), Changes in the genetic diversity of aquatic organisms in the great lakes: causes and consequences. *Setac News*, pp. 23-24.
- Hara, M. and Sekino, M. (2003), Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture*, **217**, 107-114.
- Harvey, B. and Carolsfeld, J. (1993), Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: International Development Research Center. pp. 144.

- Hatanaka, T. and Galetti Jr., P.M. (2003), RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*, **26** : (1), 19-25.
- Hatanaka, T.; Henrique-Silva, F. and Galetti Jr., P.M. (2006), Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, **126**, 513-517.
- Hauser, L.; Adcock, G.J.; Smith, P.J.; Ramírez, J.H. and Carvalho, G.R. (2002), Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *PNAS*, **99** : (18), 11742-11747.
- Hilsdorf, A.W.; S.; Resende, E.K. and Marques, D.K.S. (2006), *Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas*. Corumbá: Embrapa Pantanal. pp. 44.
- Kang, J.H.; Noh, J.K.; Kim, J.H.; Lee, J.H.; Kim, H.C.; Kim, K.K.; Kim, B.S. and Lee, W.J. (2006), Genetic relationship between broodstocks of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. *Aquaculture Research*, **37**, 701-707.
- Koljonen, M.L.; Tähtinen, J.; Säisä, M. and Koskiniemi, J. (2002), Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture*, **212**, 69-92.
- Leuzzi, M.S.P.; Almeida, F.S.; Orsi, M.L. and Sodr , M.L.K. (2004), Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs of the River Paranapanema. *Genetics and Molecular Biology*, **27**, 355-362.
- Li, Q.; Park, C.; Endo, T. and Kijima, A. (2004), Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Aquaculture*, **235**, 207-222.
- Lima, R.V.A.; Bernardino, G.; Val-Sella, M.V.; Fava de Moraes, F.; Schemy, R.A. and Borella, M.I. (1991), Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. *Boletim T cnico do CEPTA*, **4** : (1), 1-46.
- Liu, Y.; Chen, S. and Li, B. (2005), Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. *Aquaculture*, **243**, 103-111.
- Lundrigan, T.A.; Reist, J.D. and Ferguson, M.M. (2005), Microsatellite genetic variation within and among Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America. *Aquaculture*, **244**, 63-75.
- Lynch, M. and Milligan, B.G. (1994), Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**, 91-99.
- Macpherson, J.M.; Eckstein, P.E.; Scoles, G.J. and Gajaghar, A.A. (1993), Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cycles, and effects of primer and DNA concentration. *Molecular and Cellular Probes*, **7**, 293-299.
- Mia, M.Y.; Taggart, J.B.; Gilmour, A.E.; Gheyas, A.A.; Das, T.K.; Kohinoora, H.M.; Rahman, M.A.; Sattar, M.A.; Hussain, M.G.; Mazid, M.A.; Penman, D.J. and McAndrew, B.J. (2005), Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. *Aquaculture*, **247** : (1-4), 267-273.
- Milach, S. (1998), Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach. pp. 17-28.
- Ministério do Meio Ambiente. (2007), *Biodiversidade e Florestas: Espécies ameaçadas*. Disponível em <http://www.mma.gov.br>.

- Moreira, H.L.M. (2001), Genética e melhoramento de peixes. In: Moreira, H.L.M.; Vargas, L.; Ribeiro, R.P. and Zimmermann, S. (Ed.). *Fundamentos da moderna aquicultura*. Canoas: ULBRA. pp. 135-147.
- Moreira, H.L.M.; Zimmermann, S.; Ribeiro, R.P.; Bastos, R.G.; Vargas, L.D. and Povh, J.A. (2003), The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. In: World Aquaculture, Salvador. *Proceedings...* Salvador: INVE. pp. 460.
- Mullis, K.B. (1990), The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, **262**, 36-42.
- Nakatani, K.; Agostinho, A.A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C. and Pavanelli, C.S. (2001), Ovos e larvas de peixes de água doce. Maringá: EDUEM. pp. 378.
- Neville, H.; Isaak, D.; Thurow, R.; Dunham, J. and Rieman, B. (2007), Microsatellite variation reveals weak genetic structure and retention of genetic variability in threatened Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) within a Snake River watershed. *Conserv Genet*, **8**, 133-147.
- Oliveira, A.V.; Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.P.; Pavanelli, C.S.; Júlio Jr, H.F. and Panarari, R.S. (2002), Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. *Genetica*, **115** : (3), 259-257.
- Ortega-Villaizán Romo, M.M.; Aritaki, M. and Taniguchi, N. (2006), Pedigree analysis of recaptured fish in the stock enhancement program of spotted halibut *Verasper variegates*. *Fisheries Science*, **72**, 48-52.
- Ortega-Villaizán Romo, M.M.; Suzuki, S.; Ikeda, M.; Nakajima, M. and Taniguchi, N. (2005), Monitoring of the genetic variability of the hatchery and recaptured fish in the stock enhancement program of the rare species barfin flounder *Verasper moseri*. *Fisheries Science*, **71**, 1120-1130.
- Pérez, T.; Albornoz, J. and Domínguez, A. (1998), An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, **7**, 1347-1357.
- Porta, J.; Porta, J.M.; Matínez-Rodríguez, G. and Alvarez, M.C. (2006), Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture*, **256**, 159-166.
- Porta, J.; Porta, J.M.; Matínez-Rodríguez, G. and Alvarez, M.C. (2006b), Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, **251**, 46-55.
- Povh, J.A.; Ribeiro, R.P.; Sirol, R.N.; Mangolin, C.A.; Gasparino, E.; Barrero, N.M.L.; Gomes, P.C.; Streit Jr, D.P. and Vargas, L. (2006), Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. In: AquaCiência, 2., Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquabio. CD-ROM.
- Regitano, L.C.A. (2001), Introdução à análise de marcadores moleculares. In: Regitano, L.C.A. and Coutinho, L.L. (Ed.). *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: EMBRAPA. pp. 25-39.
- Regitano, L.C.A. (2001b), Protocolo de Análise de Marcadores Microsatélites. In: Regitano, L.C.A. and Coutinho, L.L. (Ed.). *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. Brasília: EMBRAPA. pp. 195-215.
- Reynalte, D.A.T.; Esquivel, B.M.; Esquivel, J.R. and Zaniboni-Filho, E. (2002), Reproducción inducida del piauçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello e Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, **28** : (1), 11-18.
- Rieseberg, L.H. (1996), Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology*, **5**, 99-105.

- Romagosa, E. and Narahara, M.Y. (2002), Desenvolvimento e diferenciação dos ovócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum*, **24** : (2), 433-438.
- Romana-Eguia, M.R.R.; Ikeda, M.; Basiao, Z.U. and Taniguchi, N. (2004), Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, Amsterdam, **236** : (1-4), 131-150.
- Ryman, N. and Utter, F. (1987), *Population Genetics and Fishery Management*. Seattle: Univ. Washington Press.
- Ryman, N.; Utter, F. and Laikre, L. (1995), Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Reviews Fish Biology and Fisheries*, **5**, 417-446.
- Saura, M.; Caballero, P.; Caballero, A. and Morán, P. (2006), Genetic variation in restored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations in the Ulla and Lérez rivers, Galicia, Spain. *ICES Journal of Marine Science*, **63**, 1290-1296.
- Sekino, M.; Hara, M. and Taniguchi, N. (2002), Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **213**, 101-122.
- Sekino, M.; Saitoh, K.; Yamada, T.; Hara, M. and Yamashita, Y. (2005), Genetic tagging of stocking Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on polymorphic DNA markers. *Aquaculture*, **244**, 49-61.
- Sekino, M.; Sugaya, T.; Hara, M. and Taniguchi, N. (2004), Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **233**, 163-172.
- Shikano, T. and Taniguchi, N. (2002), Heterosis for neonatal survival in the guppy. *Journal of Fish Biology*, **60**, 715-725.
- Shikano, T. and Taniguchi, N. (2002b), Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Poecilia reticulata*) as a fish model. *Aquaculture*, **204**, 271-281.
- Sirol, R.N. and Britto, S.G. (2006), Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: Nogueira M.G.; Henry, R. and Jorcin, A. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. São Carlos: RiMA. pp. 275-284.
- Sirol, R.N.; Streit Jr., D.P.; Povh, J.A. and Ribeiro, R.P. (2007), *Sistema de reprodução seminatural* (Prelo).
- Sofia, S.H.; Silva, C.R.M.; Galindo, B.A.; Almeida, F.S.; Sodré, L.M.K. and Martinez, C.B.R. (2006), Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia*, **553**, 245-254.
- Sønstebø, J.H.; Borgstrøm, R. and Heun, M. (2007), Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. *Conserv Genet*, **8**, 33-44.
- Taniguchi, N. (2003), Genetic factors in broodstock management for seed production. *Reviews Fish Biology and Fisheries*, **13**, 175-185.
- Triantafyllidis, A.; Abatzopoulos, T.J.; Leonardos, J. and Guyomard, R. (2002), Microsatellite analysis of the genetic population structure of native and translocated Aristotle's catfish (*Silurus aristotelis*). *Aquat. Living Resour.* **15**, 351-359.
- Urbinati, E.C. and Gonçalves, F.D. (2005), *Pacu (Piaractus mesopotamicus)*. In: Baldissotto, B. and Gomes, L.C. (Ed.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM. pp. 225-246.
- Vasemägi, A.; Cross, R.; Paaver, T.; Koljonen, M.L. and Nilsson, J. (2005), Extensive immigration from compensatory hatchery releases into wild Atlantic salmon population in the Baltic sea: spatio-temporal analysis over 18 years. *Heredity*, **95**, 76-83.

- Vladic, T.V.; Afzelius, B.A. and Bronnikov, G.E. (2002), Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. *Biology Reproduction*, **66**, 98–105.
- Vrijenhoek, R.C. (1998), Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, **53** : (Suppl. A), 394-412.
- Wang, S., Hard, J. J., and Utter, F. (2002), Salmonid inbreeding: a review. *Reviews in Fisheries Biology and Fisheries*, **11**, 301-319.
- Was, A. and Wenne, R. (2002), Genetic differentiation in hatchery and wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci. *Aquaculture*, **204**, 493-506.
- Wasko, A.P. and Galetti Jr, P.M. (2002), RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, **474**, 131-137.
- Wasko, A.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Senhorini, J.A. and Foresti, F. (2004), Genetic monitoring of the Amazonian fish matrincha~ (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology*, **20**, 48–52.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990), Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 7213-7218.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990), DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18** : (22), 6531-6535.
- Wright, S. (1978), *Evolution and genetics of populations*. Chicago: University of Chicago Press. pp. 511.
- Yan, J.; Liu, S.; Sun, Y.; Zhang, C.; Luo, K. and Liu, Y (2005), RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) X common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, **243** : (1-4), 49-60.
- Yokota, M.; Harada, Y. and Iizuka, M. (2003), Genetic drift in a hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. *Fisheries Science*, **69**, 101-109.
- Zaniboni-Filho, E and Nuñez, A.P.O. (2004), Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M. and Castagnolli, N. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt. pp. 45-73.
- Zelenina, D.A.; Khrustaleva, A.M. and Volkov, A.A. (2006), Comparative Study of the Population Structure and Population Assignment of Sockeye Salmon *Oncorhynchus nerka* from West Kamchatka Based on RAPD–PCR and Microsatellite Polymorphism. *Animal Genetic*, **42** : (5), 693-704.

## II. OBJETIVOS GERAIS

Determinar a diversidade e a diferenciação genética de uma população de *Piaractus mesopotamicus* do médio rio Paranapanema e de um estoque pertencente a uma piscicultura de Salto Grande, São Paulo, a qual tem como objetivo o repovoamento, através do marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Comparar alguns aspectos reprodutivos e a variabilidade genética nas progênes de *P. mesopotamicus* obtidas pelos sistemas por extrusão e seminatural, com o emprego do marcador molecular RAPD.

Analisar a contribuição reprodutiva e a diversidade genética da progênie de *P. mesopotamicus* obtida pelo sistema seminatural, usando o marcador molecular microssatélite.

**III. COMPARAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES  
NATIVA E CULTIVADA DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

**(a ser enviado para publicação)**

**Periódico: *Genetics and Molecular Biology***

**“Genetic comparison between wild and cultivated pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations”**

**Comparação genética entre as populações nativa e cultivada de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**  
**[Genetic comparison between wild and cultivated pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations]**

## RESUMO

O monitoramento da variabilidade genética dos estoques de reprodutores é fundamental para conservação genética através de práticas como o repovoamento dos rios. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi determinar a diversidade genética de um estoque de reprodutores de *Piaractus mesopotamicus* empregados em programas de repovoamento e de uma população capturada do rio Paranapanema. A diversidade genética de 30 peixes capturados no médio rio Paranapanema e de 29 reprodutores estoque de uma piscicultura, localizada no município de Salto Grande, São Paulo, foi analisada pelo marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Os resultados mostraram uma menor variabilidade genética do estoque em relação à população, promovido pelo efeito fundador deste estoque e/ou devido a diferente origem dos peixes que formaram o estoque. Contudo, a moderada diferenciação genética e o alto Nm obtidos, indicam que as populações e o estoque apresentaram um *pool* genético semelhante.

**Palavras-chave:** Peixe, RAPD, Repovoamento, Rio Paranapanema, Variabilidade genética

## ABSTRACT

The monitoring of broodstocks genetic variability is fundamental for genetic conservation through practices as rivers restocking. So, the objective of the present study was to determine the genetic diversity of *Piaractus mesopotamicus* broodstock used in restocking programs, and captured population of the Paranapanema River. The genetic diversity of 30 fish captured in the middle Paranapanema River and of 29 broodstocks of fish farming, located in Salto Grande, São Paulo, was analyzed by molecular marker RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). The results showed a lower stock genetic variability in relation to population, promoted by stock founder effect and/or due to different fish origin that formed the stock. However, the moderate genetic differentiation and high Nm obtained indicate that populations and the presented a similar genetic pool.

**Key words:** Fish, RAPD, Stocking, Paranapanema River, Genetic variability

## INTRODUÇÃO

O rio Paranapanema, um dos mais importantes afluentes da margem esquerda do rio Paraná, nasce na vertente ocidental da serra da Paranapiacaba (48°15'W 24°16'S), no município de Capão Bonito, Estado de São Paulo, e está inserido na bacia do Alto Paraná. Este rio possui uma extensão de aproximadamente 600 km, dos quais cerca de 330 km forma a divisa natural entre os Estados de São Paulo e Paraná.

Embora o rio Paranapanema apresente um total de 155 de espécies de peixes catalogadas, atualmente muito destas são raramente encontradas, entre elas, pode-se citar o *Piaractus mesopotamicus* (Britto *et al.*, 2003), também conhecido como pacu, caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu. De fato, nos últimos 50 anos a ictiofauna do rio Paranapanema vem sofrendo grandes impactos devido à interferência humana, com a construção de barragem hidroelétrica (10 barragens), poluição dos rios e outras mudanças no ambiente. Estes fatores são os responsáveis pela redução, e muitas vezes o desaparecimento de espécies de peixes (Leuzzi *et al.*, 2004).

Embora, segundo o IBAMA, qualquer entidade envolvida com o meio ambiente, como a construção de barragem hidroelétrica, deve adotar métodos de proteção e conservação dos recursos biológicos aquáticos, as estratégias e ações para a melhoria dos recursos naturais têm sido em geral, realizadas sem respaldo científico (Agostinho *et al.*, 2005).

Como metodologia para avaliação das ações de recuperação do meio ambiente, os marcadores moleculares *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e microssatélite, são ferramentas bastante eficientes para análise da variabilidade genética e, portanto, podem ser utilizadas na avaliação de práticas de conservação genética, como por exemplo, do repovoamento (Povh *et al.*, 2006). No entanto, o marcador microssatélite muitas vezes não é acessível para várias espécies nativas do Brasil.

Embora existam alguns poucos *primers* de microssatélite descrito para a espécie *P. mesopotamicus* (Calcagnotto *et al.*, 2001), estes não têm revelado um grande número de alelos. Portanto, atualmente o marcador RAPD é uma ferramenta importante para análise da variabilidade genética desta espécie.

Devido ao elevado valor comercial, adaptação à alimentação artificial e também pela facilidade de obtenção de larvas através de reprodução induzida (Furuya, 2001), o *P. mesopotamicus* tem sido muito utilizado no repovoamento dos rios como forma de mitigar e compensar a redução dos peixes resutante dos impactos ambientais.

Portanto, devido ao constante repovoamento do rio Paranapanema e a falta de respaldo científico de tal prática, o objetivo do presente trabalho foi comparar a variabilidade genética de *P. mesopotamicus* coletados do médio rio Paranapanema e de um estoque de reprodutores de uma piscicultura de Salto Grande, São Paulo, a qual vem repovoando este rio, através do marcador molecular RAPD.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das amostras

Para obtenção das amostras proveniente dos animais no rio Paranapanema, capturou-se os peixes nas duas escadas para peixes, usadas como mecanismo de transposição das barragens, da empresa hidroelétrica Duke Energy International (*Geração Paranapanema*), localizadas nos reservatórios Canoas I e Canoas II, nos municípios de Cândido Mota (SP) e Palmital (SP), respectivamente (Figura 1), ambas da parte média do rio Paranapanema. As capturas foram realizadas em quatro períodos distintos entre janeiro e fevereiro de 2006.

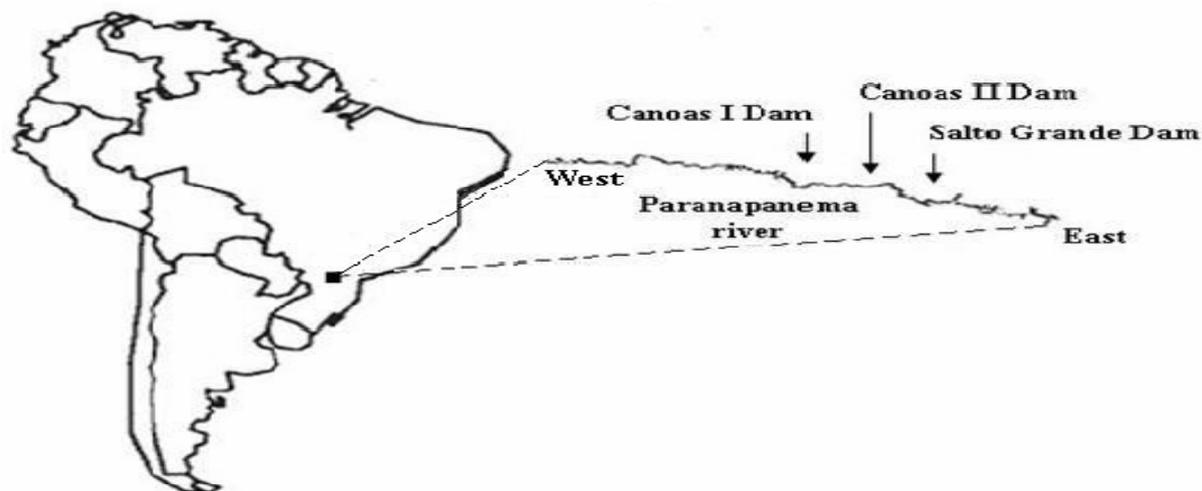


Figura 1 – Mapa do rio Paranapanema detalhando os locais de captura de *P. mesopotamicus* e da localização do estoque de reprodutores em Salto Grande-SP.

As amostras dos reprodutores utilizados para a produção de juvenis com objetivo de repovoamento foram obtidas dos animais estocados em uma piscicultura no município de Salto Grande-SP (Figura 1). Pesavam em média 2,5 kg, apresentavam aproximadamente quatro anos de idade e pertencia a um lote de 250 exemplares formados a partir de peixes capturados do rio Paraná.

## **Extração de DNA**

As amostras de DNA foram obtidas de fragmentos de nadadeira caudal de 30 peixes capturados do ambiente e 29 reprodutores estoque, utilizando a metodologia descrita por Bardakci e Skibinski (1994), modificado por Povh *et al.* (2005). Os fragmentos de nadadeiras, com aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, foram colocados em microtubos, aos quais foram adicionados 550 µL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 1% de SDS) e 7 µL de proteinase K (200 µg/mL). Em seguida, este material foi incubado em banho-maria a 50°C *overnight*. Posteriormente, o DNA foi purificado com duas extrações com fenol-clorofórmio e posteriormente uma com clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com duas vezes e meia de etanol absoluto e um décimo do volume recuperado de acetato de sódio e incubado por uma hora a -20°C. Após, este foi precipitado foi ressuscitado em 40 µL de tampão TE (10 mM de Tris e 1 mM de EDTA), sendo em seguida tratado com 6 µL de RNase (30 µg/mL) em banho-maria a 37°C por uma hora.

O DNA foi quantificado por comparação com concentrações de DNA fago λ conhecidas em gel de agarose 1%, revelado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi conduzida com tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA) por uma hora a 70 volts. A imagem foi capturada por um sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

## **Amplificação dos fragmentos RAPD**

O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 15 µL, no qual se utilizou tampão 1X Tris-KCl, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,46 µM de *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de *Taq* DNA Polimerase e 10 ng de DNA. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida foram realizados 40 ciclos, cada um consistindo de: um minuto de desnaturação a 94°C, um minuto e trinta segundo de anelamento a 40°C e dois minutos de extensão a 72°C, após realizou-se uma extensão final a 72°C por sete minutos. As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”.

Foram avaliados 60 diferentes oligonucleotídeos de 10 bases do Kit OPA, OPX e OPW da Operon (Operon Technologies Ltd.), dos quais foram selecionados somente os que reproduziram bandas consistentes.

A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 0,5X (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de EDTA) por quatro horas a 70 volts. A imagem foi capturada por um sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

## **Análise estatística**

O tamanho dos fragmentos obtidos com as amplificações foi estimado por comparação com o padrão ladder 100 pb.

A variabilidade genética foi determinada pelo Índice de diversidade genética de Shannon e pela porcentagem de fragmentos polimórficos através do programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

A diferenciação genética entre os indivíduos da população e do estoque foi determinada pela diversidade genética de Nei's (1973) ( $G_{st}$ ), através do programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Para a determinação do nível de diferenciação estabeleceu-se a definição proposta por Wright (1978), em que valores entre 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25; e maior que 0,25; indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética, respectivamente.

O fluxo gênico foi estimado através do número de migrantes por geração ( $N_m$ ). Estas análises foram obtidas com o programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). A significância do  $G_{st}$  foi analisada pelo teste  $\chi^2$ .

A similaridade genética foi obtida com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard. Utilizou-se para esta análise o programa NTSYS 1.7 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 1989).

## **RESULTADOS**

### **Variabilidade e similaridade genética**

Os 14 *primers* selecionados para a análise da variabilidade genética da população e do estoque de *P. mesopotamicus* geraram 120 fragmentos, com tamanho das bandas entre 300 e 2750 pb. O número de fragmentos por *primer* variou de cinco a 14 (Tabela 1).

Os fragmentos 8, 13, 25, 26, 37, 60, 73 e 91, obtidos para os *primers*, na mesma ordem, OPA01, OPA10, OPA16, OPA16, OPW01, OPW19, OPW02 e OPW08, apresentaram grande diferenciação entre os indivíduos da população e do estoque, sendo que quatro destes fragmentos tinham maior frequência na população e o restante no estoque. Os fragmentos de maior e menor frequência na população foram 96,3% e 25%, respectivamente, e no estoque 82,8% e 7,1%, respectivamente.

Alguns fragmentos foram exclusivos para os indivíduos da população (fragmento 17/*primer* OPA16, 27/*primer* OPA16 e 40/*primer* OPX01) e outros para os indivíduos do estoque (fragmento 43/*primer* OPX01 e 44/*primer* OPX01). Contudo, estes fragmentos

apresentaram baixa frequência entre os indivíduos, variando de 13% a 28%, com exceção do fragmento 44 que apresentou alta frequência com 76,6%.

Tabela 1 - Seqüências de nucleotídeos dos *primers*, número e tamanho dos fragmentos amplificados obtidos para a população e o estoque de *P. mesopotamicus*

<i>Primers</i>	Seqüência de nucleotídeos	Nº de fragmentos	Tamanho dos fragmentos (pb)
OPA01	CAG GCC CTT C	8	350 – 1800
OPA02	TGC CGA GCT G	7	300 – 1300
OPA04	AAT CGG GCT G	8	370 – 1450
OPA10	GTG ATC GCA G	5	700 – 1500
OPA16	AGC CAG CGA A	14	300 – 2600
OPW01	CTC AGT GTC C	9	400 – 1780
OPW02	ACC CCG CCA A	8	600 – 2500
OPW03	GTC CGG AGT G	11	620 – 2200
OPW04	CAG AAG CGG A	10	530 – 2150
OPW08	GAC TGC CTC T	8	500 – 1550
OPW13	CAC AGC GAC A	6	320 – 2000
OPW19	CAA AGC GCT C	12	380 – 2750
OPX1	CTG GGC ACG A	8	520 – 1850
OPX3	TGG CGC AGT G	6	650 – 1820
Total	–	120	300 – 2750

O índice de diversidade genética de Shannon e o polimorfismo foram superiores na população, com valores de 0,345 e 61,17%, respectivamente, em relação ao estoque, com valores de 0,289 e 56,53%, respectivamente (Tabela 2). Desta forma, para ambos os parâmetros avaliados, a variabilidade genética foi superior na população em relação ao estoque de *P. mesopotamicus*.

Tabela 2 – Índice de diversidade genética de Shannon e porcentagem de fragmentos polimórficos obtidos para a população e o estoque de *P. mesopotamicus*

Populações	Índice de Shanonn	Polimorfismo (%)
Nativa (n = 30)	0,345	61,17
Estoque (n = 29)	0,289	56,36

A similaridade genética, com base no coeficiente de Jaccard, foi maior entre os indivíduos do estoque (0,840) em comparação aos indivíduos da população (0,779), sugerindo uma maior proximidade genética nos primeiros.

### Diferenciação genética

A diversidade genética ( $G_{st}$ ) entre a população e o estoque foi de 0,0896, valor que sugere moderada diferenciação genética segundo a definição de Wright (1978) (Tabela 3).

O número de migrantes por geração foi de 5,080, indicando que fluxo gênico entre a população e o estoque é alto, o que sugere que estes possuem um *pool* genético semelhante (Tabela 3).

Tabela 3 – Diversidade genética ( $G_{st}$ ) e o número de migrantes por geração ( $N_m$ ) obtidos entre a população e o estoque de *P. mesopotamicus*.

Par de populações	$G_{st}$		$N_m$
	Teta	$\chi^2$	
Natural x Estoque	0,0896*	10,573	5,080

\* Significativo ao nível de 5%.

## DISCUSSÃO

### Variabilidade genética

O polimorfismo observado para a população (61,17%) e o estoque (56,36%) de *P. mesopotamicus* não difere muito do encontrado para outras espécies de peixe de água doce do Brasil. Almeida *et al.* (2003), por exemplo, encontraram para *Pimelodus maculatus* no rio

Paranapanema valores de polimorfismo entre 54,81 a 61,51%. Contudo, Leuzzi *et al.* (2004) encontraram um maior contraste entre as populações de *Astyanax altiparanae* da parte inferior do rio Paranapanema (42,64%) em relação às populações da parte média e alta deste rio (75,0%).

Ainda, os valores de variabilidade genética obtidos para a população e o estoque, no presente trabalho são próximos ao encontrado por Sofia *et al.* (2006) para as populações de *Astyanax scabripinnis* coletadas do rio Cambé, Londrina-PR, com valores de polimorfismo entre 63,5 a 64,8%, valores que segundo os autores, justificaria a tolerância desta espécie para as atuais condições físico-químicas do rio, devido sua grande poluição.

Embora possa ter ocorrido uma redução da variabilidade genética na formação do estoque de reprodutores, é possível que esta menor variabilidade em relação à população seja devido a diferente origem destes reprodutores, pois estes foram formados por peixes capturados no rio Paraná. Isso porque, em geral, a variabilidade genética é bastante variável, dependendo da espécie, do rio, da localização no rio e das pressões existentes em cada ambiente.

Outra hipótese quanto a menor variabilidade genética encontrada no estoque em relação à população, consiste nas várias implicações no manejo reprodutivo formador do estoque de reprodutores, como observaram Was e Wenne (2002) para *Salmo trutta*; Alarcón *et al.* (2004) para *Sparus aurata*; e Lundrigan *et al.* (2005) para *Salvelinus alpinus*. Estas implicações podem em apenas uma geração promover uma redução significativa da variabilidade genética, como observaram Porta *et al.* (2006) para a espécie *Solea senegalensis*, os quais ainda constataram como consequência da redução da variabilidade genética uma diminuição do número de desovas e produção de ovos.

O acasalamento entre indivíduos aparentados (endogamia) e pequeno número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ), são os principais responsáveis pela perda da diversidade genética em muitos estoques de reprodutores (Sekino *et al.*, 2002; Hara e Sekino, 2003, Liu *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2006; Ortega- Villaizán Romo *et al.*, 2006). Comumente os estoques de reprodutores acabam sendo formados com a utilização de um ou poucos casais, devido a alta prolificidade dos peixes, o que promove um gargalo genético (efeito *bottleneck*), levando a uma redução da variabilidade genética (Povh *et al.*, 2006).

Ainda, é comum quando os reprodutores são formados a partir de peixes produzidos na própria piscicultura, a ocorrência de acasalamento entre indivíduos mais aparentados geneticamente, conduzindo a um aumento da homozigose e, conseqüentemente, da variabilidade genética (Moreira, 2003). Portanto, a maior similaridade genética encontrada no

estoque (0,840) em relação à população (0,779) sugere que os reprodutores do estoque foram formados por indivíduos mais aparentados geneticamente, o que contribuindo para a redução da variabilidade genética.

A utilização de poucos reprodutores (seis a oito por geração) e também o acasalamento entre indivíduos aparentados foram relatados por Wasko *et al.* (2004) como os fatores responsáveis por promover uma diminuição da variabilidade genética dos estoques de reprodutores de matrinhã (*Brycon cephalus*) do Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais (CEPTA) em relação a uma população nativa do rio Amazonas.

A frequência dos oito fragmentos discrepantes tanto para a população quanto para o estoque, pode indicar que o número de amostragem não foi representativo em ambos os casos. Entretanto, a maior amplitude entre os fragmentos de maior e menor frequência dos indivíduos do estoque em relação aos da população, sugere que existiu algum tipo de seleção. Esta pode ter sido promovida durante o manejo reprodutivo formador do estoque ou mesmo pela seleção natural, já que os reprodutores do estoque foram originados de peixes coletados no rio Paraná. O fato de três fragmentos terem sido exclusivos para a população e dois para o estoque corrobora esta idéia, principalmente pelo fato destes apresentar baixa frequência entre os indivíduos.

### **Diferenciação genética**

Com base nas definições de diferenciação genética proposta por Wright (1978), o valor de  $G_{st}$  obtido entre a população e o estoque de 0,0896 indica apenas uma moderada diferenciação genética. Esta diferenciação pode ser devido ao alto número de migrantes por geração ( $Nm$ ) encontrada entre a população e o estoque (5,080), provavelmente devido ao grande fluxo gênico, indicando um *pool* genético semelhante. Ainda, esta pequena diferenciação genética existente diminui a probabilidade de que genes importantes, como para a adaptação as condições ambientais locais, possam ser perdidos com o repovoamento (Almeida *et al.*, 2003; Leuzzi *et al.*, 2004).

Embora Leuzzi *et al.* (2004) tenham constatado moderada a elevada diferenciação genética entre populações de *Astyanax altiparanae* do rio Paranapanema (0,0895 a 0,2813), não esperavam o alto  $Nm$  (2,54) entre as populações dos reservatórios de Capivara e Jurumirim. Isso porque, segundo os autores, antes mesmo da primeira hidroelétrica ser construída, já existia uma barreira geográfica natural, a cachoeira de Salto Grande e, portanto, possivelmente os dois reservatórios tenham sido reabastecidos com alevinos de *A. altiparanae*.

Da mesma forma, o fato dos reprodutores estoque terem sido formados a partir de indivíduos provenientes do rio Paraná, e não do rio Paranapanema, o alto Nm entre os indivíduos da população e do estoque, sugere que os peixes coletados do rio Paranapanema podem, pelo menos em parte, serem oriundos de repovoamento. Esta hipótese pode ser corroborada por dados de repovoamento do rio Paranapanema que vem sendo realizada pelos estados de São Paulo (Duke Energy, 2007) e Paraná (Agência Estadual de Notícias, 2007) para algumas espécies, entre elas o pacu (*P. mesopotamicus*).

Devido ao impacto potencial que as espécies nativas têm sofrido, os estoques de reprodutores podem ser uma alternativa para a recuperação da diversidade genética, promovendo a manutenção dos recursos genéticos, principalmente quando existe risco de extinção (Koljonen *et al.*, 2002; Barroso *et al.*, 2005). Contudo, qualquer tentativa para reabilitar populações reduzidas depende de manter tão íntimo quanto possível a variabilidade genética da população selvagem com os peixes que serão liberados no ambiente, isso porque, segundo Vasemägi *et al.* (2005) e Sønstebø *et al.* (2007), a mistura da população nativa com peixes liberados no ambiente pode levar a perda da variabilidade genética e, conseqüentemente a perda de genes importantes para a adaptação local.

Desta forma o monitorando genético dos reprodutores, assim como dos peixes destinados ao repovoamento, é necessário para evitar perdas da variabilidade genética (Sirol e Britto, 2006) e, conseqüentemente da capacidade adaptativa de uma espécie (Saura *et al.*, 2006), pois segundo Wang *et al.* (2002), 10% de aumento na endogamia podem resultar em uma redução em aptidão de cerca de 3% a 15%.

No presente trabalho, a população de *P. mesopotamicus* apresentou maior variabilidade genética em relação aos do estoque. Contudo, a moderada diferenciação genética e o alto número de migrantes por geração, sugerem uma heterogeneidade pequena entre estes indivíduos da população e do estoque.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à empresa de geração de energia hidroelétrica Duke Energy Internacional pelo apoio ao presente trabalho.

## REFERÊNCIAS

- Agência Estadual de Notícias, <http://www.agenciadenoticias.pr.gov.br> (Março 12, 2007).
- Agostinho AA, Thomaz SM and Gomes LC (2005) Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade* 1(1):70-78.
- Alarcón JA, Magoula A, Georgakopoulo T, Zouros E and Alvarez MC (2004) Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 230:65-80.
- Almeida FS, Sodr e LMK and Contel EPB (2003) Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiet e and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology* 26(3):301-305.
- Bardakci F and Skibinski DOF (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Journal of Heredity* 73:117-123.
- Barroso RM, Hilsdorf AWS, Moreira HLM, Cabello PH and Traub-Cseko Y (2005) Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture* 247:51-65.
- Britto SGC, Sirol RN, Vianna NC, Jardim SM, Santos JC, Pelisari E (2003) Peixes do rio Paranapanema. Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, São Paulo, 112 pp.
- Calcagnotto D, Russello, M and Desalle R (2001) Isolation and characterization of microsatellite loci In *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes* 1:245-247.
- Duke Energy, <http://www.duke-energy.com.br/PT/Meioambiente> (Março 12, 2007).
- Furuya WM (2001) Espécies nativas. In Moreira HLM, Vargas L, Ribeiro RP and Zimmermann S. ULBRA, Canoas, pp 83-90.
- Hara M and Sekino M (2003) Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* 217:107-114.
- Kang JH, Noh JK, Kim JH, Lee JH, Kim HC, Kim KK, Kim BS and Lee WJ (2006) Genetic relationship between broodstocks of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. *Aquaculture Research* 37:701-707.

- Koljonen ML, Tähtinen J, Säisä M and Koskiniemi J (2002) Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture* 212:69-92.
- Leuzzi MSP, Almeida FS, Orsi ML and Sodr  MLK (2004) Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs of the River Paranapanema. *Genetics and Molecular Biology* 27:355-362.
- Liu Y, Chen S and Li B (2005) Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. *Aquaculture* 243:103-111.
- Lundrigan TA, Reist JD and Ferguson MM (2005) Microsatellite genetic variation within and among Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America. *Aquaculture* 244:63-75.
- Moreira HLM, Zimmermann S, Ribeiro RP, Bastos RG, Vargas LD and Povh JA (2003) The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. In *World Aquaculture*. INVE, Salvador, pp 460.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Nat Acad Sci* 70:3321-3323.
- Ortega-Villaizán Romo MM, Aritaki M and Taniguchi N (2006) Pedigree analysis of recaptured fish in the stock enhancement program of spotted halibut *Verasper variegates*. *Fisheries Science* 72:48-52.
- Porta J, Porta JM, Matínez-Rodríguez G, Alvarez MC (2006) Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 256:159-166.
- Povh JA, Moreira HLM, Ribeiro RP, Prioli AP, Vargas L, Blanck DV, Gasparino E and Streit Jr DP (2005) Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum* 27(1):1-10.
- Povh JA, Ribeiro RP, Sirol RN, Mangolin CA, Gasparino E, Barrero NML, Gomes PC, Streit Jr DP and Vargas L (2006) Importância do monitoramento genético pela utiliza o de marcadores moleculares na piscicultura. In *AquaCiência*, Aquabio, Bento Gonçalves.
- Rohlf FJ (1989) NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Publishers, New York.

- Saura M, Caballero P, Caballero A and Morán P (2006) Genetic variation in restored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations in the Ulla and Lérez rivers, Galicia, Spain. *ICES Journal of Marine Science* 63:1290-1296.
- Sekino M, Hara M and Taniguchi N (2002) Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 213:101-122.
- Sirol, RN and Britto SG (2006) Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In Nogueira MG, Henry R and Jorcin A *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. RiMA, São Carlos, pp 275-284.
- Sofia SH, Silva CRM, Galindo BA, Almeida FS, Sodr e LMK and Martinez CBR (2006) Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia* 553:245-254.
- Sønstebø JH, Borgstrøm R and Heun M (2007) Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. *Conservation Genetics* 8:33-44.
- Vasemägi A, Cross R, Paaver T, Koljonen ML and Nilsson J (2005) Extensive immigration from compensatory hatchery releases into wild Atlantic salmon population in the Baltic sea: spatio-temporal analysis over 18 years. *Heredity* 95:76-83.
- Wang S, Hard JJ and Utter F (2002) Salmonid inbreeding: a review. *Fisheries Biology and Fisheries* 11:301-319.
- Was A and Wenne R (2002) Genetic differentiation in hatchery and wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci. *Aquaculture* 204:493-506.
- Wasko AP, Martins C, Oliveira C, Senhorini JA and Foresti F (2004) Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinh a (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology* 20:48-52.
- Wright S (1978) *Evolution and genetics of populations*. University of Chicago Press, Chicago, 511 pp.
- Yeh FC, Boyle TYZ and Xiyang JM (1999) POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research.

**IV. COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS PROGÊNIES  
DE *Piaractus mesopotamicus* OBTIDAS POR DIFERENTES SISTEMAS  
REPRODUTIVOS**

**(a ser enviado para publicação)**

**Periódico: *Brazilian Archives of Biology and Technology***

**“Comparison of genetic diversity from *Piaractus mesopotamicus* offsprings  
obtained by different reproductive systems”**

# Comparação da diversidade genética das progênes de *Piaractus mesopotamicus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos

[Comparison of genetic diversity from *Piaractus mesopotamicus* offsprings obtained by different reproductive systems]

## RESUMO

*O repovoamento dos rios vem sendo muito utilizado no Brasil como forma de contornar os impactos gerados sobre a diversidade de peixes. No entanto, a liberação de peixes no ambiente com baixa diversidade genética pode, além de não ser eficiente, promover alterações na estrutura genética das populações nativas. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a variabilidade genética das progênes obtidas pelos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural através do marcador molecular RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), utilizando como espécie modelo, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Os resultados obtidos evidenciaram que o manejo reprodutivo pode afetar a variabilidade genética. Observou-se uma grande redução da variabilidade genética na progênie do sistema de reprodução por extrusão em relação ao sistema seminatural.*

**Palavras-chave:** Peixe, RAPD, Reprodução, Variabilidade genética

## INTRODUÇÃO

Entre as ações de manejo realizadas no Brasil para reduzir os impactos da ação do homem sobre os estoques de peixes, o repovoamento vem sendo largamente empregado (Hilsdorf *et al.*, 2006; Agostinho *et al.*, 2006). No entanto, as estratégias e ações para a melhoria dos recursos naturais têm sido realizadas, em geral, sem respaldo científico (Agostinho *et al.*, 2005).

A introdução de peixes criados em cativeiro nos rios quase sempre são provenientes de um casal ou poucos casais, devido a alta prolificidade dos

peixes, o que promove uma redução da variabilidade genética (Povh *et al.*, 2006). Ainda, o manejo reprodutivo pode, em apenas uma geração, promover grande perda da variabilidade genética (Porta *et al.*, 2006b).

A variabilidade genética confere aos peixes capacidade adaptativa às mudanças ambientais (Falconer, 1987), resistência às doenças e ainda pode afetar o crescimento (Moreira, 2001) e a reprodução (Porta *et al.*, 2006). Portanto, a manutenção deste parâmetro é fundamental para qualquer estratégia de conservação genética.

Portanto, a análise da variabilidade genética do plantel de reprodutores (Ramella *et al.*, 2006),

assim como dos peixes que serão soltos no ambiente, é fundamental para qualquer estratégia de conservação genética das espécies através do repovoamento (Sirol & Britto, 2006).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural em *Piaractus mesopotamicus* quanto à variabilidade genética na progênie, através do marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e também quanto à eficiência reprodutiva e mortalidade dos reprodutores.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em uma piscicultura localizada no município de Salto Grande, São Paulo, que vem produzindo peixes para repovoamento do rio Paranapanema, em conjunto com o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

### Reprodução

Foram utilizados 160 reprodutores estoque de *P. mesopotamicus* (80 machos e 80 fêmeas) da piscicultura de Salto Grande. Estes reprodutores apresentavam em torno de 2,5 kg e quatro anos de idade. Pertenciam a um lote de 250 reprodutores formados na própria piscicultura a partir de peixes capturados no rio Paraná.

Os dois sistemas de reprodução analisados, o sistema seminatural e por extrusão, foram caracterizados por Zaniboni-Filho & Nuñez (2004). No primeiro sistema, os óvulos foram fertilizados pelos machos dentro de um tanque sem

interferência. No segundo sistema, os óvulos das fêmeas foram induzidos à saída pela papila genital através de pressão abdominal; o mesmo procedimento para a retirada do sêmen no macho; posteriormente ambos os gametas foram recolhidos em recipiente para, em seguida, serem misturados para a fertilização.

Nos dois sistemas reprodutivos, os peixes foram conduzidos para o laboratório e induzidos a reprodução com extrato de hipófise de carpa segundo a metodologia descrita por Woynarovich & Horváth (1983). As fêmeas receberam 5,5 mg extrato de hipófise / kg de peixe vivo, divididos em duas aplicações, sendo 10% do total na primeira e, 24 horas depois, os 90% restantes; os machos receberam uma dose única concomitante com a segunda aplicação nas fêmeas, com a posologia de 2,5 mg de extrato de hipófise / kg de peixe vivo.

A escolha dos peixes em cada repetição ocorreu a partir de características sexuais reprodutivas para os machos (liberação de sêmen após leve compressão ventral) e para fêmeas (ventre abaulado e orifício urogenital avermelhado).

Foram utilizadas quatro repetições durante o período reprodutivo, sendo que cada repetição consistia de 10 machos e 10 fêmeas. Contudo, apenas uma das quatro repetições de cada modelo reprodutivo foi analisada a variabilidade genética. As quatro repetições foram utilizadas para análise da taxa de desova das fêmeas e da mortalidade até 72 horas após a indução hormonal.

## Sistemas reprodutivos

No sistema reprodutivo por extrusão, os reprodutores, após a indução hormonal, foram mantidos em tanques individuais de 1,0 x 0,9 x 1,0 m (10 machos e 10 fêmeas, por repetição). Após 240 horas-grau, as fêmeas foram extrusadas individualmente, onde foram coletados os ovócitos em bacias individuais e, em seguida, adicionou-se, por extrusão, o sêmen dos machos. A fertilização ocorreu a seguir com o acréscimo de água misturando-se os ovócitos com o sêmen. Para cada fêmea foi utilizado um único macho. Após 10 minutos de repouso, os ovos foram transferidos para incubadoras individuais do tipo cilindro cônico. Cada uma das quatro repetições continha 20 reprodutores (10 machos e 10 fêmeas).

Os reprodutores do sistema reprodutivo seminatural foram, após a indução hormonal, colocados em tanque circular. Este possuía 5,1 m de raio; 2,0 m de profundidade; fluxo de água contínuo (131 L/s) em dois sentidos de vazão; escoamento de água na porção central, que permitia a saída dos ovos para uma incubadora cilindro-cônico de 200 litros com fluxo contínuo (7 L/s), retendo-os para em seguida serem levados para incubadoras individuais do tipo cilindro cônico. Cada uma das quatro repetições continha 20 reprodutores (10 machos e 10 fêmeas).

No modelo seminatural, estabeleceu-se a cada hora a retirada dos ovos que estivessem na incubadora de captação que, em seguida, foram conduzidos para as incubadoras do tipo cilindro cônico. Ainda, foi definido o período total de recolhimento dos ovos de no máximo seis horas.

Após a eclosão das larvas, estas foram colhidas e armazenadas em microtubos e conservadas em álcool para posterior extração e amplificação do DNA. Para a amostragem da progênie do sistema por extrusão, foram colhidas aleatoriamente cinco larvas de cada um dos 10 casais que desovaram, assim como a nadadeira dos parentais que contribuíram para a progênie. Para a amostragem da progênie dos 10 casais do sistema seminatural, colheu-se 70 larvas de forma aleatória de todas as incubadoras e de todos os horários de coleta de ovos dos que cada incubadora coletora.

## Extração de DNA

Para extração de DNA, foi utilizada a metodologia descrita por Bardakci & Skibinski (1994), modificada por Povh *et al.* (2005). Para os reprodutores foi extraído DNA dos fragmentos de nadadeira caudal de 0,5 cm<sup>2</sup>, e para a progênie, das larvas de um dia.

As amostras foram colocadas em microtubos, e em seguida, adicionou-se 550 µL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 1% de SDS) e 7 µL de proteinase K (200 µg/mL). Estas foram incubadas em banho-maria a 50°C *overnight*. Posteriormente, o DNA foi purificado com duas extrações com fenol-clorofórmio e uma com clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com duas vezes e meia de etanol absoluto e um décimo do volume recuperado de acetato de sódio, e permaneceu incubado por uma hora a -20°C. Em seguida, o DNA precipitado foi ressuspensão em 40 µL de tampão TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de

EDTA) e tratado com 6  $\mu\text{L}$  de RNase (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em banho-maria a 37°C por uma hora, sendo, posteriormente conservado em freezer a -20°C.

O DNA foi quantificado por comparação com concentrações de DNA fago  $\lambda$  conhecidas em gel de agarose 1%, revelado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40mM de Tris-acetato e 1mM de EDTA) por uma hora a 70 volts. A imagem foi capturada por um sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

### **Amplificação**

O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 15  $\mu\text{L}$ , no qual se utilizou tampão 1X Tris-KCl, 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,46  $\mu\text{M}$  de primer, 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de Platinun *Taq* DNA Polimerase, 10 ng de DNA para os reprodutores e 5 ng de DNA para larvas.

Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida foram realizados 40 ciclos, cada um consistindo de: um minuto de desnaturação a 94°C, um minuto de anelamento a 36°C e dois minutos de extensão a 72°C, após realizou-se uma extensão final a 72°C por cinco minutos. As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”.

Foi a valiada a amplificação de 60 diferentes oligonucleotídeos (*primers*) de 10 bases, dos Kits OPA OPX e OPW (Operon Technologies Ltd.). A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 0,5X (45mM de Tris-Borato e 1 mM de EDTA) por quatro horas a 70 volts. A imagem foi capturada

por um sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

### **Estatística**

O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o padrão ladder 100 pb.

A variabilidade genética foi determinada pelo Índice de diversidade genética de Shannon e pela porcentagem de fragmentos polimórficos através do programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

A similaridade genética foi obtida com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard. Utilizou-se para essa análise o programa NTSYS 1.7 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 1989).

O número de fêmeas que desovaram e a mortalidade em cada um dos sistemas reprodutivos foram analisados pelo teste  $\chi^2$ .

## **RESULTADOS**

Os 11 *primers* selecionados produziram um total 103 framgentos com tamanho entre 320 pb a 2900 pb. O número de fragmentos para cada *primer* variou de seis a 16 (Tabela 1).

### **Parentais**

Considerando as quatro repetições ao longo do período reprodutivo, o número de fêmeas que desovaram no sistema seminatural foi superior (82,5%) em relação as que desovaram no sistema por extrusão (60%) (Tabela 2).

Como apenas seis das 10 fêmeas desovaram no sistema por extrusão, somente 12 parentais (seis fêmeas e seis machos) foram considerados na análise de variabilidade genética do sistema reprodutivo por extrusão. No entanto, devido a incerteza de quais reprodutores realmente participaram da reprodução no sistema reprodutivo seminatural, principalmente pela dificuldade de determinar quais os machos que participaram da reprodução, foram considerados todos os 20 reprodutores (10 machos e 10 fêmeas) na análise da variabilidade genética deste sistema reprodutivo.

O índice de diversidade genética de Shannon (IS) e o polimorfismo (P) foram superiores para os

parentais do sistema reprodutivo seminatural (IS = 0,365 e P = 60,5%) em relação ao sistema por extrusão (IS = 0,298 e P = 53,4%), indicando uma maior variabilidade genética nos parentais do primeiro sistema reprodutivo.

A similaridade genética dos reprodutores do sistema reprodutivo seminatural (0,710) foi inferior aos reprodutores do sistema por extrusão (0,837) (Tabela 2).

A mortalidade dos reprodutores do sistema reprodutivo por extrusão foi maior (20%) em relação à obtida nos reprodutores do sistema seminatural (6,3%), como se pode observar na Tabela 2.

**Tabela 1.** Sequências de nucleotídeos dos *primers*, número de fragmentos e tamanho dos fragmentos amplificados obtidos para *P. mesopotamicus* dos dois sistemas reprodutivos

<i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')	Nº de fragmentos	Tamanho dos fragmentos (pb)
OPA01	CAG GCC CTT C	8	350 – 1800
OPA10	GTG ATC GCA G	5	700 – 1500
OPA16	AGC CAG CGA A	16	300 – 2900
OPW01	CTC AGT GTC C	10	400 – 1780
OPW02	ACC CCG CCA A	8	600 – 2500
OPW03	GTC CGG AGT G	11	620 – 2200
OPW08	GAC TGC CTC T	10	500 – 1750
OPW13	CAC AGC GAC A	6	320 – 2000
OPW19	CAA AGC GCT C	13	380 – 2750
OPX01	CTG GGC ACG A	10	520 – 2000
OPX03	TGG CGC AGT G	6	650 – 1820
Total	–	103	320 – 2900

Tabela 2 – Número de fêmeas que desovaram, mortalidade, índice de diversidade genética de Shannon, polimorfismo e similaridade genética obtida os reprodutores de *P. mesopotamicus* utilizados pelos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural

Reprodutores	Desova <sup>1</sup>	Mortalidade <sup>2</sup>	Parâmetros genéticos <sup>3</sup>		
			Índice de Shannon	Polimorfismo	Similaridade
Por extrusão	24 (60,0%) b	16 (20%) b	0,298	53,4	0,837
Seminatural	33 (82,5%) a	5 (6,3%) a	0,365	60,5	0,710

<sup>1</sup>n = 40 (fêmeas). <sup>2</sup>n = 80 (40 machos e 40 fêmeas). <sup>3</sup>n = 12 para o sistema por extrusão 20 (10 machos e 10 fêmeas) para o sistema seminatural (6 machos e 6 fêmeas). Valores com letras diferentes são significativos ao nível de 5% pelo teste do  $\chi^2$ .

### Progênie

O índice de diversidade genética de Shannon e polimorfismo foram superior na progênie obtida pelo sistema reprodutivo seminatural, (IS = 0,415 e P = 72,4%) em relação ao sistema por extrusão (IS = 0,231 e P = 42,7%) (Tabela 3). Estes resultados indicam uma maior variabilidade

genética na progênie obtida pelo primeiro sistema reprodutivo.

Assim como nos reprodutores de cada um destes sistemas, a progênie obtida por extrusão apresentou maior similaridade genética (0,840) em relação à progênie obtida pelo sistema seminatural (0,777) (Tabela 3).

Tabela 3 – Índice de diversidade genética de Shannon, polimorfismo e similaridade genética obtida pelas progênies dos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural de *P. mesopotamicus*

Progênie	Parâmetros		
	Variabilidade genética		Similaridade genética
	Índice de Shannon	Polimorfismo	
Por Extrusão (n = 40)	0,231	42,70%	0,840
Seminatural (n = 70)	0,415	72,40%	0,777

## DISCUSSÃO

### Variabilidade genética

A análise dos sistemas reprodutivos utilizados para a espécie *P. mesopotamicus* revelou uma maior

variabilidade genética, tanto pelo índice de Shannon quanto pelo polimorfismo, na progênie obtida pelo sistema reprodutivo seminatural em relação à progênie obtida pelo sistema por extrusão.

O gargalo genético (efeito *bottleneck*) promovido pela redução do número de reprodutores que contribuiu com a progênie (40%), possivelmente contribuiu para a maior similaridade e a menor variabilidade genética dos parentais do sistema por extrusão em relação ao seminatural e, conseqüentemente, para que este mesmo padrão se mantivesse na progênie dos sistemas reprodutivos. Devido ao caráter dominante do marcador RAPD, não foi possível determinar quantos reprodutores realmente contribuíram com a progênie pelo sistema reprodutivo seminatural. Contudo, pela alta variabilidade genética obtida na progênie deste sistema, é provável que a maior parte dos reprodutores deste tenha contribuído com a progênie.

No entanto, para algumas espécies o sistema reprodutivo seminatural pode apresentar dominância de apenas alguns reprodutores, como foi observado por Porta *et al.* (2006). Estes autores constataram que a grande redução da variabilidade genética na progênie de *Solea senegalensis* foi devido à contribuição de poucos reprodutores na progênie, em que apenas uma fêmea e dois machos, de um total de nove fêmeas e 11 machos, contribuíram com a progênie.

Semelhantemente, Sekino *et al.* (2003) e Hara & Sekino (2003) também relatam que a menor variabilidade genética encontrada na progênie de *Paralichthys olivaceus* pelo sistema reprodutivo seminatural foi devido à dominância de poucos machos na progênie, em que os primeiros autores destacaram que apenas um macho, de um total de seis, foi responsável por 99% da progênie.

Embora quase a totalidade da reprodução de peixes migradores de água doce do Brasil seja por extrusão (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004), o emprego deste sistema reprodutivo pode comprometer a variabilidade genética (Sirol & Britto, 2006). Isso porque este sistema promove um direcionamento reprodutivo, o que também pode aumentar a probabilidade de que indivíduos mais aparentados se acasalem. Ainda, este sistema tende a favorecer uma seleção não intencional dos reprodutores, como se pode constatar no presente trabalho, em que apenas 60% dos reprodutores desovam neste sistema, comparado com os 82,5% do sistema seminatural (Tabela 2) e, portanto, é possível que os indivíduos mais tolerantes ao estresse tenham mais chances de desovar pelo sistema por extrusão, o que, conseqüentemente, tenderia a uma redução da variabilidade genética.

A reprodução pelo sistema seminatural pode reduzir este tipo de problema (Sirol & Britto, 2006), que por ser menos seletivo, possibilita que um maior número de reprodutores reproduzam-se como pode ser observado para *P. mesopotamicus*.

Contudo, o aumento no número efetivo de reprodutores pode diluir este efeito seletivo, como observaram Perez-Enriquez *et al.* (1999). Estes autores constataram que embora apenas 35% dos reprodutores de *Pagrus major* contribuíram com a progênie, o grande número de reprodutores utilizados durante a reprodução (63,7) permitiu a manutenção da variabilidade genética.

No entanto, a alta prolificidade dos peixes e/ou limitada estrutura física da piscicultura impossibilita a utilização de um grande número de reprodutores. Assim, as pisciculturas normalmente

acabam utilizando poucos casais na reprodução, o que proporciona o efeito *bottleneck* e, conseqüentemente, uma redução da variabilidade genética (Povh *et al.*, 2006).

Desta forma, o sistema reprodutivo seminatural pode permitir uma maior representabilidade do *pool* de genes do estoque de reprodutores devido ao menor efeito seletivo, principalmente quando não existe a possibilidade da utilização de um grande número de reprodutores.

Muitos autores têm destacado que o pequeno número de reprodutores e o acasalamento entre indivíduos aparentados normalmente são os responsáveis pela diminuição da variabilidade genética dos estoques de reprodutores. Entre estes, Wasko *et al.* (2004) para a espécie matrinhã (*Brycon cephalus*) do Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais (CEPTA) em relação a uma população nativa do rio Amazonas.

Portanto, a utilização de um pequeno número de reprodutores, o acasalamento entre indivíduos aparentados (Beardmore *et al.*, 1997; Sekino *et al.* 2002; Moreira, 2003, Yokota *et al.*, 2003; Sekino *et al.*, 2004) e a seleção não intencional (Povh *et al.*, 2006), tendem a promover perda da variabilidade genética, e isso pode ser mais facilmente atingido pelo sistema reprodutivo por extrusão do que pelo sistema seminatural.

### **Eficiência reprodutiva e mortalidade**

A porcentagem de fêmeas que desovaram no sistema reprodutivo seminatural de *P. mesopotamicus* foi maior (82,5%) ao obtido pelo sistema por extrusão (60%). Segundo Harvey &

Carolsfeld (1993), esta menor eficiência reprodutiva pode ser devido ao estresse, pois as condições estressantes no manejo reprodutivo fazem com que a energia seja destinada preferencialmente para o retorno a homeostase, prejudicando a reprodução.

A eficiência reprodutiva do sistema de reprodução seminatural também foi constatada por Reynalte *et al.* (2002), os quais observaram maiores taxas de sobrevivência dos reprodutores e de fertilização na reprodução seminatural para a espécie *Leporinus macrocephalus*.

Ainda, o sistema seminatural apresentou menor mortalidade dos reprodutores (6,3%) em relação ao sistema por extrusão (20%). E, como o *P. mesopotamicus* entra em reprodução com aproximadamente três anos de idade (Urbinati & Gonçalves, 2005), os custos associados à formação dos reprodutores tenderiam a ser maior no segundo sistema, uma vez que estes animais podem sucumbir ao tratamento de indução à desova, e ainda morrerem sem a liberação de gametas viáveis (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004).

### **Repovoamento**

É evidente que o impacto potencial que as espécies nativas têm sofrido, os estoques de reprodutores podem ser uma alternativa para a recuperação da diversidade genética, promovendo um aumento dos estoques naturais com o emprego de práticas de repovoamento (Koljonen *et al.*, 2002; Barroso *et al.*, 2005) ou através da criopreservação (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006).

Contudo, a introdução de peixes criados em cativeiro nos rios, mesmo feitas com as melhores intenções podem proporcionar uma redução da variabilidade genética e, conseqüentemente, levar a perda de resistência a doenças e da capacidade de se adaptar em um novo ambiente (Allendorf e Phelps, 1980; Taniguchi, 2003). Além disso, a mistura de peixes liberados no ambiente com a população nativa, pode promover a perda de genes importantes para a adaptação local nas próximas gerações (Vasemägi *et al.*, 2005; Sønstebø *et al.*, 2007).

Desta forma, o adequado manejo reprodutivo, assim como monitoramento genético através dos marcadores moleculares, como RAPD e microssatélite, podem proporcionar um repovoamento eficiente, com o aumento dos estoques nativos e, ao mesmo tempo, não promover alteração na estrutura genética das populações nativas.

Pode-se concluir no presente trabalho, que a progênie obtida pela reprodução de *P. mesopotamicus* no sistema seminatural apresentou variabilidade genética superior à progênie obtida pelo sistema por extrusão. Desta forma, quando o objetivo da alevinocultura é a produção de alevinos ou juvenis de *P. mesopotamicus* para liberação no ambiente, deve-se preconizar o sistema reprodutivo seminatural. Análises futuras são necessárias para a confirmação da eficiência do manejo seminatural na preservação da variabilidade genética para outras espécies migradoras.

## ABSTRACT

*The rivers restocking is being very used in Brazil as a form to outline the impacts generated over fish diversity. However, the fish liberation in environments with low genetic diversity can, besides not being efficient, promote alterations in native populations genetic structure. Therefore, the objective of present study was to evaluate the offsprings genetic variability obtained by extrusion and semi-natural systems through molecular marker RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), using pacu (*Piaractus mesopotamicus*) as specie model. The obtained results evidenced that the reproductive management can affect genetic variability. A great reduction of genetic variability was observed in the offspring from extrusion reproduction system in relation to semi-natural system.*

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa de geração de energia hidroeétrica Duke Energy Internacional pelo apoio ao presente trabalho.

## REFERÊNCIAS

- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C. (2006), O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. In: Nogueira, M.G.; Henry, R. and Jorcin, A. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. São Carlos: RiMA. pp. 23-55.
- Agostinho, A.A.; Thomaz, S.M. and Gomes, L.C. (2005), Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, **1** : (1), 70-78.

- Allendorf, F.W. and Phelps, S.R. (1980), Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, **109**, 537-543.
- Bardakci, F. and Skibinski, D.O.F. (1994), Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Journal of Heredity*, **73**, 117-123.
- Barroso, R.M, Hilsdorf, A.W.S; Moreira, H.L.M.; Cabello, P.H. and Traub-Cseko, Y. (2005), Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture*, **247**, 51-65.
- Beardmore, J.A.; Mair, G.C. and Lewis, R.I. (1997), Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research*, **21**, 829-839.
- Falconer, D.S. (1987), *Introdução a genética quantitativa*. Viçosa: UFV. pp. 279.
- Hara, M. and Sekino, M. (2003), Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture*, **217**, 107-114.
- Harvey, B. and Carolsfeld, J. (1993), *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: International Development Research Center. pp. 144.
- Hilsdorf, A.W.S.; Resende, E.K. and Marques, D.K.S. (2006), *Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas*. Embrapa Pantanal, Corumbá: Embrapa. pp. 44.
- Koljonen, M.L.; Tähtinen, J.; Säisä, M. and Koskiniemi, J. (2002), Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture*, **212**, 69-92.
- Moreira, H.L.M. (2001), Genética e melhoramento de peixes. In: Moreira, H.L.M.; Vargas, L.; Ribeiro, R.P. and Zimmermann, S. (Ed.). *Fundamentos da moderna aquíicultura*. Maringá: ULBRA. pp. 135-147.
- Moreira, H.L.M.; Zimmermann, S.; Ribeiro, R.P.; Bastos, R.G.; Vargas, L.D. and Povh, J.A. (2003), The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. In: World Aquaculture, Salvador. *Proceedings...* Salvador: INVE. pp. 460.
- Ninhaus-Silveira, A.; Foresti, F.; Veríssimo-Silveira, R. and Senhorini, J.A. (2006), Seminal Analysis, Cryogenic preservation, and fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **49**, 651-659.
- Perez-enriquez, R.; Takagi, M. and Taniguchi, N. (1999), Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, **173**, pp. 413-423.
- Porta, J.; Porta, J.M.; Matínez-Rodríguez, G. and Alvarez, M.C. (2006), Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture*, **256**, 159-166.
- Porta, J.; Porta, J.M.; Matínez-Rodríguez, G. and Alvarez, M.C. (2006b), Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, **251**, pp. 46-55.
- Povh, J.A.; Moreira, H.L.M.; Ribeiro, R.P.; Prioli, A.P.; Vargas, L.; Blanck, D.V.; Gasparino, E. and Streit Jr, D.P. (2005), Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum*, **27** : (1), 1-10.
- Povh, J.A.; Ribeiro, R.P.; Sirol, R.N.; Mangolin, C.A.; Gasparino, E.; Barrero, N.M.L.; Gomes, P.C.; Streit Jr, D.P. and Vargas, L. (2006), Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. In:

- AquaCiência, 2., Bento Gonçalves. *Anais... Bento Gonçalves: Aquabio*. CD-ROM.
- Ramella, M.S., Kroth, M.A., Meurer, S., Nuñez, A.P.O., Zaniboni-Filho, E. and Arisi, A.C.M. (2006), Genetic variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **49**, 589-598.
- Reynalte, D.A.T.; Esquivel, B.M.; Esquivel, J.R. and Zaniboni-Filho, E. (2002), Reproducción inducida del piauçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello e Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, **28** : (1), 11-18.
- Rohlf, F.J. (1989), *NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. New York: Exeter Publishers.
- Sekino, M.; Hara, M. and Taniguchi, N. (2002), Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **213**, 101-1220.
- Sekino, M.; Saitoh, K.; Yamada, T.; Kumagai, A.; Hara, M. and Yamashita, Y. (2003), Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, **221**, 255-263.
- Sekino, M.; Sugaya, T.; Hara, M. and Taniguchi, N. (2004), Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **233**, 163-172.
- Sirol, R.N. and Britto, S.G. (2006), Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: Nogueira M.G.; Henry, R. and Jorcin, A. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. São Carlos: RiMA. pp. 275-284.
- Sønstebo, J.H.; Borgstrøm, R. and Heun, M. (2007), Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. *Conserv Genet*, **8**, 33-44.
- Taniguchi, N. (2003), Genetic factors in broodstock management for seed production. *Reviews Fish Biology and Fisheries*, **13**, 175-185.
- Urbinati, E.C. and Gonçalves, F.D. (2005), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B. and Gomes, L.C. (Ed.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM. pp. 225-246.
- Vasemägi, A.; Cross, R.; Paaver, T.; Koljonen, M.L. and Nilsson, J. (2005), Extensive immigration from compensatory hatchery releases into wild Atlantic salmon population in the Baltic sea: spatio-temporal analysis over 18 years. *Heredity*, **95**, 76-83.
- Wasko, A.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Senhorini, J.A. and Foresti, F. (2004), Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology*, **20**, 48-52.
- Woynarovich, E. and Horváth, L. (1983), *A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão*. Brasília: Escopo. pp. 220.
- Yeh, F.C.; Boyle, T.Y.Z. and Xiyun, J.M. (1999), POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research.
- Yokota, M.; Harada, Y. and Iizuka, M. (2003), Genetic drift in a hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. *Fisheries Science*, **69**, 101-109.
- Zaniboni-Filho, E. and Nuñez, A.P.O. (2004), Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M. and

Castagnolli, N. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, pp. 45-73.

**V. AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DA DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE *Piaractus mesopotamicus* NO SISTEMA  
SEMINATURAL**

**(a ser enviado para publicação)**

**Periódico: *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia***

**“Reproductive and genetic diversity evaluation of *Piaractus mesopotamicus* in seminatural system”**

**Avaliação reprodutiva e da diversidade genética de *Piaractus mesopotamicus* no sistema seminatural**

**[Reproductive and genetic diversity evaluation of *Piaractus mesopotamicus* in seminatural system]**

**RESUMO**

Atualmente tem se constatado a diminuição de muitas espécies de peixes em vários ambientes aquáticos. O *Piaractus mesopotamicus* é um exemplo de espécie raramente encontrada em alguns rios brasileiros. Como forma de minimizar este impacto, o repovoamento tem sido bastante empregado. No entanto, pouca importância tem sido dada à variabilidade genética, parâmetro que é fundamental para qualquer prática de conservação genética. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade genética e a contribuição dos reprodutores na progênie de *P. mesopotamicus* obtida pelo sistema de reprodução seminatural, através do marcador molecular microssatélite. Os resultados obtidos mostraram igual número de alelos na progênie e nos reprodutores (cinco alelos), e também heterozigose semelhante, com valores de 0,563 e 0,550, respectivamente. Ainda, houve a ocorrência de múltipla paternidade e contribuição diferenciada dos reprodutores na progênie. Desta forma, mesmo com a dominância de alguns reprodutores, os resultados obtidos mostraram a manutenção da variabilidade genética da progênie de *P. mesopotamicus* obtida pelo sistema reprodutivo seminatural em relação aos reprodutores.

**Palavras-chaves:** Endogamia, Microssatélite, Peixe, Reprodução, Variabilidade genética

**ABSTRACT**

Nowadays it has been verified reduction of many fish species in several aquatic environments. The *Piaractus mesopotamicus* is a specie example barely found in some Brazilian rivers. Trying to minimize this impact, the restocking technique has been amply used. However, little importance has been given to genetic variability, parameter

that is fundamental for any genetic conservation practice. So, the objective of the present study was to analyze the genetic diversity and the reproducers contribution to the *P. mesopotamicus* offspring obtained by semi-natural reproduction system, through molecular marker microsatellite. The obtained results showed an equal alleles number in offspring and in reproducers (five alleles), and also a similar heterozygosis, with values of 0.563 and 0.550, respectively. Also there was a multiple paternity occurrence and differentiated reproducers contribution in the offspring. This way, even with some reproducers dominance, results showed genetic variability maintenance of *P. mesopotamicus* offspring obtained by semi-natural reproductive system in relation to reproducers.

**Key words:** Inbreeding, Microsatellite, Fish, Reproduction, Genetic variability

## INTRODUÇÃO

Em muitos rios brasileiros têm ocorrido diminuição e até mesmo o desaparecimento de muitas espécies de peixes que antes eram comumente capturadas pelos pescadores. Entre estas espécies, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), também conhecido como caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu, atualmente é raramente encontrado em muitos rios brasileiros (Agostinho et al., 1992), por exemplo, no rio Paranapanema (Britto et al., 2003).

Em geral, entre os fatores que podem levar a redução ou desaparecimento de muitas espécies de peixes, podendo-se destacados a poluição e eutrofização, o assoreamento, a construção de barragem e controle de cheias, a sobrepesca e a introdução de espécies (Vrijenhoek, 1998; Agostinho et al., 2003; Hatanaka et al., 2006).

Segundo o IBAMA, qualquer entidade envolvida com o meio ambiente, como a construção de barragem hidroelétrica, deve adotar métodos de proteção e conservação dos recursos biológicos aquáticos. No entanto, as estratégias e as ações para a melhoria dos recursos naturais têm sido realizadas, em geral, sem respaldo científico (Agostinho et al., 2005).

Entre as ações de manejo realizada no Brasil para reduzir os impactos da ação do homem sobre os estoques de peixes, pode-se destacar a estocagem ou repovoamentos

(Hilsdorf et al., 2006; Agostinho et al., 2006). Contudo, em três décadas de programas de estocagem de peixes no Brasil, em geral realizadas sem nenhum respaldo científico (Agostinho et al., 2005), vêm se tornando cada vez mais comum.

A introdução de peixes de forma irracional, mesmo feita com a melhor das intenções, pode proporcionar uma redução da variabilidade genética e, conseqüentemente, diminuir a resistência às doenças e da capacidade de se adaptar em um novo ambiente (Allendorf e Phelps, 1980; Taniguchi, 2003).

Portanto, a variabilidade genética é de grande importância para a conservação das espécies (Barroso et al., 2005), e necessária para os indivíduos enfrentarem as mudanças ambientais, desenvolver-se (Falconer, 1987; Ryman et al., 1995) e evoluírem (Baerwald et al., 2007).

Desta forma, a análise da variabilidade genética do plantel de reprodutores usados para o programa de repovoamento é fundamental para a conservação genética, assim como a verificação da manutenção da variabilidade no lotes de alevinos ou juvenis que serão liberados no ambiente (Sirol e Britto, 2006).

Frente a este cenário, qualquer ação que vise a recuperação do ambiente deve buscar o monitoramento genético. Dentre as metodologias, os marcadores moleculares, entre estes o marcador microssatélite tornou-se fundamental para o reconhecimento e caracterização genética de estoques (nativo e cultivado) e dos peixes que serão soltos no ambiente (Ryman e Utter, 1987).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade genética e a contribuição dos reprodutores na progênie de *Piaractus mesopotamicus* obtida pelo sistema de reprodução seminatural, através do marcador molecular microssatélite.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado em uma piscicultura localizada no município de Salto Grande, São Paulo, que vem produzindo peixes para repovoamento do rio Paranapanema, em conjunto com o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

## **Reprodução**

Foram utilizados 20 reprodutores de *P. mesopotamicus*, nove fêmeas e 11 machos, de uma piscicultura de Salto Grande. Estes apresentavam as seguintes características: 2,5 kg; quatro anos de idade; e pertenciam a um lote de 250 reprodutores, formados a partir de peixes capturados no rio Paraná.

O sistema reprodutivo utilizado foi o seminatural. Este sistema, definido por Zaniboni-Filho e Nuñez (2004), caracteriza-se pela fertilização dos óvulos pelos machos dentro de um tanque.

Antes de serem colocados em tanque, os reprodutores foram conduzidos para o laboratório e induzidos a reprodução com extrato de hipófise de carpa segundo a metodologia descrita por Woynarovich e Horváth (1983). As fêmeas receberam 5,5 mg extrato de hipófise / kg de peixe vivo, divididos em duas aplicações, sendo 10% do total na primeira e, 24 horas depois, os 90% restantes; os machos receberam uma dose única concomitante com a segunda aplicação nas fêmeas, com a posologia de 2,5 mg de extrato de hipófise / kg de peixe vivo.

Após a indução hormonal, os reprodutores foram colocados em tanque circular, com as seguintes características: 5,1 m de raio; 2,0 m de profundidade; fluxo de água contínuo (131 L/s) em dois sentidos de vazão; e escoamento de água na porção central que permitia a saída dos ovos para uma incubadora cilindro-cônico de 200 litros com fluxo contínuo (7 L/s), retendo-os para em seguida serem levados para incubadoras individuais do tipo cilindro cônico.

Estabeleceu-se a retirada dos ovos na incubadora de captação a cada hora. Em seguida, estes foram conduzidos para as incubadoras do tipo cilindro cônico no laboratório. O período total de recolhimento dos ovos foi de seis horas.

Para a amostragem da progênie, colheu-se 50 larvas logo após o nascimento (larvas de um dia) de forma aleatória de todas as incubadoras e de todos os horários de coleta de ovos. Estas foram armazenadas em microtubos e conservadas em álcool para posterior extração e amplificação do DNA.

### **Extração de DNA**

Para extração de DNA, foi utilizada a metodologia descrita por Aljanabi e Martinez (1997), modificada por Povh et al. (2006). Para os reprodutores foi extraído DNA dos fragmentos de nadadeira caudal de 0,5 cm<sup>2</sup>, e para a progênie, das larvas de um dia.

Foram extraídas amostras de DNA de 50 larvas escolhidas aleatoriamente e dos 20 reprodutores (nove fêmeas e 11 machos). Foram adicionados nestas amostras 550 µL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 1% de SDS) e 7 µL de proteinase K (200 µg/mL). Em seguida estas foram incubadas em banho-maria a 50°C *overnight*. Posteriormente, o DNA foi purificado com 400 µL de cloreto de sódio (5 M) e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm, sendo em seguida precipitado com 400 µL de etanol absoluto. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, ressuspenso em TE (10 mM de Tris e 1 mM de EDTA) e tratado com 6 µL de RNase (30 µg/mL) em banho-maria a 38°C por uma hora.

O DNA foi quantificado por comparação com concentrações de DNA fago λ conhecidas em gel de agarose 1%, revelado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA) por uma hora a 70 volts, sendo a imagem capturada pelo sistema de EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

### **PCR**

O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 20 µL, no qual utilizou-se tampão 1X Tris-KCl, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µM de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de Platinun *Taq* DNA Polimerase, 10 ng de DNA para larvas e 20 ng de DNA para os reprodutores. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida foram realizados 30 ciclos, cada um consistindo de: 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento (Tab. 1) e um minutos de extensão a 72°C, após realizou-se uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações foram amplificadas em termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”.

Foram utilizados os oito *primers* microssatélite descritos por Calcagnotto et al. (2001) (Tab. 1).

Tabela 1 – Número de acesso, seqüência de repetição, temperatura de anelamento e seqüência dos *primers* dos oito *loci* microssatélite descritos para *P. mesopotamicus*

<i>locus</i> /acesso (GenBank)	Seqüência motivo	Ta (°C)	<i>Primer</i> (5' para 3')
Pme2 AF362445	(GT)18	60	F: TGGGTGCACAGCACAGTAAC R: TTTGCATTTCTGGTGCAAAG
Pme4 AF362446	(GT)14	60	F: CATGCTGCTGCAGATTAGAC R: CGCTTGCAATTTAACGCAGT
Pme5 AF362447	(GA)10gggagctggt (GT)10C(GT)12	60	F: CAGAGCATCTGGAGGGACAT R: TCTGAGACACTGATATCTAAACACACA
Pme14 AF362448	(CTG)7	62	F: ACCGTTATGCCCTACCCTTC R: GCGTTCTAGACAGAACTCATGG
Pme20 AF362449	(GT)15	58	F: CAGAGCTTTGAGGAACACGA R: CCCATCAGTTACGGGTCATT
Pme21 AF362450	(GT)15	68	F: ATAATGCTGGCGTCAGTGGT R: GGACAGCTGGTCTCAAGCTC
Pme28 AF362451	(GT)15	60	F: CCCAGAAGAGTGGAAGCTGT R: TGGTGGGAATTGACAAGAAA
Pme32 AF362452	(GT)7	66	F: GCGAGAAATCTGCCTGTGAC R: AGGAGGGCATCATGGAGAA

Ta: temperatura de anelamento do *primer*; F: *primer Forward*; R: *primer Reverse*.

As amostras amplificadas foram carregadas em gel de poliacrilamida 10% (acrilamida : bisacrilamida – 29 : 1) e desnaturante (6 M de uréia). A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X (90 mM de Tris-Borato e 2 mM de EDTA) na amperagem de 50 mA por sete horas.

Para a visualização dos alelos microssatélite, utilizou-se a coloração com nitrato de prata pelo método proposto por Bassam et al. (1991) adaptado, em que o gel foi submetido a três soluções: 1) solução de fixação (10% de etanol e 0,5% de ácido acético), por 20 minutos; 2) solução de impregnação (6 mM de nitrato de prata), por 10 minutos; 3) solução de revelação (0,75 M de NaOH e 0,22% de formol-40%), até o aparecimento dos alelos.

Posteriormente, os géis foram fotografados com câmera digital da Sony (DSC-P93A). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão 50 pb, usando o programa do sistema EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

### **Estatística**

A frequência dos alelos, o número de alelos, e a heterozigose observada e esperada, foram calculadas para cada *loci* usando o programa GENEPOP 3.3 (Raymond e Rousset, 1995). O equilíbrio de Hardy-Weinberg, a deficiência ou excesso de heterozigotos e desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* foram calculados pelo método de cadeia de Markov usando o programa GENEPOP 3.3. Os valores de diferenciação genética ( $F_{st}$ ) entre os reprodutores e a progênie foram estimados pelo método de Weir e Cockerham (1984) usando o programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). A determinação da paternidade da progênie foi realizada com a ajuda do programa Microsoft Excel.

## **RESULTADOS**

### **Variabilidade genética**

Os oito *loci* produziram um total de 31 alelos, variando de dois a cinco alelos por *locus*. O tamanho dos alelos variou de 182 pb (*locus* Pme5) a 268 pb (*locus* Pme21) (Tab. 2). Nenhum alelo observado nos reprodutores foi eliminado na progênie com a reprodução seminatural. Contudo, o *locus* Pme2 e o *locus* Pme4 apresentaram alteração quanto ao alelo de maior frequência nos parentais e na progênie, em ambos os casos o alelo de maior frequência foi alterado do B para o A (Tab. 2).

Embora o alelo de maior frequência nos *loci* Pme20 e Pme28 tenha sido o mesmo nos reprodutores e na progênie, a frequência foi bastante diferente entre estes, sendo 12,3% e 8,75% maior na progênie para os dois *loci*, respectivamente.

O *locus* Pme5 foi o único que apresentou alteração quanto ao alelo de menor frequência, passando do D nos reprodutores (7,5%) para o A na progênie (2,94%) (Tab. 2).

Tabela 2 – Frequência de alelos para os oito *loci* microsatélite encontrado para os reprodutores e para a progênie de *P. mesopotamicus*

<i>Primer</i>	Alelos	Parentais	Progênies
Pme2 (A = 5) <i>pb</i> = 195-213	A	0,1750	0,3605*
	B	0,3000*	0,2093
	C	0,2500	0,1977
	D	0,1250	0,0465
	E	0,1500	0,1860
Pme4 (A = 5) <i>pb</i> = 191-213	A	0,2000	0,3488*
	B	0,2500*	0,1977
	C	0,2250	0,1628
	D	0,2000	0,2209
	E	0,1250	0,0698
Pme5 (A = 4) <i>pb</i> = 182-200	A	0,1750	0,0294
	B	0,4250*	0,4118*
	C	0,3250	0,4118*
	D	0,0750	0,1470
Pme14 (A = 4) <i>pb</i> = 195-208	A	0,0250	0,0204
	B	0,7250*	0,7347*
	C	0,0750	0,0816
	D	0,1750	0,1633
Pme20 (A = 2) <i>pb</i> = 213-215	A	0,3000	0,1707
	B	0,7000*	0,8293*
Pme21 (A = 3) <i>pb</i> = 260-268	A	0,0500	0,0312
	B	0,9250*	0,9583*
	C	0,0250	0,0104
Pme28 (A = 5) <i>pb</i> = 209-227	A	0,2250	0,2500
	B	0,3500*	0,4375*
	C	0,0750	0,0312
	D	0,1000	0,1562
	E	0,2500	0,1250
Pme32 (A = 3) <i>pb</i> = 242-247	A	0,1250	0,1277
	B	0,8000*	0,8085*
	C	0,0750	0,0638

A: número de alelos; *pb*: tamanho dos alelos; \*Valores com maior frequência.

A progênie obtida pelo sistema reprodutivo seminatural apresentou heterozigose média observada (0,563) semelhante ao encontrado nos reprodutores (0,550) (Tab.3).

Para os reprodutores, os *loci* Pme2, Pme5 e Pme28 mostraram desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que o Pme2 e o Pme28 indicaram um excesso de heterozigotos, com valores de Fis de -0,195 e -0,180, respectivamente, e o Pme5 indicou uma deficiência de heterozigotos, com Fis de 0,358. Ainda, o valor médio de Fis dos reprodutores foi de 0,010, o que indicou uma significativa deficiência de heterozigotos (Tab. 3).

Na progênie nenhum *locus* apresentou desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Contudo, todos os *loci* apresentaram valores de Fis negativos, variando de -0,02 a -0,360, inclusive o Fis médio (-0,122), com exceção do *locus* Pme5 que apresentou Fis positivo, com valor de 0,031. No entanto, todos os valores de Fis não diferiram de zero, indicando nem excesso nem deficiência de heterozigotos em todos os *loci* (Tab. 3).

Tabela 3 – Número de alelos (A), heterozigose observada (Ho), heterozigose esperada (He), coeficiente de endogamia (Fis) e teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P(HW))

Amostras	<i>loci</i>								Média
	Pme2	Pme4	Pme5	Pme14	Pme20	Pme21	Pme28	Pme32	
Parentais (n=20)									
A	5	5	4	4	2	3	5	3	3,875
Ho	0,95	0,9	0,45	0,35	0,3	0,15	0,9	0,4	0,550
He	0,799	0,812	0,695	0,449	0,431	0,145	0,762	0,347	0,555
Fis	-0,195	-0,112	0,358	0,225	0,309	-0,040	-0,180	-0,160	0,010**
P(HW)	0,001**	0,101 <sup>ns</sup>	0,002**	0,294 <sup>ns</sup>	0,286 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0,013*	1,000 <sup>ns</sup>	-
Progênie (n=50)									
A	5	5	4	4	2	3	5	3	3,875
Ho	0,791	0,744	0,882	0,490	0,342	0,083	0,833	0,340	0,563
He	0,759	0,768	0,658	0,431	0,287	0,081	0,713	0,329	0,503
Fis	-0,042	0,031	-0,360	-0,138	-0,190	-0,02	-0,170	-0,030	-0,122 <sup>ns</sup>
P(HW)	0,281 <sup>ns</sup>	0,687 <sup>ns</sup>	0,233 <sup>ns</sup>	0,822 <sup>ns</sup>	0,575 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0,250 <sup>ns</sup>	0,426 <sup>ns</sup>	-

n: número de amostras; NS: Não significativo; \*Significativo (P<0,05); \*\*Significativo (P<0,01).

O desequilíbrio de ligação foi observado em seis pares de *loci* (Pme2 x Pme14, Pme2 x Pme20, Pme5 x Pme20, Pme14 x Pme28, Pme20 x Pme28, Pme21x Pme28). No entanto, ocorreu diferente padrão de desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* nos reprodutores e na progênie.

O valor de diferenciação genética ( $F_{st}$ ) obtido entre os reprodutores e a progênie foi de 0,003 ( $P=0,147$ ), indicando baixa diferenciação genética segundo a definição proposta por Wright et al. (1978).

### Composição das famílias

O Número de reprodutores utilizados no sistema reprodutivo seminatural foi de 11 machos e nove fêmeas ( $N_e$  teórico de 19,8). Contudo, apenas seis fêmeas (F1, F3, F5, F6, F8 e F9) e seis ou sete machos (M1, M2, M3, M4, M7/M8 e M9) contribuíram com descendentes na progênie o que fez com que o  $N_e$  se alterasse de 19,8 para no máximo 12,9. Não foi possível diferir os machos 7 e 8 pelos alelos microssatélite analisados.

Embora a maioria dos machos tenha contribuído na progênie, esta contribuição foi diferenciada, sendo que somente os machos 7 e / ou 8 contribuíram com 43,3% dos descendentes. Contudo, 13,3% da progênie apresentaram alelos microssatélites semelhantes, o que impossibilitou a distinção entre os machos 3 e 4. (Fig. 1).

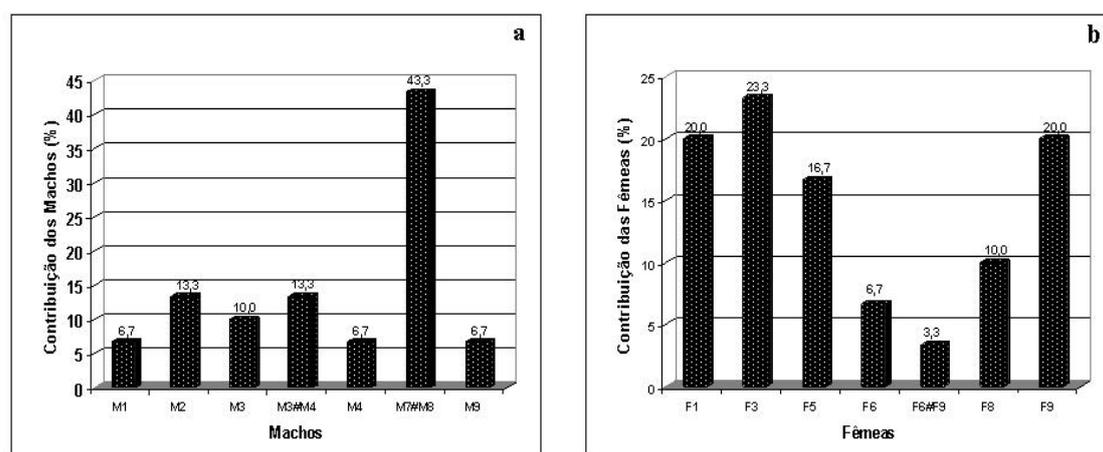


Figura 1 - Participação dos reprodutores de *P. mesopotamicus* na composição da progênie pelo sistema reprodutivo seminatural. As figuras **a** e **b** mostram a contribuição dos machos e das fêmeas, respectivamente.

A diferenciação na contribuição na progênie foi menor entre as fêmeas. Apenas 3,3% da progênie apresentaram alelos microssatélites semelhantes, o que impossibilitou a distinção entre as fêmeas 6 e 9 (Fig. 1).

Todos os machos que contribuíram com a progênie fertilizaram mais que uma fêmea, caracterizando paternidade múltipla. Os machos 7 e/ou 8 chegaram a fertilizar 66,6% das fêmeas (seis) do tanque (Fig. 2).

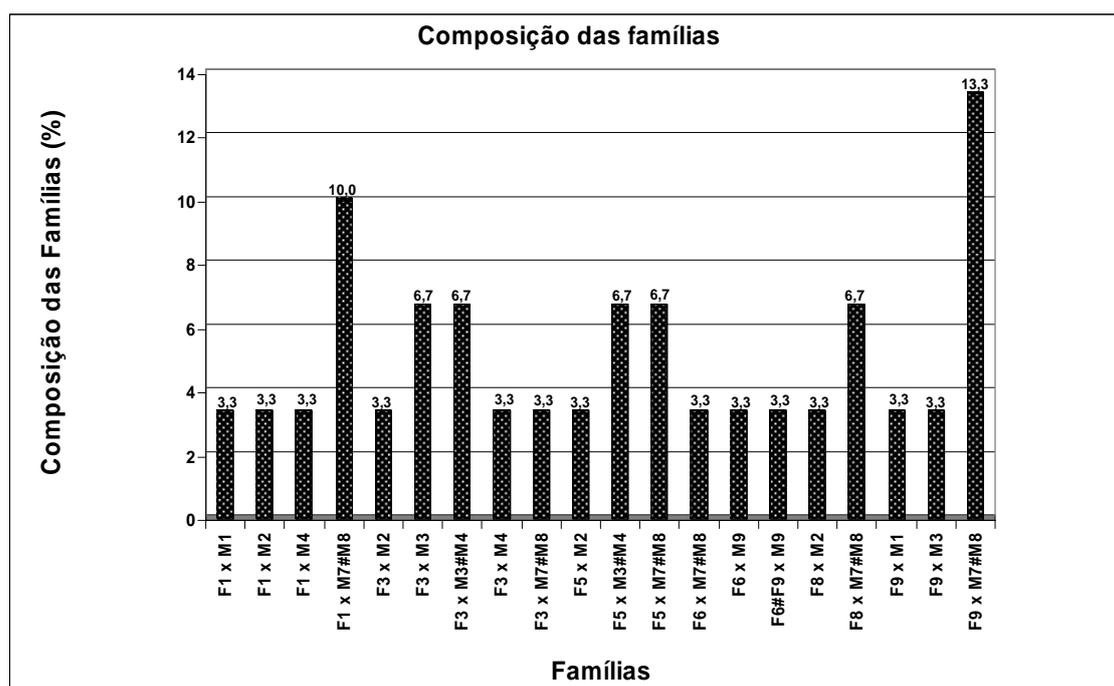


Figura 2 – Contribuição das famílias de *P. mesopotamicus* para a progênie obtida pelo sistema reprodutivo seminatural.

## DISCUSSÃO

### Variabilidade genética

A presença de todos os alelos microssatélites obtidos nos reprodutores na progênie e a frequência dos alelos semelhantes entre estes, indicam que o sistema reprodutivo seminatural manteve a variabilidade genética, pois a redução do número de alelos e a alteração nas frequências destes são os primeiros sinais para que isto aconteça (Allendorf, 1986; Innes e Elliott, 2006).

Embora o número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ) do sistema reprodutivo seminatural tenha sido menor (12,9) do que o valor esperado (19,8), este foi suficiente para manter a heterozigose na progênie (0,563) em relação aos reprodutores (0,550) e, portanto, também indica que foi mantida a variabilidade genética na progênie obtida por este manejo reprodutivo.

Contudo, o sistema reprodutivo seminatural pode apresentar dominância de apenas alguns reprodutores dependendo da espécie, com observaram Porta et al. (2006) para *Solea senegalensis*. Estes autores concluíram que a contribuição de apenas uma fêmea e dois machos ( $N_e = 2,67$ ) na progênie, de um total de nove fêmeas e 11 machos ( $N_e = 19,8$ ), foi responsável por promover a redução no número de alelos (8,6) e da heterozigose observada (0,79) dos parentais em relação à progênie (4,4 alelos e 0,68 de heterozigose).

Sekino et al. (2003) e Hara e Sekino (2003) também relatam que a menor variabilidade genética encontrada na progênie de *Paralichthys olivaceus* pelo sistema reprodutivo seminatural foi devido à participação de poucos reprodutores na progênie. Da mesma forma, Ortega-Villaizán Romo et al. (2005) e Ortega-Villaizán Romo et al. (2006) sugerem o mesmo quanto à redução da genética na progênie de *Verasper variegatus* em relação aos reprodutores.

Mesmo com a dominância de alguns reprodutores no manejo reprodutivo seminatural, como observado pelos autores a cima, a redução da variabilidade genética pode ser minimizada com o emprego de um grande número de reprodutores durante o período reprodutivo (Povh et al., 2006b), como observaram Perez-Enriquez et al. (1999) para a espécie *Pagrus major*. Estes autores constataram que embora tenha ocorrido a participação de poucos na reprodução, apenas 35%, o  $N_e$  de 63,7 justificou a alta variabilidade genética da progênie (heterozigose = 0,856) em relação aos parentais (heterozigose = 0,841).

O efeito do  $N_e$  sobre a variabilidade genética também foi observado por Yokota et al. (2003), os quais constataram que o aumento do  $N_e$  de 20 (10 machos x 10 fêmeas) para 50 (25 machos x 25 fêmeas) proporcionou uma maior variabilidade genética na progênie.

Portanto, o manejo reprodutivo com o emprego de um pequeno  $N_e$  pode levar a redução da variabilidade genética, principalmente devido ao efeito *bottleneck* (gargalo genético)

(Sekino et al., 2004). Desta forma, segundo Frankham et al. (2002), um  $N_e$  de 50 seria o mínimo para que em curto prazo não ocorra uma depressão endogâmica.

O excesso de heterozigotos nos *loci* Pme2 (Fis = -0,195) e Pme28 (Fis = -0,180) nos reprodutores pode indicar a quebra do efeito Wahlund, caso os reprodutores tenham sido formados por peixes coletados de diferentes localizações do rio Paraná (diferentes subpopulações). Desta forma, cada subpopulação tende a aumentar a homozigose e, conseqüentemente, quando são misturas promovem um excesso de heterozigotos.

A deficiência de heterozigoto, observado no *locus* Pme5 (Fis = 0,358) e o Fis médio (0,010), pode ser devido à endogamia, amostragem não aleatória ou efeito Wahlund (Castric et al., 2002). Contudo, destas explicações, as duas primeiras são mais adequadas, pois é provável que tenha ocorrido quebra do efeito Wahlund na formação do estoque, devido ao Fis negativo de alguns *loci*, e não o contrário.

Embora apenas o *locus* Pme5 apresentou valor positivo de Fis (0,031) e os demais *loci* valores negativos (-0,02 a -0,360), estes valores não diferiram de zero, indicam nem excesso e nem deficiência de heterozigotos e, portanto, a reprodução pelo sistema seminatural de *P. mesopotamicus* manteve o equilíbrio de Hardy-Weinberg na progênie. Ainda, a baixa diferenciação genética ( $F_{st} = 0,003$ ) entre os reprodutores e a progênie sugere que a amostragem dos alelos na formação dos gametas não estaria conduzindo a uma diferenciação genética entre estes.

Os diferentes padrões deste desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* nos reprodutores e na progênie sugerem que estes não estejam ligados fisicamente. Semelhantemente, Small et al. (2006) justificou que o desequilíbrio de ligação entre alguns pares de *loci* nas populações *Oncorhynchus keta* não foi devido ao acoplamento físico, mas possivelmente devido à endogamia ou ao efeito Wahlund, pois os *loci* foram transmitidos de maneira independente nas populações.

### **Múltipla paternidade**

Esta baixa determinação de paternidade, apenas 60% foi correlacionada com um único casal de reprodutores, foi devido ao pequeno número de alelos obtidos com a utilização dos oito *loci* microssatélite (31 alelos diferentes). Contudo, atualmente existem apenas estes oito *loci* microssatélite descrito por Calcagnotto et al. (2001) para *P. mesopotamicus*, os quais observaram no máximo 52 alelos diferentes, variando de dois a

10 alelos por *locus*. No entanto, estes autores observaram no máximo três alelos para os *loci* Pme20, Pme21 e Pme21, o que pode justificar a determinação de apenas 60% de paternidade da progênie.

A múltipla paternidade observada no sistema seminatural de *P. mesopotamicus* revelou que alguns machos chegaram a fertilizar de quatro a seis fêmeas. Em outras espécies, também foi observado este comportamento na reprodução seminatural, como se pode observar nos trabalhos de Frost et al. (2006) para *Lates calcarifer*, Porta et al. (2006) para *Solea senegalensis*, Fessehayé et al. (2006) para *Oreochromis niloticus*, Wesmajervi et al. (2006) para *Gadus morhua*, Garante et al. (2001) para *Salmo salar* e Sekino et al. (2003) para *Paralichthys olivaceus*.

A contribuição desigual dos machos pode ser devido ao real comportamento dominância do macho no acasalamento, sendo que apenas os machos 7 e/ou 8 contribuíram com 43,3% de toda a progênie. Sekino et al. (2003) também observou este comportamento desigual dos machos, os quais constaram que apenas um macho foi responsável por 99% da progênie. Segundo Tuyttens e Macdonald (2000), o nível de estresse pode afetar o estabelecimento de hierarquias e conseqüentemente o padrão dos acasalamentos. Contudo, a variação na qualidade de esperma pode ser um outro fator (Sekino et al., 2003). Campton (2004) ainda observou a competição dos espermatozoides quando foi misturado esperma de vários machos de *Salmo salar* em um *pool* de ovos, o que promoveu uma redução do Ne em relação ao nível esperado.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que houve paternidade múltipla e a dominância de alguns reprodutores de *P. mesopotamicus* no sistema reprodutivo seminatural. No entanto, variabilidade genética da progênie obtida por este sistema em relação aos reprodutores foi mantida.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN,

- A. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. São Carlos: RiMA, 2006. p.23-55.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; FERNANDES, D.R. et al. Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. *River Research and Applications*, v.18, p.299-306, 2002.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I. Migratory fish of upper Paraná river basin, Brazil. In: CAROLSFED, J.; HARVEY, B.; BAER, A. et al. (Ed.). *Migratory fishes of South America. Victoria: Biology Social Importance and Conservation Status*, 2003. p.19-99.
- AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M; GOMES, L.C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, v. 1, n.1, p.70-78, 2005.
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, v.25, p.4692-4693, 1997.
- ALLENDORF, F.W. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology*, v.5, p.181-190, 1986.
- ALLENDORF, F.W.; PHELPS, S.R. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, v.109, p.537-543, 1980.
- BAERWALD, M.; BIEN, V.; FEYRER, F. et al. Genetic analysis reveals two distinct Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*) populations. *Conserv Genet*, v.8, p.159-167, 2007.
- BARROSO, R.M; HILSDORF, A.W.S; MOREIRA, H.L.M. et al. Genetic diversity of wild and cultured populations of Brycon opalinus (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia) using microsatellites. *Aquaculture*, v.247, p.51-65, 2005.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Academic Press*, v.196, p.80-83, 1991.
- BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; VIANNA, N.C. et al. *Peixes do rio Paranapanema*. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, 2003. 112p.
- CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DeSALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci In *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes*, v.1, p.245-247, 2001.

- CAMPTON, D.C. Sperm competition in salmon hatcheries: the need to institutionalize genetically benign spawning protocols. *Transactions of the American Fisheries Society*, v.133, p.1277-1289, 2004.
- CASTRIC, V.; BEMATCHEZ, L.; BELKHIR, K. et al. Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus Fontinalis* Mitchell (Pisces, Salmonidae): a test of alternative hypotheses. *Heredity*, v.89, p.27-35, 2002.
- FALCONER, D.S. *Introdução a genética quantitativa*. Viçosa: UFV, 1987. 279p.
- FESSEHAYE, Y.; EL-BIALY, Z.; REZK, M.A. et al. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: A microsatellite analysis. *Aquaculture*, v.256, p.148-158, 2006.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. *Introduction to Conservation Genetics*. New York: Cambridge University Press, 2002. 640p.
- FROST, L.A.; EVANS, B.S.; JERRY, D.R. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, v.261, p.1056-1064, 2006.
- GARANT, D.; DODSON, J.J.; BERNATCHEZ, L. A genetic evaluation of mating system and determinants of individual reproductive success in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Heredity*, v.92, p.137-145, 2001.
- GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.1), 2000.
- HARA, M.; SEKINO, M. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture*, v.217, p.107-114, 2003.
- HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI Jr., P.M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, v.126, p.513-517, 2006.
- 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. 44p.
- INNES, B.H.; ELLIOTT, N.G. Genetic diversity in a Tasmanian hatchery population of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) compared with its Canadian progenitor population. *Aquaculture Research*, v.37, p.563-569, 2006.

ORTEGA-VILLAIZÁN ROMO, M.M. SUZUKI, S.; IKEDA, M. et al. Monitoring of the genetic variability of the hatchery and recaptured fish in the stock enhancement program of the rare species barfin flounder *Verasper moseri*. *Fisheries Science*, v.71, p.1120-1130, 2005.

ORTEGA-VILLAIZÁN ROMO, M.M.; ARITAKI, M.; TANIGUCHI, N. Pedigree analysis of recaptured fish in the stock enhancement program of spotted halibut *Verasper variegates*. *Fisheries Science*, v.72, p.48-52, 2006.

PEREZ-ENRIQUEZ, R.; TAKAGI, M.; TANIGUCHI, N. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, v.173, p.413-423, 1999.

PORTA, J.; PORTA, J.M.; MATÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. et al. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture*, v.256, p.159-166, 2006.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; MANGOLIN, C.A. et al. Padronização de protocolo de extração de DNA de pacu (*Piaractus mesopotamicu*). In: AquaCiência, 2., 2006, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquabio, 2006. CD-ROM.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N. et al. Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. In: AquaCiência, 2., 2006b, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquabio, 2006b. CD-ROM.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (version 3.3): population genetics software for exact tests and ecumenicism, 2001. Available from <http://www.cefe.cnrs-mop.fr/> Updated from RAYMOND, M.; ROUSSET, F., 1995.

RYMAN, N.; UTTER, F. *Population Genetics and Fishery Management*. Seattle: Univ. Washington Press, 1987. 420p.

RYMAN, N.; UTTER, F.; LAIKRE, L. Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Reviews Fish Biology and Fisheries*, v.5, p.417-446, 1995.

SEKINO, M.; HARA, M.; TANIGUCHI, N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, v.213, p.101-122, 2002.

SEKINO, M.; SAITOH, K.; YAMADA, T. et al. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery

- management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, v.221, p.255-263. 2003.
- SEKINO, M.; SUGAYA, T.; HARA, M. et al. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, v.233, p.163-172, 2004.
- SIROL, R.N.; BRITTO, S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M.G; HENRY, R.; JORCIN, A. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. São Carlos: RiMA, 2006. p.275-284.
- SMALL, M.P.; FRYE, A.E.; VON BARGEN, J.F. et al. Genetic structure of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) populations in the lower Columbia River: are chum salmon in Cascade tributaries remnant populations? *Conservation Genetics*, v.7, p.65-78, 2006.
- TANIGUCHI, N. Genetic factors in broodstock management for seed production. *Reviews Fish Biology and Fisheries*, v.13, p.175-185, 2003.
- TUYTTENS, F.A.M.; MACDONALD, D.W. Consequences of social perturbation for wildlife management and conservation. In: GOSLING, M.L.; SUTHERLAND, W.J. (Ed.). *Behaviour and Conservation*, Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p.315-329.
- VRIJENHOEK, R.C. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, v.53 (Supplement A), p.394-412, 1998.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v.38, p.1358-1370, 1984.
- WESMAJERVI, M.S.; WESTGAARD, J.I.; DELGHANDI, M. Evaluation of a novel pentaplex microsatellite marker system for paternity studies in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, v.37, p.1195-1201, 2006.
- WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. *A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão*. Brasília: Escopo, 1983. 220p.
- WRIGHT, S. *Evolution and genetics of populations*. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 511p.

YOKOTA, M.; HARADA, Y.; IIZUKA, M. Genetic drift in a hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. *Fisheries Science*, v.69, p.101-109, 2003.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSI, D.M. et al. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004. p.45-73.

## VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A população de *Piaractus mesopotamicus* apresentou maior variabilidade genética em relação ao estoque da piscicultura de Salto Grande, São Paulo. Contudo, a moderada diferenciação genética e o alto Nm, sugerem pouca diferença genética entres estas.

A progênie de *P. mesopotamicus* obtida pelo sistema reprodutivo seminatural apresentou maior variabilidade genética em relação à progênie obtida pelo sistema por extrusão. Ainda, o primeiro sistema mostrou maior eficiência reprodutiva das fêmeas, e menor mortalidade em relação ao segundo.

O sistema reprodutivo seminatural revelou múltipla paternidade e contribuição diferenciada entre os reprodutores na progênie de *P. mesopotamicus*. Todavia, este sistema permitiu que a variabilidade genética dos reprodutores fosse mantida na progênie.

Os resultados obtidos com os marcadores RAPD e microssatélite mostraram que houve coerência na análise da variabilidade genética, o que aumenta a confiança dos resultados, pois estes marcadores exploraram partes distintas do genoma.

## **VII. APÊNDICES**

## Apêndice A

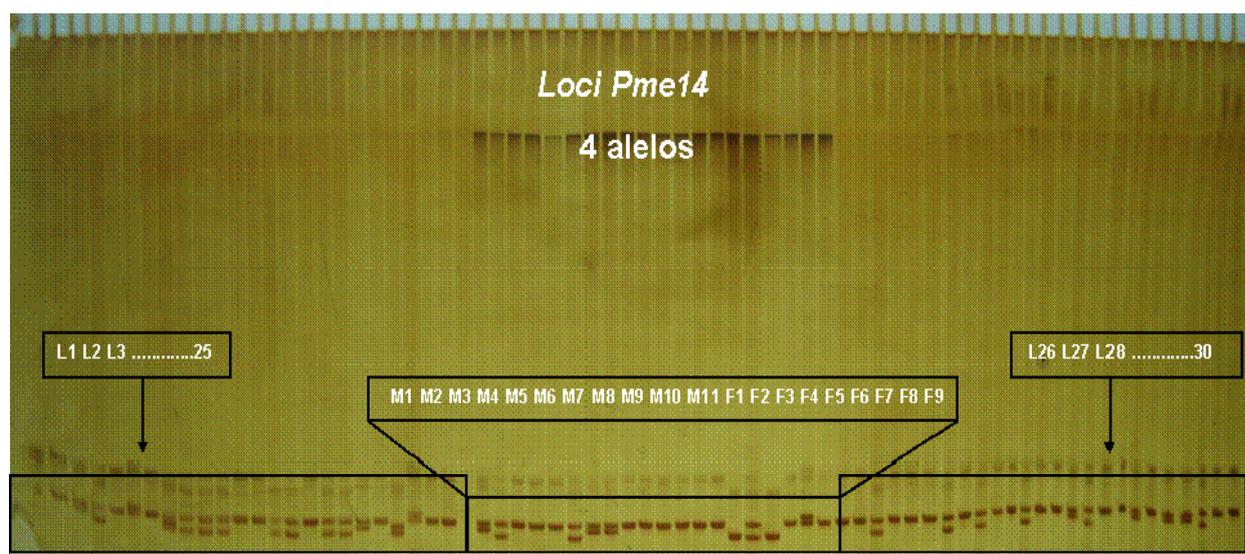


Figura 1A – Alelos de microssatélite analisados em gel de poliacrilamida desnaturante (10%) corado com nitrato de prata.

## Apêndice B

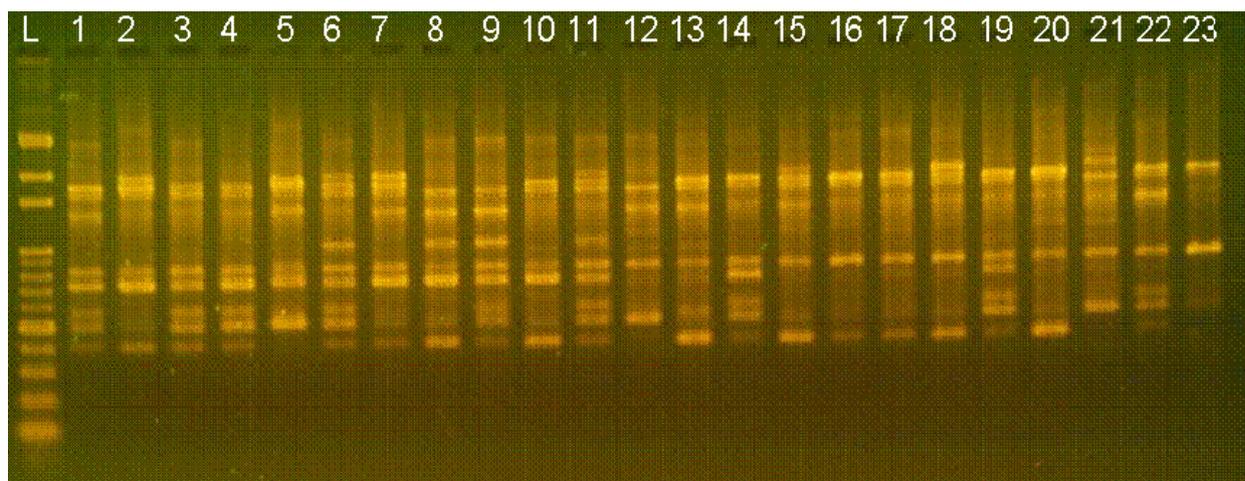


Figura 2A – Análise dos fragmentos RAPD do *primer* W3 em gel de agarose 1,7%. “L” corresponde ao ladder de 100 pb.